



DCM002-12
Ed. 07/2015

TESTOSTERONE ELISA

per analisi di routine

Determinazione immunoenzimatica diretta del Testosterone totale nel siero o plasma umano.

IVD



LOT

Vedere etichetta esterna

2°C 8°C



$\Sigma = 96$ tests

REF DKO002

DESTINAZIONE D'USO

Metodo competitivo immunoenzimatico colorimetrico per la determinazione quantitativa della concentrazione del Testosterone totale nel siero o plasma umano.

Il kit Testosterone ELISA è destinato al solo uso di laboratorio.

1. SIGNIFICATO CLINICO

Il testosterone (17β -OH-4-androstene-3-one) è un ormone steroideo della famiglia degli androgeni prodotto principalmente dalle cellule di Leydig situate nei testicoli e, in minima parte, dalle ovaie e dalla corteccia surrenale. È presente anche nelle donne, che, rispetto agli uomini, hanno una maggiore tendenza a convertire quest'ormone in estrogeni.

In maschi postpuberali, il testosterone è secreto soprattutto dai testicoli e una parte deriva dalla conversione periferica del androstenedione. Nell'uomo è deputato allo sviluppo degli organi sessuali (differenziazione del testicolo e di tutto l'apparato genitale) e dei caratteri sessuali secondari, come la barba, la distribuzione dei peli, il timbro della voce e la muscolatura. Il testosterone, nell'età puberale, interviene anche sullo sviluppo scheletrico, limitando l'allungamento delle ossa lunghe ed evitando, in questo modo, una crescita spropositata degli arti. Nell'uomo adulto, i livelli di testosterone hanno un ruolo molto importante per quanto riguarda la sessualità, l'apparato muscolo scheletrico, la vitalità e la buona salute (intesa soprattutto come protezione da malattie metaboliche come ipertensione e diabete mellito); contribuisce a garantire la fertilità, in quanto stimola la maturazione degli spermatozoi nei testicoli. Inoltre influenza qualità e quantità dello sperma prodotto, poiché opera sulle vie seminali e sulla prostata, deputate alla produzione di sperma. La produzione giornaliera di testosterone nell'uomo varia dai 5 ai 7 milligrammi ma, superati i 30 anni, tende a diminuire annualmente dell'1%. Nelle donne più del 50% del testosterone sierico deriva dalla conversione periferica del androstenedione secreta dall'ovaia, e dalla secrezione diretta del testosterone da queste ghiandole. La maggior parte del testosterone circolante è legata alle SHBG e una piccola parte all'albumina. Soltanto una piccola parte (< 1%) circola come testosterone libero.

Gli effetti del testosterone possono essere classificati come effetti sessuali e anabolici, anche se la distinzione è in qualche modo artificiale. Gli effetti anabolici includono lo sviluppo della massa e resistenza del muscolo, densità e resistenza ossea e sviluppo e maturazione lineare dell'osso. Gli effetti sessuali includono la maturazione degli organi coinvolti e dopo la nascita (durante la pubertà) un abbassamento della voce, sviluppo della barba e peluria (caratteristiche sessuali secondarie maschili). I livelli del testosterone declinano gradualmente con l'età negli uomini (andropausa). I sintomi dell'andropausa sono generalmente associati all'invecchiamento quale la perdita della massa muscolare e diminuzione della densità ossea, diminuita resistenza fisica, diminuita capacità di memorizzazione e la perdita della libido.

In femmine di tutte le età, i livelli elevati di testosterone possono essere associati con tumori adrenali e ovaie policistiche.

2. PRINCIPIO DEL METODO

Nel sangue il testosterone è legato alle SHBG (60%) ed in minore quantità ad altre proteine (ad esempio albumina); il testosterone non legato (< 1% del totale) è chiamato "testosterone libero". La formulazione chimica del presente dosaggio permette di liberare completamente il testosterone dalle proteine legate; pertanto il kit Diametra Testosterone permette di misurare la concentrazione del testosterone totale (legato + libero) presente nel campione. Se si vuole misurare solo la frazione di testosterone libero, è disponibile il kit ELISA Diametra "Free Testosterone". Il testosterone (antigene) presente nel campione compete con il testosterone antigenico marcato con perossidasi di rafano (HRP) presente nel Coniugato nei confronti dell'anticorpo anti-Testosterone adsorbito su micropiastra (fase solida).

Dopo l'incubazione, la separazione libero-legato si ottiene mediante semplice lavaggio della fase solida. Successivamente, l'enzima HRP presente nella frazione legata, catalizza la reazione tra il Substrato (H_2O_2) ed il TMB-Substrate (TMB), sviluppando una colorazione blu che vira al giallo dopo aggiunta della Stop solution (H_2SO_4).

L'intensità del colore sviluppato è inversamente proporzionale alla concentrazione di Testosterone presente nel campione.

La concentrazione di Testosterone nel campione è calcolata sulla base di una curva di calibrazione.

3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

1. Calibrators (5 flaconi, 1 mL ciascuno)

CAL0	REF DCE002/0206-0
CAL1	REF DCE002/0207-0
CAL2	REF DCE002/0208-0
CAL3	REF DCE002/0209-0
CAL4	REF DCE002/0210-0

2. Controlli (2 flaconi, 1 mL ciascuno)

Control A	REF DCE045/0203A-0
Control B	REF DCE045/0203B-0

La concentrazione dei Controlli è indicata sul Certificato di Analisi

3. Conjugate (1 flacone, 12 mL)

Testosterone coniugato con Perossidasi di rafano (HRP)

REF DCE002/0202-0

4. Coated Microplate (1 micropiastra breakable)

Anticorpo anti Testosterone adsorbito su micropiastra

REF DCE002/0203-0

5. TMB Substrate (1 flacone, 15 mL)

H₂O₂ -TMB (0,26 g/L) *(evitare il contatto con la pelle)*

REF DCE004-0

6. Stop Solution (1 flacone, 15 mL)

Acido Solforico 0,15 mol/L *(evitare il contatto con la pelle)*

REF DCE005-0

7. 10X Conc. Wash Solution (1 flacone, 50 mL)

Tampone fosfato 0,2M pH 7.4 **REF** DCE054-0

3.2. Reattivi e materiali necessari non forniti

Acqua distillata

3.3. Materiale ausiliario e strumentazione

Dispensatori automatici.

Lettore per micropiastre (450 nm, 620-630 nm)

Note

Conservare tutti i reattivi a 2-8 °C, al riparo dalla luce. Aprire la busta del Reattivo 4 (Coated Microplate) solo dopo averla riportata a temperatura ambiente e chiuderla subito dopo il prelievo delle strips da utilizzare; una volta aperta è stabile fino alla data di scadenza del kit.

4. AVVERTENZE

- Questo test kit è per uso in vitro, da eseguire da parte di personale esperto. Non usare internamente nè esternamente su esseri umani o animali.
- Usare i previsti dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le Buone Pratiche di Laboratorio (GLP) per la manipolazione di prodotti derivati da sangue.
- Tutti i reattivi di origine umana usati nella preparazione dei reagenti sono stati testati e sono risultati negativi per la presenza di anticorpi anti-HIV 1&2, per HbsAg e per anticorpi anti-HCV.

Tuttavia nessun test offre la certezza completa dell'assenza di HIV, HBV, HCV o di altri agenti infettivi. Pertanto, i reagenti devono essere maneggiati come materiali potenzialmente infettivi.

- Materiali di origine animale usati per la preparazione di questo kit sono stati ottenuti da animali sani e le proteine bovine sono state ottenute da paesi non affetti da BSE, ma comunque questi materiali dovrebbero essere usati come potenzialmente contagiosi.
- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di Sodio Azide (NaN₃) o di Proclin 300^R come conservante. Evitare il contatto con la pelle e le mucose.
- La Sodio Azide può essere tossica se ingerita o assorbita attraverso la cute o gli occhi; inoltre, può reagire con le tubature di piombo o rame formando azidi metalliche potenzialmente esplosive. Se si usa un lavandino per eliminare i reagenti, lasciar scorrere grandi quantità di acqua per prevenire la formazione di azidi.
- Il TMB Substrato contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito attraverso la cute. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con la cute e con gli occhi.
- La Stop Solution è costituita da una soluzione di acido solforico diluito. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire possibili ustioni chimiche, evitare il contatto con la cute e con gli occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente TMB/H₂O₂ a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.
- Questo metodo consente di determinare concentrazioni di Testosterone da 0,2 ng/mL a 16,0 ng/mL.
- La somministrazione di steroidi naturali o sintetici può alterare i livelli ematici di Testosterone.

5. PRECAUZIONI

- Si prega di attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi indicata in questo protocollo. I risultati presentati qui sono stati ottenuti usando specifici reagenti elencati in queste Istruzioni per l'Uso.
- Tutti i reattivi devono essere conservati a temperatura controllata di 2-8 °C nei loro contenitori originali. Eventuali eccezioni sono chiaramente indicate. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza se conservati e trattati seguendo le istruzioni fornite.
- Prima dell'uso lasciare tutti i componenti dei kit e i campioni a temperatura ambiente (22-28 °C) e mescolare accuratamente.
- Non scambiare componenti dei kit di lotti diversi. Devono essere osservate le date di scadenza riportate sulle etichette della scatola e di tutte le fiale. Non utilizzare componenti oltre la data di scadenza.
- Qualora si utilizzi strumentazione automatica, è responsabilità dell'utilizzatore assicurarsi che il kit sia stato opportunamente validato.
- Un lavaggio incompleto o non accurato dei pozzetti può causare una scarsa precisione e/o

un'elevato background. Per migliorare le prestazioni del kit su strumentazione automatica, si consiglia di aumentare il numero di lavaggi.

- Per la riproducibilità dei risultati, è importante che il tempo di reazione di ogni pozzetto sia lo stesso. Per evitare il time shifting durante la dispensazione degli reagenti, il tempo di dispensazione dei pozzetti non dovrebbe estendersi oltre i 10 minuti. Se si protrae oltre, si raccomanda di seguire lo stesso ordine di dispensazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva di calibrazione in ogni piastra.
- L'aggiunta del TMB Substrato dà inizio ad una reazione cinetica, la quale termina con l'aggiunta della Stop Solution. L'aggiunta del TMB Substrato e della Stop Solution deve avvenire nella stessa sequenza per evitare tempi di reazione differenti.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori clinici testando controlli e/o pool di sieri.
- Osservare la massima precisione nella ricostituzione e dispensazione dei reagenti.
- Non usare campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici o emolizzati.
- I lettori di micropiastre leggono l'assorbanza verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.

6. PROCEDURA

6.1. Preparazione dei Calibratori (C₀...C₄)

I Calibratori sono pronti all'uso ed hanno le seguenti concentrazioni di Testosterone:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
ng/mL	0	0,2	1,0	4,0	16,0

Una volta aperti, sono stabili 6 mesi a 2÷8°C.

6.2. Preparazione del Coniugato

Pronto all'uso. Mescolare delicatamente per almeno 5 minuti su agitatore rotante.

Stabile 6 mesi a 2÷8°C dall'apertura del flacone.

6.3. Preparazione dei Campioni

La determinazione del Testosterone può essere effettuata su plasma o su siero umano.

Se il dosaggio non viene effettuato lo stesso giorno del prelievo conservare il campione a -20°C. Evitare cicli di congelamento e scongelamento del campione. I Controlli sono pronti all'uso.

6.4. Preparazione della Wash Solution

Prima dell'uso, diluire il contenuto di ogni fiala di "10X Conc. Wash Solution" con acqua distillata fino al volume di 500 mL. Per preparare volumi minori rispettare il rapporto di diluizione di 1:10. La soluzione di lavaggio diluita è stabile a 2-8°C per almeno 30 giorni.

Nella wash solution concentrata è possibile osservare la presenza di cristalli; in tal caso agitare a temperatura ambiente fino a completa dissoluzione dei cristalli; per una maggiore precisione diluire tutto il flacone della soluzione di lavaggio concentrata a 500

mL, avendo cura di trasferire anche i cristalli, poi agitare fino a completa dissoluzione dei cristalli.

6.5. Procedimento

- **Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (22-28°C) per almeno 30 minuti.** Al termine del dosaggio riporre immediatamente tutti i reagenti a 2-8°C: evitare lunghi periodi a temperatura ambiente.
- Le strisce di pozzetti non utilizzate devono essere rimesse immediatamente nella busta richiudibile contenente il materiale essiccante e conservate a 2-8°C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche non rimettere i reagenti inutilizzati nei flaconi originali.
- Al fine di aumentare l'accuratezza dei risultati del test è necessario operare in doppio, allestendo due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C₀-C₄), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagente	Calibratori	Campione /Controllo	Bianco
Campione /Controllo		25 µL	
Calibratori C ₀ -C ₄	25 µL		
Conjugate	100 µL	100 µL	
Incubare 1 h a 37°C. Allontanare la miscela di reazione. Lavare i pozzetti 3 volte con 300 µL di wash solution diluita. Nota importante: ad ogni step di lavaggio, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e successivamente rimuovere l'eccesso di soluzione di lavaggio sbattendo delicatamente la micropiastra capovolta su fogli di carta assorbente. Lavaggi automatici: se si utilizza un lavatore automatico, effettuare 6 lavaggi.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubare 15 minuti a temperatura ambiente (22÷28°C), al riparo dalla luce.			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Agitare delicatamente la micropiastra. Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm oppure contro il Bianco entro 5 minuti.			

7. CONTROLLO QUALITA'

Ogni laboratorio dovrebbe analizzare i campioni nella gamma dei livelli elevati, normali e bassi di Testosterone per il controllo delle prestazioni dell'analisi. Questi campioni dovrebbero essere trattati come ignoti ed i valori determinati in ogni test effettuato. Le tabelle di controllo qualità dovrebbero essere effettuate per seguire le prestazioni dei reagenti forniti. Metodi statistici adeguati dovrebbero essere

impiegati per accertare il trend. Il laboratorio dovrebbe fissare i limiti di accettabilità di prestazioni dell'analisi. Altri parametri che dovrebbero essere controllati includono le intercette di 80, 50 e 20% della curva di calibrazione per valutare la riproducibilità. In più, la capacità di assorbimento massima dovrebbe essere costante con l'esperienza precedente. La deviazione significativa dalle prestazioni stabilite può indicare il cambiamento inosservato negli stati o nella degradazione sperimentali dei reagenti del kit. Reagenti freschi dovrebbero essere usati per determinare il motivo delle variazioni.

8. RISULTATI

8.1. Estinzione Media

Calcolare l'estinzione media (E_m) di ciascun punto della curva di calibrazione (C_0-C_4) e di ogni campione.

8.2 Curva di calibrazione

Tracciare sul grafico delle assorbanze i valori calcolati delle estinzioni medie (E_m) di ciascun Calibratore (C_0-C_4) in funzione delle concentrazioni. Tracciare la miglior curva passante per i punti di calibrazione (es: Four Parameter Logistic).

8.3 Calcolo dei risultati

Interpolare, dal grafico, i valori di assorbanza relativi a ciascun campione e leggerne la corrispondente concentrazione in ng/mL.

9. VALORI DI RIFERIMENTO

Le concentrazioni seriche di Testosterone sono comprese nei seguenti intervalli:

	n° sieri	Mediana ng/mL	Range ng/mL
Maschi (anni)			
< 12	16	< 0,10	< 0,10 - 1,01
12 - 18	16	5,02	0,56 - 8,63
19 - 55	16	3,54	2,12 - 6,01
> 55	16	1,51	0,11 - 7,25
Femmine (anni)			
< 12	16	< 0,10	< 0,10 - 0,16
12 - 18	15	0,23	< 0,10 - 0,63
19 - 55	16	0,20	< 0,10 - 0,63
> 55	16	0,13	< 0,10 - 0,32

È importante tenere presente che la determinazione di un range di valori attesi in un dato metodo per una popolazione "normale" è dipendente da molteplici fattori, quali la specificità e sensibilità del metodo in uso, e la popolazione in esame. Perciò ogni laboratorio dovrebbe considerare i range indicati dal Fabbricante come un'indicazione generale e produrre range di valori attesi propri basati sulla popolazione indigena dove il laboratorio risiede.

10. PARAMETRI CARATTERISTICI

10.1. Precisione

10.1.1. Intra - Assay

La variabilità all'interno dello stesso kit è stata determinata replicando (16x) la misura di tre differenti sieri. La variabilità intra-assay è $\leq 7,0\%$.

10.1.2. Inter - Assay

La variabilità tra kit differenti è stata determinata replicando (9x) la misura di tre differenti sieri con kit appartenenti a lotti diversi. La variabilità inter-assay è $\leq 8,3\%$.

10.2. Specificità

L'anticorpo impiegato presenta le seguenti reazioni crociate, calcolate al 50% secondo Abraham:

Testosterone	100%
Dihydrotestosterone	2,03%
Androstenedione	0,01%
Androsterone	0,05%
DHEA-S	0%
Cortisol	0,01%
Cortisone	0%
17 β Estradiol	0,16%
Prednisone	0%
Estrone	0,01%

10.3. Accuratezza

La prova di recupero condotta su un campione arricchito con 0,4 - 0,8 - 4,0 - 14,0 ng/mL di Testosterone, ha dato un valore medio di 98,9%.

La prova di diluizione effettuata su 3 campioni diluiti fino a 4 volte ha dato un valore medio di 99,7%.

10.4. Sensibilità

La concentrazione minima di Testosterone misurabile che può essere distinta dal Calibratore 0 è 0,10 ng/mL con un limite di confidenza del 95%.

10.5. Correlazione

Il nuovo kit Testosterone ELISA Diametra è stato comparato con il precedente kit Testosterone ELISA Diametra. Sono stati testati i campioni di siero di 24 donne e 28 uomini.

La curva di regressione è:

$$Y = 1,13 \cdot X + 0,06$$

$$r^2 = 0,92$$

Il kit Testosterone Diametra è stato comparato con un kit disponibile in commercio. Sono stati testati i campioni di siero di 24 donne e 29 uomini.

La curva di regressione è:

$$Y = 0,89 \cdot X + 0,24$$

$$r^2 = 0,93$$

11. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

I reagenti devono essere smaltiti in accordo con le leggi locali.

BIBLIOGRAFIA

- Joshi, U. M., et al., Steroids 34 (1) 35 (1979)
- Turkes, A., et al., J Endocrinol. 81 (2) P165 (1979)
- Ismail, A. A., Niswender, G. D. Midgley, A. R., J. Clin. Endocr. Metab. 34, 177 - 184 (1972)
- Rajkowski K.M, Cittanova N, Desfosses B. and Jayle M.F., Steroids 29 no 5 (1977)
- Widsdom G. B., Clin. Chem. 22/8, 1243 - 1255 (1976)

Ed. 07/2015

DCM002-12

DiaMetra S.r.l. Headquater: Via Calabria 15,
20090 SEGRATE (MI) Italy
Tel. +39-02-2139184
Fax +39-02-2133354

Manufactory: Via Pozzuolo 14,
06038 SPELLO (PG) Italy
Tel. +39-0742-24851
Fax +39-0742-316197
E-mail: info@diametra.com



DCM002-12
Ed. 07/2015

TESTOSTERONE ELISA

for routine analysis

Direct immunoenzymatic determination of total Testosterone in human serum or plasma.

IVD



LOT

See external label

2°C 8°C



Σ = 96 tests

REF DKO002

INTENDED USE

Competitive immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination of total Testosterone concentration in human serum or plasma.

Testosterone ELISA kit is intended for laboratory use only.

1. CLINICAL SIGNIFICANCE

Testosterone (17β-OH-4-androstene-3-one) is a steroid hormone family of androgens mainly produced by the Leydig cells located in the testes and, minimally, by the ovaries and the adrenal cortex. It is also present in women who, compared to men, have a greater tendency to convert into estrogen this hormone.

In postpubertal males, testosterone is secreted primarily by the testes with only a small amount derived from peripheral conversion of androstenedione. In humans is deputy to the development of the sexual organs (differentiation of the testis and the whole genital apparatus) and of secondary sexual characteristics, such as beard, hair distribution, the timbre of the voice and muscles. The testosterone, during puberty, is also involved on skeletal development, limiting the elongation of the long bones and avoiding, in this way, a disproportionate growth of the limbs. In adult humans, the levels of testosterone have a very important role as regards the sexuality, the musculoskeletal system, the vitality and good health (mainly understood as protection from metabolic diseases such as hypertension and diabetes mellitus); helps to ensure fertility, as it stimulates the maturation of sperm in the testes. Also influence the quality and quantity of sperm produced, since the seminal work on the streets and on the prostate, deputies to the production of sperm. Daily production of testosterone in men varies from 5 to 7 milligrams, but exceeded 30 years, tends to decrease annually by 1%. In adult women over 50% of serum testosterone is derived from peripheral conversion of androstenedione secreted by the adrenal and ovary, with the remainder from direct secretion of testosterone by these glands. The majority of circulating testosterone is bound by SHBG and a smaller portion is bound by albumin. Only a small percentage (< 1%) exists in circulation as unbound or free testosterone.

Testosterone effects can be classified as virilizing and anabolic effects, although the distinction is somewhat artificial, as many of the effects can be considered both. Anabolic effects include growth of muscle mass and strength, increased bone density and strength, and stimulation of linear growth and bone maturation. Virilizing effects include maturation of the sex organs, and after birth (usually at puberty) a deepening of the voice, growth of the beard and axillary hair (male secondary sex characteristics).

Testosterone levels decline gradually with age in men (andropause). The signs and symptoms are non-specific, and are generally associated with aging such as loss of muscle mass and bone density, decreased physical endurance, decreased memory ability and loss of libido.

In females of all ages, elevated testosterone levels can be associated with a variety of virilizing conditions, including adrenal tumors and polycystic ovarian disease.

2. PRINCIPLE

Testosterone in the blood is bound to SHBG (60%) and in lower quantity to other proteins (for example albumin); the unbound Testosterone (< 1% of total Testosterone) is known as "free Testosterone". The chemical formulation of this assay allows to release completely the Testosterone from bound proteins; thus Diametra Testosterone kit allows to measure the concentration of total Testosterone (bound + free) in the sample. For the measurement of free Testosterone only, ELISA Diametra "Free Testosterone" kit is available.

Testosterone (antigen) in the sample competes with the antigenic Testosterone conjugated with horseradish peroxidase (HRP) present in the Conjugate for binding to the antibodies anti-testosterone coated on the microplates (solid phase). After the incubation, the bound/free separation is performed by a simple solid-phase washing.

The enzyme HRP in the bound-fraction reacts with the Substrate (H₂O₂) and the TMB Substrate and develops a blu color that changes into yellow when the Stop Solution (H₂SO₄) is added.

The colour intensity is inversely proportional to the Testosterone concentration in the sample.

Testosterone concentration in the sample is calculated through a calibration curve.

3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

3.1. Reagents and materials supplied in the kit

1. Calibrators (5 vials, 1 mL each)

CAL0	REF	DCE002/0206-0
CAL1	REF	DCE002/0207-0
CAL2	REF	DCE002/0208-0
CAL3	REF	DCE002/0209-0
CAL4	REF	DCE002/0210-0

2. Control (2 vials, 1 mL each)

Control A	REF	DCE045/0203A-0
Control B	REF	DCE045/0203B-0

Controls Concentration is indicated on the Certificate of Analysis

3. Conjugate (1 vial, 12 mL)

Testosterone conjugated with horseradish peroxidase (HRP)

REF **DCE002/0202-0**

4. Coated Microplate (1 breakable microplate)

Anti Testosterone antibody adsorbed on microplate

REF **DCE002/0203-0**

5. TMB Substrate (1 vial, 15 mL)

H₂O₂-TMB 0.26 g/L (avoid any skin contact)

REF **DCE004-0**

6. Stop Solution (1 vial, 15 mL)

Sulphuric acid 0.15 mol/L (avoid any skin contact)

REF **DCE005-0**

7. 10X Conc. Wash Solution (1 vial, 50 mL)

Phosphate buffer 0.2M pH 7.4

REF **DCE054-0**

3.2. Reagents necessary not supplied

Distilled water

3.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.

Microplates reader (450 nm, 620-630 nm)

Notes

Store all reagents at 2-8 °C in the dark.

Open the bag of reagent 4 (Coated Microplate) only when it is at room temperature and close it immediately after use; once opened, the microplate is stable until expiry date of the kit.

4. WARNINGS

- This kit is intended for in vitro use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
- All human source material used in the preparation of the reagents has been tested and found negative for antibody to HIV 1&2, HbsAg, and HCV. No test method however can offer complete assurance that HIV, HBV, HCV or other infectious agents are absent. Therefore, the reagents should be handled in the same manner as potentially infectious material.
- Material of animal origin used in the preparation of the kit has been obtained from animals certified as

healthy and the bovine protein has been obtained from countries not infected by BSE, but these materials should be handled as potentially infectious.

- Some reagents contain small amounts of Sodium Azide (NaN₃) or Proclin 300^R as preservatives. Avoid the contact with skin or mucosa.
- Sodium Azide may be toxic if ingested or absorbed through the skin or eyes; moreover it may react with lead or copper plumbing to form potentially explosive metal azides. If you use a sink to remove the reagents, allow scroll through large amounts of water to prevent azide build-up.
- The TMB Substrate contains an irritant, which may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous and corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H₂O₂ to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.
- This method allows the determination of Testosterone from 0.2 ng/mL to 16.0 ng/mL.
- The clinical significance of the determination Testosterone can be invalidated if the patient was treated with cortisone or natural or synthetic steroids.

5. PRECAUTIONS

- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol. The performance data represented here were obtained using specific reagents listed in this Instruction For Use.
- All reagents should be stored refrigerated at 2-8 °C in their original container. Any exceptions are clearly indicated. The reagents are stable until the expiry date when stored and handled as indicated.
- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22-28 °C) and mix well prior to use.
- Do not interchange kit components from different lots. The expiry date printed on box and vials labels must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- If you use automated equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately tested.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background. To improve the performance of the kit on automatic systems, it is recommended to increase the number of washes.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate
- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the

addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.

- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of the reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

6. PROCEDURE

6.1. Preparation of the Calibrators (C₀...C₄)

The Calibrators are ready for use and have the following concentration of Testosterone:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
ng/mL	0	0.2	1.0	4.0	16.0

Once opened, the Calibrators are stable six months at 2-8°C.

6.2. Preparation of the Conjugate

Ready to use. Mix gently for 5 minutes with a rotating mixer.

Once opened, it is stable six months at 2-8°C.

6.3. Preparation of the Sample

The determination of Testosterone can be performed in human plasma as well as in serum of patients.

Store the sample at -20°C if the determination is not performed on the same day of the sample collection. Avoid repetitive freezing and thawing of samples.

The Controls are ready to use.

6.4. Preparation of Wash Solution

Dilute the content of each vial of the "10X Conc. Wash Solution" with distilled water to a final volume of 500 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:10 dilution ratio. The diluted wash solution is stable for 30 days at 2-8°C.

In concentrated wash solution is possible to observe the presence of crystals; in this case mix at room temperature until the complete dissolution of crystals; for greater accuracy, dilute the whole bottle of concentrated wash solution to 500 mL, taking care to transfer completely the crystals, then mix until crystals are completely dissolved.

6.5. Procedure

- **Allow all reagents to reach room temperature (22-28°C) for at least 30 minutes.** At the end of the assay, store immediately the reagents at 2-8°C: avoid long exposure to room temperature.
- Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2-8°C.

- To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.
- As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the calibration curve (C₀-C₄), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample/Control	Blank
Sample/Control		25 µL	
Calibrator C ₀ -C ₄	25 µL		
Conjugate	100 µL	100 µL	
Incubate at 37°C for 1 hour. Remove the content from each well. Wash the wells 3 times with 300 µL of diluted wash solution. Important note: during each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel. Automatic washer: in case you use an automatic washer, it is advised to do 6 washing steps.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate at room temperature (22÷28°C) for 15 minutes in the dark.			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Shake the microplate gently. Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against Blank within 5 minutes.			

7. QUALITY CONTROL

Each laboratory should assay controls at normal, high and low levels range of Testosterone for monitoring assay performance. These controls should be treated as unknowns and values determined in every test procedure performed. Quality control charts should be maintained to follow the performance of the supplied reagents. Pertinent statistical methods should be employed to ascertain trends. The individual laboratory should set acceptable assay performance limits. Other parameters that should be monitored include the 80, 50 and 20% intercepts of the calibration curve for run-to-run reproducibility. In addition, maximum absorbance should be consistent with past experience. Significant deviation from established performance can indicate unnoticed change in experimental conditions or degradation of kit reagents. Fresh reagents should be used to determine the reason for the variations.

8. RESULTS

8.1. Mean absorbance

Calculate the mean of the absorbances (E_m) for each point (C_0 - C_4) of the calibration curve and of each sample.

8.2 Calibration curve

Plot the mean value of absorbance (E_m) of the Calibrators (C_0 - C_4) against concentration. Draw the best-fit curve through the plotted points. (es: Four Parameter Logistic).

8.3 Calculation of results

Interpolate the values of the samples on the calibration curve to obtain the corresponding values of the concentrations expressed in ng/mL.

9. REFERENCE VALUES

The serum Testosterone reference values are:

	n° sera	Median ng/mL	Range ng/mL
Male (age)			
< 12	16	< 0.10	< 0.10 - 1.01
12 - 18	16	5.02	0.56 - 8.63
19 - 55	16	3.54	2.12 - 6.01
> 55	16	1.51	0.11 - 7.25
Female (age)			
< 12	16	< 0.10	< 0.10 - 0.16
12 - 18	15	0.23	< 0.10 - 0.63
19 - 55	16	0.20	< 0.10 - 0.63
> 55	16	0.13	< 0.10 - 0.32

Please pay attention to the fact that the determination of a range of expected values for a "normal" population in a given method is dependent on many factors, such as specificity and sensitivity of the method used and type of population under investigation. Therefore each laboratory should consider the range given by the Manufacturer as a general indication and produce their own range of expected values based on the indigenous population where the laboratory works.

10. PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

10.1. Precision

10.1.1. Intra Assay Variation

Within run variation was determined by replicate the measurements (16x) of three different sera in one assay. The within assay variability is $\leq 7.0\%$.

10.1.2. Inter Assay Variation

Between run variation was determined by replicate the measurements (9x) of three different sera in different lots. The between assay variability is $\leq 8.3\%$.

10.2. Specificity

The cross reaction of the antibody calculated at 50% according to Abraham are shown in the table:

Testosterone	100%
Dihydrotestosterone	2.03%
Androstenedione	0.01%
Androsterone	0.05%
DHEA-S	0%
Cortisol	0.01%
Cortisone	0%
17b Estradiol	0.16%
Estrone	0%
Prednisone	0.01%

10.3. Accuracy

The recovery of 0.4 - 0.8 - 4.0 - 14.0 ng/mL of Testosterone added to the sample gave an average value of 98.9% with reference to the original concentrations.

The dilution test performed on 3 samples diluted up to 4 times gave an average value of 99.7%.

10.4. Sensitivity

The lowest detectable concentration of Testosterone that can be distinguished from the Calibrator 0 is 0.10 ng/mL at the 95% confidence limit.

10.5. Correlation

The new Diametra Testosterone ELISA kit was compared to the old Diametra Testosterone ELISA kit. Serum samples from 24 females and 28 males were analysed.

The linear regression curve was calculated:

$$Y = 1.13 \cdot X + 0.06$$

$$r^2 = 0.92$$

Diametra Testosterone ELISA kit was compared to another commercially available Testosterone assay. Serum samples of 24 females and 29 males were analysed according in both test systems.

The linear regression curve was calculated:

$$Y = 0.89 \cdot X + 0.24$$

$$r^2 = 0.93$$

11. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

BIBLIOGRAPHY

- Joshi, U. M., et al., Steroids 34 (1) 35 (1979)
- Turkes, A., et al., J Endocrinol. 81 (2) P165 (1979)
- Ismail, A. A., Niswender, G. D. Midgley, A. R., J. Clin. Endocr. Metab. 34, 177 - 184 (1972)
- Rajkowski K.M, Cittanova N, Desfosses B. and Jayle M.F., Steroids 29 no 5 (1977)
- Widsom G. B., Clin. Chem. 22/8, 1243 - 1255 (1976)

Ed. 07/2015

DCM002-12

DiaMetra S.r.l. Headquarter: Via Calabria 15,
20090 SEGRATE (MI) Italy

Tel. +39-02-2139184

Fax +39-02-2133354

Manufactory: Via Pozzuolo 14,
06038 SPELLO (PG) Italy

Tel. +39-0742-24851

Fax +39-0742-316197

E-mail: info@diametra.com



DCM002-12
Ed. 07/2015

TESTOSTERONE ELISA

para análisis de rutina

Determinación inmunoenzimática directa de Testosterone total en suero o plasma humano

IVD



LOT

Ver etiqueta externa

2°C 8°C



$\Sigma = 96$ ensayos

REF DKO002

USO PREVISTO

Método inmunoenzimático colorimétrico competitivo para la determinación cuantitativa de la concentración de Testosterona total en suero y plasma.

El kit Testosterone ELISA está destinado al uso en laboratorio exclusivamente.

1. IMPORTANCIA CLÍNICA

La testosterona (17 β -OH-4-androsteno-3-ona) es una hormona de la familia de los esteroides andrógenos producido principalmente por las células de Leydig localizadas en los testículos y, en pequeña parte, por los ovarios y la corteza adrenal. También está presente en las mujeres que, en comparación con los hombres, tienen una mayor tendencia a convertir esta hormona.

En los hombres después de la pubertad, la testosterona es secretada principalmente por los testículos y otra parte proviene de la conversión periférica de androstenediona.

En el hombre es diputado al desarrollo de los órganos sexuales (diferenciación testicular y todo el aparato genital) y de las características sexuales secundarias, como la barba, la distribución del vello, el timbre de la voz y los músculos. La testosterona, durante la pubertad, también interviene en el desarrollo esquelético, lo que limita el alargamiento de los huesos largos y evitar, de esta forma, un crecimiento desproporcionado de las extremidades. En los adultos, los niveles de testosterona tienen un papel muy importante en cuanto a la sexualidad, el sistema músculo-esquelético, la vitalidad y buena salud (entendida principalmente como protección contra las enfermedades metabólicas como la hipertensión y la diabetes mellitus); ayuda a asegurar la fertilidad, ya que estimula la maduración de espermatozoides en los testículos. Además, influyen en la calidad y cantidad de esperma producido, ya que el trabajo fundamental en las células y en la próstata, los diputados a la producción de esperma. La producción diaria de testosterona en los hombres varía de 5 a 7 miligramos, pero superó 30 años, tiende a disminuir anualmente por 1%.

En las mujeres más del 50% de la testosterona sérica se deriva de la conversión periférica de androstenediona ovario-secreta y de la secreción de testosterona directa por estas glándulas. La mayor

parte de la testosterona circulante se une a la SHBG y una pequeña parte a la albúmina. Sólo una pequeña parte (< 1%) circula como testosterona libre.

Los efectos de la testosterona pueden ser clasificados como anabólicos y sexuales, aunque la distinción es un tanto artificial. Los efectos anabólicos incluyen el desarrollo de masa muscular y fuerza, la resistencia ósea y la densidad ósea y el desarrollo lineal y la maduración. Los efectos sexuales incluyen la maduración sexual de los órganos implicados, engrosamiento de la voz, crecimiento de la barba y el pelo (características sexuales secundarias masculinas).

Los niveles de testosterona disminuyen gradualmente con la edad en los hombres (andropausia). Los síntomas de la andropausia son por lo general asociados con el envejecimiento como la pérdida de masa muscular y disminución de la densidad ósea, disminución de la resistencia física, disminución de la capacidad de almacenamiento y la pérdida de la libido.

En las mujeres de todas las edades, niveles altos de testosterona pueden estar asociados con los tumores suprarrenales y ovarios poliquísticos.

2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

La testosterona en la sangre se une a las SHBG (60%) y, en menor cantidad, a otras proteínas (por ejemplo albúmina).

La testosterona no ligada a proteínas de transporte (<1 % del testosterona total) se define como testosterona libre

La formulación química de este kit permite liberar completamente la testosterona unida a proteínas; por lo tanto el kit Diametra Testosterone permite la medición de la concentración de la Testosterona total (combinado + libre) en la muestra. Si se desea medir la testosterona únicamente la fracción libre, utilícese el kit ELISA Diametra "Free Testosterone" ("Testosterona Libre").

La testosterona (antígeno) de la muestra compete con la testosterona antigénica marcada con peroxidasa de rabano (HRP, Conjugado) por la unión al anticuerpo anti-testosterona adsorbido en la microplaca (fase sólida).

Después de la incubación, la separación de las fracciones libre y unida se obtiene mediante un simple lavado de la fase sólida.

Por último, al reaccionar con el sustrato (H_2O_2) y el sustrato TMB (TMB), la enzima HRP presente en la fracción unida desarrolla una coloración azul que se torna amarilla tras añadir la solución de interrupción (H_2SO_4).

La intensidad del color desarrollado es inversamente proporcional a la concentración de Testosterona en la muestra.

La concentración de Testosterona en la muestra se calcula según una serie de Calibradores.

3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTOS

3.1 Reactivos y materiales incluidos en el kit

1. Calibradores (5 frascos, 1 mL cada uno)

CAL0	REF DCE002/0206-0
CAL1	REF DCE002/0207-0
CAL2	REF DCE002/0208-0
CAL3	REF DCE002/0209-0
CAL4	REF DCE002/0210-0

2. Control (2 frascos, 1 mL cada uno)

Control A	REF DCE045/0203A-0
Control B	REF DCE045/0203B-0

La concentración de los Controles se indica en la Hoja de Control (Certificate of Analysis)

3. Conjugado (1 frasco, 12 mL)

Testosterona conjugado con peroxidasa de rábano (HRP)

REF DCE002/0202-0

4. Microplaca recubierta (1 microplaca divisible)

Anticuerpos anti Testosterona absorbido en la microplaca

REF DCE002/0203-0

5. Sustrato TMB (1 frasco, 15 mL)

H_2O_2 -TMB (0,26 g/L) (evítese el contacto con la piel)

REF DCE004-0

6. Solución de parada (1 frasco, 15 mL)

Ácido sulfúrico 0,15 mol/L (evítese el contacto con la piel)

REF DCE005-0

7. Solución de lavado conc.10X (1 frasco, 50 mL)

Tampón fosfato 0,2M pH 7.4

REF DCE054-0

3.2 Reactivos necesarios no incluidos en el kit

Agua destilada

3.3 Material e instrumental auxiliar

Dispensadores automáticos

Lector de microplacas (450 nm, 620-630 nm).

Notas

Conservar los reactivos a oscuras, a temperatura entre 2 y 8°C.

Llevar a temperatura ambiente la bolsa del reactivo 4 (microplaca recubierta) antes de abrirla; cerrarla de inmediato después de sacar las tiras que se han de utilizar; una vez abierto, se mantiene estable hasta la fecha de caducidad indicada en el kit.

4. ADVERTENCIAS

- Este kit de ensayo está previsto para usarse in vitro y por personal experto. No es para uso interno o externo en humanos o animales.
- Usar los equipos de protección individual previstos al trabajar con los reactivos suministrados.
- Siga las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) en el manejo de las muestras sanguíneas y sus derivados.
- Todos los reactivos de origen humano usados en la preparación de los reactivos se han comprobado y han resultado negativos para la presencia de anticuerpos anti-VIH, para HbsAg y para anticuerpos anti-VHC. Sin embargo, ningún ensayo ofrece seguridad absoluta de la ausencia de VIH, VHB, VHC o de otros agentes infecciosos. Por lo tanto, los Calibradores y los Controles deben manipularse como material potencialmente infeccioso.
- Materiales de origen animal utilizadas para la elaboración de este kit se obtuvieron a partir de animales sanos y de las proteínas de bovino se obtuvieron de los países no afectados por la EEB, pero estos materiales se debe utilizar como potencialmente infecciosos.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Azida de Sodio (NaN_3) o Proclin 300^R como conservante. Evite el contacto con la piel y las mucosas.
- La Azida de Sodio, usada como conservante, puede ser tóxica si se ingiere o se absorbe a través de la piel o de los ojos; además, puede reaccionar con las tuberías de plomo o cobre formando azidas metálicas potencialmente explosivas. Dejar que corra gran cantidad de agua, si se usa un lavabo para eliminar los reactivos, para prevenir la formación de azidas.
- El cromógeno TMB contiene un irritante que puede ser dañino si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para prevenir lesiones, evitar la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y con los ojos.
- La solución de interrupción está formada por una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo, y puede ser tóxico si se ingiere. Para prevenir posibles quemaduras químicas, evitar el contacto con la piel y con los ojos.
- Evite la exposición de los reactivos TMB/ H_2O_2 a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.
- Este método permite la determinación de testosterona de 0,2 ng/mL hasta 16 ng/mL.
- La administración de esteroides naturales o sintéticos, pueden alterar los niveles de testosterona en sangre.

5. PRECAUCIONES

- Respetar rigurosamente la secuencia de los pasos indicados en este protocolo. Los resultados aquí presentados se han obtenido utilizando los reactivos específicos que figuran en estas instrucciones de uso.
- Todos los reactivos deben conservarse a una temperatura controlada de 2-8°C en sus

recipientes originales. Todas las excepciones están claramente marcadas. Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad cuando se almacenan y manipulan de acuerdo con las instrucciones proporcionadas.

- Antes del uso, esperar hasta que todos los componentes del kit y las muestras se encuentren a temperatura ambiente (22-28 °C) y mezclar cuidadosamente.
- No mezclar componentes de kits de lotes distintos. Se debe observar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja y de todas las ampollas. No usar componentes después de la fecha de caducidad.
- Si utiliza un equipo automático, es responsabilidad del usuario asegurar que la metodología aplicada haya sido debidamente validada.
- Un lavado incompleto o impreciso y la aspiración insuficiente del líquido de los micropozos ELISA pueden causar una precisión pobre y/o un elevado fondo. Para mejorar el rendimiento del kit en los sistemas automatizados, se recomienda aumentar el número de lavados.
- Para la reproducibilidad de los resultados, es importante que el tiempo de reacción sea igual para cada pocillo. El tiempo de dispensación de los pocillos no debe superar los 10 minutos; si se prolongara más allá de los 10 minutos, respétese el orden de dispensación. Si utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva de calibración en cada plato.
- Al añadir el sustrato TMB inicia una reacción cinética que termina al agregar la solución de interrupción. Tanto el sustrato como la solución de interrupción deben agregarse en la misma secuencia para evitar diferentes tiempos de reacción.
- Observar las directrices para la ejecución del control de calidad en los laboratorios clínicos al comprobar controles y/o pool de sueros.
- Observar la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- No use muestras con contaminación microbiana, altamente lipémicas o hemolizadas.
- Los lectores de microplacas leen las DO verticalmente, por tanto no debe tocarse el fondo de los pocillos.

6. PROCEDIMIENTO

6.1 Preparación de los Calibradores (C₀...C₄)

Los Calibradores son listo para usar y tienen las siguientes concentraciones:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
ng/mL	0	0,2	1,0	4,0	16,0

Una vez abiertos, los calibradores permanecen estables 6 meses conservados a 2-8 °C.

6.2 Preparación del Conjugado

Listo para usar. Mezclar suavemente durante 5 minutos en un agitador rotatorio.

Desde la apertura de la botella es estable 6 meses a 2-8 °C.

6.3 Preparación de la muestra

La determinación de testosterona se puede realizar en el plasma o suero humano.

Si la dosis no se llevó a cabo el mismo día de la recolección, mantener la muestra a -20 °C. Se recomienda no congelar y descongelar repetidamente las muestras.

Los Controles están listos para usar.

6.4 Preparación de la solución de lavado

Antes del uso, diluir el contenido del frasco de la "Solución de lavado conc. 10X" con agua destilada hasta un volumen de 500 mL. Para preparar volúmenes menores, respetar la relación de dilución de 1:10. La solución de lavado diluida se mantiene estable a 2-8 °C durante al menos 30 días.

En la solución de lavado concentrada es posible observar la presencia de cristales. En ese caso, agitar a temperatura ambiente hasta que los cristales se disuelvan por completo. Para una mayor precisión, diluir todo el frasco de la solución de lavado concentrada en 500 mL teniendo cuidado para transferir también los cristales y, a continuación, agitar hasta que se disuelvan por completo.

6.5 Procedimiento

- **Esperar hasta que todos los reactivos se encuentren a temperatura ambiente (22-28 °C) durante al menos 30 minutos.** Al final del ensayo inmediatamente poner todos los reactivos a 2-8 °C para evitar largos periodos a temperatura ambiente.
- Las tiras de pocillos no utilizados se deben guardar de inmediato en la bolsa desechable que contiene desecantes y almacenarse a 2-8 °C.
- Para evitar la contaminación microbiana y/o química no regrese porciones de reactivos no usados en los viales originales.
- Para aumentar la precisión de los resultados de la prueba es necesario trabajar en duplicado: preparar dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (C₀-C₄), dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

Reactivo	Calibrador	Muestra/ Control	Blanco
Muestra/ Control		25 µL	
Calibrador C ₀ -C ₄	25 µL		
Conjugado	100 µL	100 µL	

Incubar 1 h a 37 °C.

Retirar la mezcla de reacción. Lave los pozos 3 veces con 0,3 mL de solución de lavado diluida.

Nota importante: agite suavemente la placa durante 5 segundos en cada paso del lavado. Después del último lavado asegúrese haber eliminado completamente la solución de lavado de los pozos, invierta la placa y golpéela repetidas veces contra una servilleta de papel absorbente.

Lavados automático: si está utilizando una lavadora automática, hacer 6 lavados.

Substrato TMB	100 µL	100 µL	100 µL
Incubar 15 minutos a temperatura ambiente (22±28 °C), protegida de la luz.			
Solución de parada	100 µL	100 µL	100 µL
Agitar suavemente la placa. Leer la absorbancia (E) a 450 nm frente una segunda lectura de referencia a 620-630 nm o frente al blanco entre 5 minutos.			

7. CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe analizar sueros control para los rangos bajo, medio y alto de testosterona para supervisar el rendimiento del análisis. Estas muestras deben tratarse como desconocidas y los valores deben determinarse en cada ensayo realizado. Se deben mantener los gráficos de control de calidad para seguir el rendimiento de los reactivos suministrados. Se deben emplear métodos estadísticos adecuados para determinar las tendencias. El laboratorio debe establecer los límites de aceptabilidad del rendimiento del análisis. Entre otros parámetros que se deben controlar, se incluyen las intersecciones de 80, 50 y 20% de la curva de calibración para evaluar la reproducibilidad. Además, la capacidad de absorción máxima debe ser constante con la experiencia anterior. Una desviación significativa del rendimiento establecido puede indicar un cambio inadvertido en las condiciones experimentales o la degradación de los reactivos del kit. Se deben usar reactivos frescos para determinar la causa de las variaciones.

8. RESULTADOS

8.1 Absorbancia media

Calcular la extinción media (E_m) de cada punto de la curva de calibración (C_0 - C_4) y de cada muestra.

8.2 Curva de calibración

Trazar el gráfico de la absorbancia en función de las concentraciones de los calibradores (C_0 - C_4). Trazar la curva de ajuste óptimo para los puntos de calibración (p. ej.: Logística de cuatro parámetros).

8.3 Cálculo de los resultados

Interpolar del gráfico los valores de absorbancia relativos a cada muestra y leer la concentración correspondiente en ng/mL.

9. VALORES DE REFERENCIA

Las concentraciones de testosterona en suero están incluidas en los siguientes intervalos:

	n° sueros	Media ng/mL	Rango ng/mL
Hombres (edad)			
< 12	16	< 0,10	< 0,10 - 1,01
12 - 18	16	5,02	0,56 - 8,63
19 - 55	16	3,54	2,12 - 6,01
> 55	16	1,51	0,11 - 7,25
Mujeres (edad)			
< 12	16	< 0,10	< 0,10 - 0,16
12 - 18	15	0,23	< 0,10 - 0,63
19 - 55	16	0,20	< 0,10 - 0,63
> 55	16	0,13	< 0,10 - 0,32

Es importante señalar que la determinación de un rango de valores esperados en un método dado para una población "normal" depende de muchos factores, tales como la especificidad y sensibilidad del método en uso, y la población en estudio. Por lo tanto, cada laboratorio debe considerar el intervalo especificado por el fabricante como una guía general y producir su propio rango de valores calculados en base al estadístico obtenido por el laboratorio, donde reside la población local.

10. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

10.1 Precisión

10.1.1 Intra ensayo

La variabilidad dentro del mismo kit se determinó repitiendo (16x) tres niveles diferentes de sueros de control. La variabilidad dentro del ensayo es $\leq 7,0\%$.

10.1.2 Entre ensayos

La variabilidad entre kits diferentes se determinó repitiendo (9x) tres niveles diferentes de suero de control con dos kit de lotes diferentes. La variabilidad entre ensayos es $\leq 8,3\%$.

10.2 Especificidad

El anticuerpo empleado presenta las siguientes reacciones cruzadas, calculadas al 50% según el método de Abraham:

Testosterona	100%
Dihydrotestosterona	2,03%
Androstenediona	0,01%
Androsterona	0,05%
DHEA-S	0%
Cortisol	0,01%
Cortisona	0%
17β Estradiol	0,16%
Prednisona	0%
Estrona	0,01%

10.3 Exactitud

La prueba de recuperación realizada en muestras enriquecidas con 0,4 - 0,8 - 4,0 - 14,0 ng/mL de testosterona ha dado un valor medio de 98,9%.

La prueba de dilución conducta en tres muestras diluidas 4 veces dió una media de 99,7%.

10.4 Sensibilidad

La concentración mínima de Testosterone detectable que puede distinguirse del Calibrador cero es de 0,10 ng/mL con un límite de confianza del 95%.

10.5 Correlación

El kit Testosterone ELISA Diametra se ha comparado con el kit Diametra Testosterone ELISA del método anterior. Se analizaron muestras de suero de 24 mujeres y 28 hombres.

La curva de regresión es la siguiente:

$$Y = 1,13 \cdot X + 0,06$$

$$r^2 = 0,92$$

El kit Testosterona ELISA Diametra fue comparado con otro ensayo comercial de Testosterona. Se analizaron muestras de suero de 24 mujeres y 29 hombres.

Se calculó la curva de regresión lineal:

$$Y = 0,89 \cdot X + 0,24$$

$$r^2 = 0,93$$

11. INDICACIONES PARA LA ELIMINACIÓN

Eliminar los reactivos conforme con la normativa local sobre la materia.

BIBLIOGRAFÍA

- Joshi, U. M., et al., Steroids 34 (1) 35 (1979)
- Turkes, A., et al., J Endocrinol. 81 (2) P165 (1979)
- Ismail, A. A., Niswender, G. D. Midgley, A. R., J. Clin. Endocr. Metab. 34, 177 - 184 (1972)
- Rajkowski K.M, Cittanova N, Desfosses B. and Jayle M.F., Steroids 29 no 5 (1977)
- Widsdom G. B., Clin. Chem. 22/8, 1243 - 1255 (1976)

Ed. 07/2015

DCM002-12

DiaMetra S.r.l. Headquater: Via Calabria 15,
20090 SEGRATE (MI) Italy

Tel. +39-02-2139184

Fax +39-02-2133354

Manufactory: Via Pozzuolo 14,
06038 SPELLO (PG) Italy

Tel. +39-0742-24851

Fax +39-0742-316197

E-mail: info@diametra.com

	DE ES FR GB IT PT	In vitro Diagnostikum Producto sanitario para diagnóstico In vitro Dispositif medical de diagnostic in vitro In vitro Diagnostic Medical Device Dispositivo medico-diagnostico in vitro Dispositivos medicos de diagnostico in vitro		DE ES FR GB IT PT	Hergestellt von Elaborado por Fabriqué par Manufacturer Produttore Produzido por
	DE ES FR GB IT PT	Achtung, Begleitdokumente Precaución, consulte los documentos adjuntos Attention, veuillez consulter les documents d'accompagnement Caution, consult accompanying documents Attenzione, consultare la documentazione allegata Atenção, consultar os documentos de acompanhamento	 yyyy-mm	DE ES FR GB IT PT	Herstellungs datum Fecha de fabricacion Date de fabrication Date of manufacture Data di produzione Data de produção
 yyyy-mm-dd	DE ES FR GB IT PT	Verwendbar bis Establa hasta (usar antes de último día del mes) Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) Use by (last day of the month) Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) Utilizar (antes ultimo dia do mês)		DE ES FR GB IT PT	Biogefährdung Riesco biológico Risque biologique Biological risk Rischio biologico Risco biológico
	DE ES FR GB IT PT	Gebrauchsanweisung beachten Consultar las instrucciones Consulter le mode d'emploi Consult instructions for use Consultare le istruzioni per l'uso Consultar instruções para uso	LOT	DE ES FR GB IT PT	Chargenbezeichnung Codigo de lote Numero de lot Batch code Codice del lotto Codigo do lote
 $\Sigma = xx$	DE ES FR GB IT PT	Ausreichend für "n" Tests Contenido suficiente para "n" tests Contenu suffisant pour "n" tests Contains sufficient for "n" tests Contenuto sufficiente per "n" saggi Contém o suficiente para "n" testes	CONT	DE ES FR GB IT PT	Inhalt Contenido del estuche Contenu du coffret Contents of kit Contenuto del kit Conteúdo do kit
 Max Min	DE ES FR GB IT PT	Temperaturbereich Límitación de temperatura Limites de température de conservation Temperature limitation Limiti di temperatura Temperaturas limites de conservação	REF	DE ES FR GB IT PT	Bestellnummer Número de catálogo Références du catalogue Catalogue number Numero di Catalogo Número do catálogo
	DE ES FR GB IT PT	Vor direkter Sonneneinstrahlung schützen Mantener alejado de la luz solar Tenir à l'écart de la lumière du soleil Keep away from sunlight Tenere lontano dalla luce solare Mantenha longe da luz solar			

SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI/TROUBLESHOOTING**ERRORE CAUSE POSSIBILI/ SUGGERIMENTI****Nessuna reazione colorimetrica del saggio**

- mancata dispensazione del coniugato
- contaminazione del coniugato e/o del Substrato
- errori nell'esecuzione del saggio (es. Dispensazione accidentale dei reagenti in sequenza errata o provenienti da flaconi sbagliati, etc.)

Reazione troppo blanda (OD troppo basse)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo breve, temperatura di incubazione troppa bassa

Reazione troppo intensa (OD troppo alte)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo lungo, temperatura di incubazione troppa alta
- qualità scadente dell'acqua usata per la soluzione di lavaggio (basso grado di deionizzazione,)
- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

Valori inspiegabilmente fuori scala

- contaminazione di pipette, puntali o contenitori- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

CV% intrasaggio elevato

- reagenti e/o strip non portate a temperatura ambiente prima dell'uso
- il lavatore per micropiastre non lava correttamente (suggerimento: pulire la testa del lavatore)

CV% intersaggio elevato

- condizioni di incubazione non costanti (tempo o temperatura)
- controlli e campioni non dispensati allo stesso tempo (con gli stessi intervalli) (controllare la sequenza di dispensazione)
- variabilità intrinseca degli operatori

ERROR POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS**No colorimetric reaction**

- no conjugate pipetted reaction after addition
- contamination of conjugates and/or of substrate
- errors in performing the assay procedure (e.g. accidental pipetting of reagents in a wrong sequence or from the wrong vial, etc.)

Too low reaction (too low ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too short, incubation temperature too low

Too high reaction (too high ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too long, incubation temperature too high
- water quality for wash buffer insufficient (low grade of deionization)
- insufficient washing (conjugates not properly removed)

Unexplainable outliers

- contamination of pipettes, tips or containers
- insufficient washing (conjugates not properly removed) too high within-run
- reagents and/or strips not pre-warmed to CV% Room Temperature prior to use
- plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)
- too high between-run - incubation conditions not constant (time, CV % temperature)
- controls and samples not dispensed at the same time (with the same intervals) (check pipetting order)
- person-related variation

ERROR / POSIBLES CAUSAS / SUGERENCIAS**No se produce ninguna reacción colorimétrica del ensayo**

- no se ha dispensado el conjugado
- contaminación del conjugado y/o del sustrato
- errores en la ejecución del ensayo (p. ej., dispensación accidental de los reactivos en orden incorrecto o procedentes de frascos equivocados, etc.)

Reacción escasa (DO demasiado bajas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado corto, temperatura de incubación demasiado baja

Reacción demasiado intensa (DO demasiado altas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado largo, temperatura de incubación demasiado alta
- calidad escasa del agua usada para la solución de lavado (bajo grado de desionización)
- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

Valores inexplicablemente fuera de escala

- contaminación de pipetas, puntas o contenedores- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

CV% intraensayo elevado

- los reactivos y/o tiras no se encontraban a temperatura ambiente antes del uso
- el lavador de microplacas no funciona correctamente (sugerencia: limpiar el cabezal del lavador)

CV% interensayo elevado

- condiciones de incubación no constantes (tiempo o temperatura)
- controles y muestras no dispensados al mismo tiempo (con los mismos intervalos) (controlar la secuencia de dispensación)
- variación en función de los operadores

ERREUR CAUSES POSSIBLES / SUGGESTIONS**Aucune réaction colorimétrique de l'essai**

- non distribution du conjugué
- contamination du conjugué et/ou du substrat
- erreurs dans l'exécution du dosage (par ex., distribution accidentelle des réactifs dans le mauvais ordre ou en provenance des mauvais flacons, etc.)

Réaction trop faible (DO trop basse)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop court, température d'incubation trop basse

Réaction trop intense (DO trop élevée)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop long, température d'incubation trop élevée
- mauvaise qualité de l'eau utilisée pour la solution de lavage (bas degré de déionisation)
- lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

Valeurs inexplicablement hors plage

- contamination des pipettes, embouts ou récipients - lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

CV% intra-essai élevé

- les réactifs et/ou les bandes n'ont pas atteint la température ambiante avant usage
- le laveur de microplaques ne lave pas correctement (suggestion : nettoyer la tête du laveur)

CV% inter-essai élevé

- conditions d'incubation non constantes (temps ou température)
- contrôles et échantillons non distribués en même temps (avec les mêmes intervalles) (contrôler l'ordre de distribution)
- variabilité intrinsèque des opérateurs