



Instructions for Use

Salivary Testosterone ELISA

IVD



REF SLV-3013

Σ 96



DRG 

DRG Instruments GmbH, Germany
Frauenbergstraße. 18, D-35039 Marburg
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50
Website: www.drg-diagnostics.de
E-mail: drg@drg-diagnostics.de

Distributed by:

DRG 

DRG International, Inc., USA
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556
Website: www.drg-international.com
E-mail: corp@drg-international.com

**Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.
Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.
Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.**

Table of Contents / Inhaltsverzeichnis / Tabella die Contenuti / Tabla de Contenidos / Sommaire

1	INTRODUCTION	2	1	INTRODUCCIÓN	26
2	PRINCIPLE OF THE TEST	2	2	FUNDAMENTO DEL ENSAYO	26
3	WARNINGS AND PRECAUTIONS	3	3	PRECAUCIONES	26
4	REAGENTS.....	4	4	COMPONENTES DEL KIT.....	27
5	SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION.....	5	5	MUESTRAS	28
6	ASSAY PROCEDURE.....	5	6	PROCEDIMIENTO DE ENSAYO	28
7	EXPECTED NORMAL VALUES.....	7	7	VALORES ESPERADOS	30
8	QUALITY CONTROL.....	7	8	CONTROL DE CALIDAD	30
9	PERFORMANCE CHARACTERISTICS.....	8	9	CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO.....	31
10	LIMITATIONS OF USE.....	10	10	LIMITACIONES DE USO	31
11	LEGAL ASPECTS	11	11	ASPECTOS LEGALES	32
1	EINLEITUNG	12	12	REFERENCES / LITERATURE	33
2	TESTPRINZIP	12		SYMBOLS USED.....	34
3	VORSICHTSMAßNAHMEN.....	12			
4	BESTANDTEILE DES KITS	13			
5	PROBENVORBEREITUNG.....	14			
6	TESTDURCHFÜHRUNG	14			
7	ERWARTETE WERTE	16			
8	QUALITÄTSKONTROLLE	16			
9	ASSAY-CHARAKTERISTIKA.....	17			
10	GRENZEN DES TESTS	17			
11	RECHTLICHE GRUNDLAGEN	18			
1	INTRODUZIONE	19			
2	PRINCIPIO DEL TEST	19			
3	PRECAUZIONI.....	19			
4	COMPONENTI DEL KIT.....	20			
5	CAMPIONI.....	21			
6	ATTUAZIONE DEL TEST.....	21			
7	VALORI NORMALI	23			
8	CONTROLLO QUALITÀ.....	23			
9	CARATTERISTICHE DEL TEST.....	24			
10	LIMITAZIONE DEL TEST.....	24			
11	ASPETTI LEGALI	25			

1 INTRODUCTION

1.1 Intended Use

The **Salivary Testosterone ELISA** is an enzyme immunoassay for the quantitative *in vitro diagnostic* measurement of free active testosterone in saliva.

Measurement of testosterone is used in the diagnosis and treatment of disorders involving the male sex hormones (androgens), including primary and secondary hypogonadism, delayed or precocious puberty, impotence in males and, in females hirsutism (excessive hair) and virilization (masculinization) due to tumors, polycystic ovaries, and adrenogenital syndromes.

1.2 Summary and Explanation

Testosterone is the major androgenic steroid hormone. It is responsible for the development of the male external genitalia and secondary sexual characteristics. In females, its main role is as an estrogen precursor. In both genders, it also exerts anabolic effects and influences behavior.

In men, testosterone is secreted by the testicular Leydig cells and, to a minor extent, by the adrenal cortex. At puberty, testosterone increases dramatically in boys and progressively declines starting between the fourth and sixth decades of life. In premenopausal women, the ovaries are the main source of testosterone with minor contributions by the adrenals and peripheral tissues. After menopause, ovarian testosterone production is significantly diminished.

Testosterone production in testes and ovaries is regulated via pituitary-gonadal feedback involving luteinizing hormone (LH) and, to a lesser degree, inhibins and activins. 40-50% of the total testosterone in blood is bound with high affinity to sex hormone-binding globulin (SHBG), while 40-50% is bound with low affinity to albumin, and only 1-2% can be detected as unbound or free testosterone.

During childhood, excessive production of testosterone induces premature puberty in boys and masculinization in girls. In adult women, excess testosterone production results in varying degrees of virilization, including hirsutism, acne, oligo-amenorrhea. Furthermore, it can cause polycystic ovaries, ovarian and adrenal tumors, adrenal hyperplasia and infertility. In men, mild-to-moderate testosterone elevations are usually asymptomatic while high levels of testosterone are associated with hypothalamic-pituitary-unit dysfunction, testicular tumors, congenital adrenal hyperplasia and prostate cancer.

Decreased testosterone in females causes subtle symptoms. These may include some decline in libido and nonspecific mood changes. In males, testosterone levels below the reference range indicate partial or complete hypogonadism, caused either by primary or secondary/tertiary (pituitary/hypothalamic) testicular failure. Low levels of testosterone are encountered in male patients with the following diseases: Klinefelter's syndrome, hypopituitarism, testicular feminization, orchidectomy, cryptorchidism, enzymatic defects and some autoimmune diseases.

2 PRINCIPLE OF THE TEST

The **Salivary Testosterone ELISA** Kit is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), based on the principle of competitive binding.

The microtiter wells are coated with a monoclonal (mouse) antibody directed towards an antigenic site of the testosterone molecule. Endogenous free testosterone present in a patient sample competes with a testosterone-horseradish peroxidase conjugate for binding to the coated antibody. After incubation the unbound conjugate is washed off.

The amount of bound peroxidase conjugate is inversely proportional to the concentration of testosterone in the sample. After addition of the substrate solution, the intensity of colour developed is inversely proportional to the concentration of testosterone in the patient sample.

3 WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. This kit is for in vitro diagnostic use only. For professional use only.
2. All reagents of this test kit which contain human serum or plasma have been tested and confirmed negative for HIV I/II, HBsAg and HCV by FDA approved procedures. All reagents, however, should be treated as potential biohazards in use and for disposal.
3. Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of instructions for use provided with the kit. Be sure that everything is understood.
4. The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 °C to 8 °C in the sealed foil pouch and used in the frame provided.
5. Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step.
6. Use reservoirs only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing a substrate solution that had previously been used for the conjugate solution may turn solution colored. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur.
7. Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells.
8. Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.
9. Allow the reagents to reach room temperature (21 °C to 26 °C) before starting the test. Temperature will affect the absorbance readings of the assay. However, values for the patient samples will not be affected.
10. Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and specimens with skin and mucous membranes.
11. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.
12. Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents or specimens may give false results.
13. Handling should be done in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.
14. Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
15. All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiterplate readers.
16. Do not mix or use components from kits with different lot numbers. It is advised not to exchange wells of different plates even of the same lot. The kits may have been shipped or stored under different conditions and the binding characteristics of the plates may result slightly different.
17. Avoid contact with *Stop Solution* containing 0.5 M H₂SO₄. It may cause skin irritation and burns.
18. Some reagents contain Proclin 300, BND and/or MIT as preservatives. In case of contact with eyes or skin, flush immediately with water.
19. TMB substrate has an irritant effect on skin and mucosa. In case of possible contact, wash eyes with an abundant volume of water and skin with soap and abundant water. Wash contaminated objects before reusing them. If inhaled, take the person to open air.
20. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guideline or regulation.
21. For information on hazardous substances included in the kit please refer to Safety Data Sheets. Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from DRG.

4 REAGENTS

4.1 Reagents provided

1. **Microtiterwells**, 12 x 8 (break apart) strips, 96 wells;
Wells coated with anti-testosterone antibody (monoclonal).
2. **Standard (Standard 0 - 6)**, 7 vials, 1 mL, ready to use;
Concentrations: 0 – 10 – 40 – 80 – 160 – 400 – 1000 pg/mL
Conversion: $\text{pg/mL} \times 3.47 = \text{pmol/L}$
Standards are calibrated against mass spectrometry.
Contain non-mercury preservative.
3. **Control Low & High**, 2 vials, 1 mL each, ready to use;
For control values and ranges please refer to vial label or QC-Datasheet.
Contain non-mercury preservative.
4. **Enzyme Conjugate**, 1 vial, 14 mL, ready to use,
Testosterone conjugated to horseradish peroxidase;
Contains non-mercury preservative.
5. **Substrate Solution**, 1 vial, 25 mL, ready to use,
Tetramethylbenzidine (TMB).
6. **Stop Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use,
contains 0.5 M H₂SO₄,
Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.
7. **Wash Solution**, 1 vial, 30 mL (40X concentrated),
See "Reagent Preparation".

Note: Additional *Standard 0* for sample dilution is available upon request.

4.2 Materials required but not provided

- A microtiter plate calibrated reader ($450 \pm 10 \text{ nm}$)
- Calibrated variable precision micropipettes (100 μL and 200 μL)
- Absorbent paper
- Distilled or deionized water
- Timer (60 min. range)
- Semi logarithmic graph paper or software for data reduction

4.3 Storage Conditions

When stored at 2 °C - 8 °C unopened reagents will retain reactivity until expiration date. Do not use reagents beyond this date.

Opened reagents must be stored at 2 °C - 8 °C. Microtiter wells must be stored at 2 °C - 8 °C. Once the foil bag has been opened, care should be taken to close it tightly again.

Opened kits retain activity for two months if stored as described above.

4.4 Reagent Preparation

Bring all reagents and required number of strips to room temperature prior to use.

Wash Solution

Add deionized water to the 40X concentrated Wash Solution.

Dilute 30 mL of concentrated *Wash Solution* with 1170 mL deionized water to a final volume of 1200 mL.

The diluted Wash Solution is stable for 2 weeks at room temperature.

4.5 Disposal of the Kit

The disposal of the kit must be made according to the national regulations. Special information for this product is given in the Safety Data Sheet.

4.6 Damaged Test Kits

In case of any severe damage to the test kit or components, DRG has to be informed in writing, at the latest, one week after receiving the kit. Severely damaged single components should not be used for a test run. They have to be stored until a final solution has been found. After this, they should be disposed according to the official regulations.

5 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Eating, drinking, chewing gums or brushing teeth should be avoided for 30 minutes before sampling. Otherwise, it is recommended to rinse mouth thoroughly with cold water 5 minutes prior to sampling.

Do not collect samples when oral diseases, inflammation or lesions exist (blood contamination).

If there is visible blood contamination the patient specimen, it should be discarded, rinse the sampling device with water, wait for 10 minutes and take a new sample.

Note: Samples containing sodium azide should not be used in the assay.

5.1 Specimen Collection

Saliva samples should be collected only using special saliva sampling devices (vial and straw), e.g. SALI-TUBES 100 [REF] SLV-4158, available from DRG.

Do not use Salivette tubes for sampling.

Due to the cyclic secretion pattern of steroid hormones it is important to care for a proper timing of the sampling.

In order to avoid arbitrary results we recommend that 5 samples always be taken within a period of 2 – 3 hours (*multiple sampling*) preferably before a meal.

As food might contain significant amounts of steroid hormones samples preferably should be taken while fasting. If fasting should be a problem the collection period should be timed just before lunch or before dinner.

5.2 Specimen Storage and Preparation

The saliva samples may be stored at 2 °C to 8 °C up to one week, and should be frozen at -20 °C for longer periods; repeated thawing and freezing is no problem.

Each sample has to be frozen, thawed, and centrifuged at least once in order to separate the mucins by centrifugation.

Upon arrival of the samples in the lab the samples have to stay in the deep freeze at least overnight. Next morning the frozen samples are warmed up to room temperature and mixed carefully.

Then the samples have to be centrifuged for 5 to 10 minutes (at 3000 - 2000 × g).

Now the clear colorless supernatant is easy to pipette.

If a set of multiple samples is to be tested, the lab (after at least one freezing, thawing, and centrifugation cycle) has to mix the 5 single samples in a separate sampling device and perform the testing from this mixture.

5.3 Specimen Dilution

If in an initial assay, a specimen is found to contain more than the highest standard, the specimens can be diluted with *Standard 0* and re-assayed as described in Assay Procedure.

For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

Example:

a) Dilution 1:10: 10 µl saliva + 90 µL *Standard 0* (mix thoroughly)

b) Dilution 1:100: 10 µl of dilution a) + 90 µL *Standard 0* (mix thoroughly).

6 ASSAY PROCEDURE

6.1 General Remarks

- All reagents and specimens must be allowed to come to room temperature before use. All reagents must be mixed without foaming.
- Once the test has been started, all steps should be completed without interruption.
- Use new disposal plastic pipette tips for each standard, control or sample in order to avoid cross contamination.
- Absorbance is a function of the incubation time and temperature. Before starting the assay, it is recommended that all reagents are ready, caps removed, all needed wells secured in holder, etc. This will ensure equal elapsed time for each pipetting step without interruption.
- As a general rule the enzymatic reaction is linearly proportional to time and temperature.

6.2 Test Procedure

Each run must include a standard curve.

The assay should be performed at room temperature (21 °C to 24 °C). Lower temperatures will lead to clearly decreased OD values.

1. Secure the desired number of Microtiter wells in the frame holder.
2. Dispense **75 µL** of each **Standard, Control** and **samples** with new disposable tips into appropriate wells.
3. Dispense **100 µL Enzyme Conjugate** into each well.
Thoroughly mix for 10 seconds. It is important to have a complete mixing in this step.
4. Incubate for **60 minutes** at room temperature.
5. Briskly shake out the contents of the wells.
Rinse the wells **5 times** with diluted *Wash Solution* (400 µL per well). Strike the inverted wells sharply on absorbent paper towel to remove residual droplets.
Important note:
The sensitivity and precision of this assay is markedly influenced by the correct performance of the washing procedure!
6. Add **200 µL** of **Substrate Solution** to each well.
7. Incubate for **30 minutes** at room temperature.
8. Stop the enzymatic reaction by adding **100 µL** of **Stop Solution** to each well.
9. Determine the absorbance (OD) of each well at **450 ± 10 nm** with a microtiter plate reader.
It is recommended that the wells be read **within 10 minutes** after adding the *Stop Solution*.

6.3 Calculation of Results

1. Calculate the average absorbance values for each set of standards, controls and patient samples.
2. Using semi-logarithmic graph paper, construct a standard curve by plotting the mean absorbance obtained from each standard against its concentration with absorbance value on the vertical (Y) axis and concentration on the horizontal (X) axis.
3. Using the mean absorbance value for each sample determine the corresponding concentration from the standard curve.
4. Automated method: The results in the Instructions for Use have been calculated automatically using a 4-Parameter curve fit. (4 Parameter Rodbard or 4 Parameter Marquardt are the preferred methods.) Other data reduction functions may give slightly different results.
5. The concentration of the samples can be read directly from this standard curve. Samples with concentrations higher than that of the highest standard have to be further diluted or reported as > 1000 pg/mL. For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

6.3.1 Example of Typical Standard Curve

The following data is for demonstration only and **cannot** be used in place of data generations at the time of assay.

Standard	Optical Units (450 nm)
Standard 0 (0 pg/mL)	1.95
Standard 1 (10 pg/mL)	1.75
Standard 2 (40 pg/mL)	1.48
Standard 3 (80 pg/mL)	1.15
Standard 4 (160 pg/mL)	0.80
Standard 5 (400 pg/mL)	0.43
Standard 6 (1000 pg/mL)	0.15

7 EXPECTED NORMAL VALUES

It is strongly recommended that each laboratory should determine its own normal and abnormal values.

In order to determine the normal range of Salivary Testosterone, saliva samples from apparently healthy subjects were collected in the morning and analyzed using the Salivary Testosterone ELISA kit.

The following range was calculated from this study.

Table 1:

Population	n	Age (years)	Mean (pg/mL)	Median (pg/mL)	2.5 th - 97.5 th Percentile (pg/mL)	Range (Min. - Max.) (pg/mL)
Males	174	13 - 71	71.5	64.1	10.0 - 169.7	6.1 - 230.9
Females	67	15 - 73	19.8	18.9	3.5 - 44.9	3.1 - 50.2

Table 2:

Population	n	Age (years)	Mean (pg/mL)	Median (pg/mL)	2.5 th - 97.5 th Percentile (pg/mL)	Range (Min. - Max.) (pg/mL)
Males	8	14	30.7	19.6	13.8 - 59.0	13.5 - 59.02
	22	15	47.3	43.8	12.0 - 125.5	8.23 - 131.1
	10	16	69.9	68.9	7.5 - 152.3	6.1 - 167.8
	14	17	100.3	113.4	54.1 - 157.3	53.7 - 170.6
	12	18	125.1	135.0	61.3 - 209.7	53.7 - 230.9
	5	19	95.5	87.2	50.8 - 156.1	46.8 - 162.9
	15	21 - 25	96.4	93.3	56.1 - 168.1	52.9 - 186.5
	4	26 - 30	96.7	81.6	70.1 - 148.9	69.9 - 153.7
	2	31 - 35	74.7	74.7	54.4 - 95.0	53.3 - 96.1
	5	36 - 40	81.8	80.2	48.9 - 118.4	45.8 - 122.2
	12	46 - 50	64.3	56.8	28.6 - 127.4	23.03 - 127.4
	12	51 - 55	61.1	72.4	28.1 - 81.4	28.1 - 81.4
	4	56 - 60	79.7	79.7	68.5 - 90.8	68.5 - 90.8

The results alone should not be the only reason for any therapeutic consequences. The results should be correlated to other clinical observations and diagnostic tests.

Since testosterone levels show diurnal cycles, we recommend that the samples be obtained the same hour each day. Furthermore, we recommend that each laboratory determine its own range for the population tested.

8 QUALITY CONTROL

Good laboratory practice requires that controls be run with each calibration curve. A statistically significant number of controls should be assayed to establish mean values and acceptable ranges to assure proper performance.

It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results. Use controls at both normal and pathological levels.

The controls and the corresponding results of the QC-Laboratory are stated in the QC certificate added to the kit. The values and ranges stated on the QC sheet always refer to the current kit lot and should be used for direct comparison of the results.

It is also recommended to make use of national or international Quality Assessment programs in order to ensure the accuracy of the results.

Employ appropriate statistical methods for analysing control values and trends. If the results of the assay do not fit to the established acceptable ranges of control materials patient results should be considered invalid.

In this case, please check the following technical areas: Pipetting and timing devices; photometer, expiration dates of reagents, storage and incubation conditions, aspiration and washing methods.

After checking the above mentioned items without finding any error contact your distributor or DRG directly.

9 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

9.1 Assay Dynamic Range

The range of the assay is between 0.94 - 1000 pg/mL.

9.2 Specificity of Antibodies (Cross Reactivity)

The following substances were tested for cross reactivity of the assay:

Substance	Concentration tested (pg/mL)	Cross-reactivity (%)
17-OH-Progesterone	1000	1.1
Androstenedione	1000	2.5
Cortisol	30	0.0
Dehydroepiandrosterone (DHEA)	1440	0.0
Dihydrotestosterone (DHT)	1000	1.1
Estradiol	100	0.0
Estrone	300	0.0
Progesterone	2400	0.0

9.3 Sensitivity

The sensitivity study was designed according to CLSI guideline EP17-A2.

The Limit of Blank (LoB) was calculated by:

$$\text{LoB} = \text{mean}_{\text{blank}} + 1.645(\text{SD}_{\text{blank}}) = 0.94 \text{ pg/mL.}$$

The Limit of Detection (LoD); lowest analyte concentration likely to be reliably distinguished from LoB) was calculated by:

$$\text{LoD} = \text{LoB} + 1.645(\text{SD}_{\text{low concentration sample}}) = 2.63 \text{ pg/mL.}$$

The Limit of Quantification (LoQ) (lowest actual amount of an analyte that can be reliably detected with CV < 20%) was determined as:

$$\text{LoQ} = 10.07 \text{ pg/mL.}$$

9.4 Reproducibility

9.4.1 Intra Assay

The intra-assay variation was determined by 20 replicate measurements of 3 saliva samples within one run. The within-assay variability is shown below:

Sample	n	Mean (pg/mL)	CV (%)
1	20	109.7	6.2
2	20	228.9	3.6
3	20	556.4	4.2

9.4.2 Inter Assay

The inter-assay (between-run) variation was determined by duplicate measurements of 4 saliva samples over 10 days. The between-assay variability is shown below:

Sample	n	Mean (pg/mL)	CV (%)
1	40	80.2	10.7
2	40	231.5	7.5
3	40	574.5	5.5
4	40	923.2	6.8

9.4.3 Inter-Lot

The inter-lot (between-lots) variation was determined by triplicate measurements of 3 saliva samples in three different kit lots. The between lot variability is shown below:

Sample	n	Mean (pg/mL)	CV (%)
1	18	146.9	4.6
2	18	267.9	14.4
3	18	586.7	11.1

9.5 Recovery

Samples have been spiked by adding testosterone solutions with known concentrations in a 1:1 ratio to 5 different saliva samples containing different amounts of endogenous analyte. Each sample (native and spiked) was assayed and analyte concentrations of the samples were calculated from the standard curve.

The % recovery has been calculated by multiplication of the ratio of the measurements and the expected values with 100 (expected value = (endogenous testosterone + added testosterone) / 2; because of a 1:2 dilution of serum with spike material).

		Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5
Concentration [pg/mL]		84.0	154.5	280.3	564.7	968.6
Average Recovery		99.7	103.3	100.9	104.5	102.0
Range of Recovery [%]	from	89.8	98.8	93.0	88.8	92.4
	to	110.4	109.1	112.2	110.2	106.7

9.6 Linearity

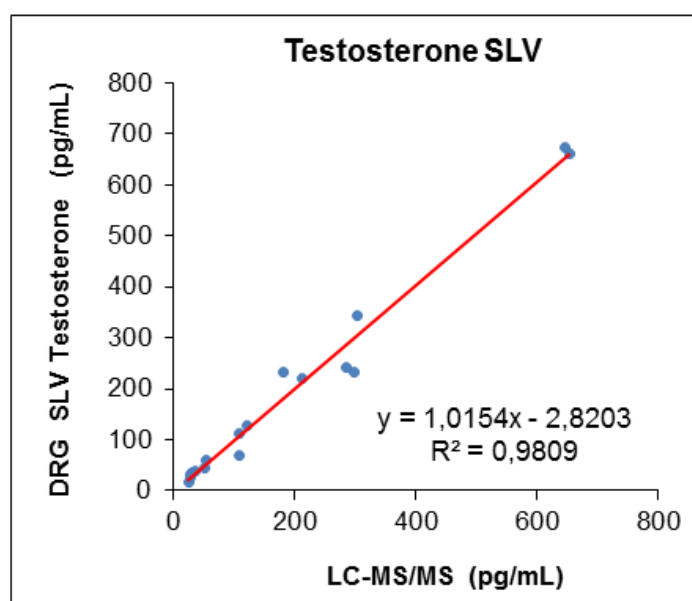
Five saliva samples containing different amounts of analyte were serially diluted with zero standard and assayed with the DRG ELISA. The percentage recovery was calculated by comparing the expected and measured values for testosterone.

	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	
Concentration [pg/mL]	142.7	231.3	362.0	611.6	867.0	
Average Recovery	104.5	97.7	103.8	100.2	102.1	
Range of Recovery [%]	from	101.6	94.3	95.4	94.6	98.7
	to	109.2	101.3	111.6	109.0	110.8

9.7 Comparison Studies

A study was performed that evaluated 17 saliva samples collected from adult men and women. The samples were analyzed with the DRG ELISA and a LC-MS/MS mass spectrometer to determine the concentration of testosterone in the saliva samples.

A correlation of $r = 0.9904$ and regression formula of $y = 1.015x - 2.8203$ were obtained.



10 LIMITATIONS OF USE

Reliable and reproducible results will be obtained when the assay procedure is performed with a complete understanding of the package insert instruction and with adherence to good laboratory practice.

Any improper handling of samples or modification of this test might influence the results.

The patient should not eat, drink, chew gum or brush teeth for 30 minutes before sampling. Otherwise rinse mouth thoroughly with cold water 5 min prior to sample collection. Do not collect samples when oral diseases, inflammation or lesions exist (blood contamination).

10.1 Interfering Substances

Blood contamination of more than 0.16 % in saliva samples will affect results, and usually can be seen by eye. Concentrations of Sodium Azide ≥ 0.02 % interferes in this assay and may lead to false results.

10.2 Drug Interferences

Until today no substances (drugs) are known to us, which have an influence to the measurement of testosterone in a sample.

10.3 High-Dose-Hook Effect

No hook effect was observed in this test.

11 LEGAL ASPECTS

Only for countries where the declaration of European Conformity (CE mark) is applicable.

11.1 Reliability of Results

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable national standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test.

The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications. In case of any doubt or concern please contact DRG.

11.2 Therapeutic Consequences

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as stated under point 11.1. Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of a patient.

Only in cases where the laboratory results are in acceptable agreement with the overall clinical picture of the patient should therapeutic consequences be derived.

The test result itself should never be the sole determinant for deriving any therapeutic consequences.

11.3 Liability

Any modification of the test kit and/or exchange or mixture of any components of different lots from one test kit to another could negatively affect the intended results and validity of the overall test. Such modification and/or exchanges invalidate any claim for replacement.

Claims submitted due to customer misinterpretation of laboratory results subject to point 11.2 are also invalid.

Regardless, in the event of any claim, the manufacturer's liability is not to exceed the value of the test kit. Any damage caused to the test kit during transportation is not subject to the liability of the manufacturer.

1 EINLEITUNG

Der **DRG Salivary Testosterone ELISA** wird zur quantitativen Bestimmung von Testosteron in Speichel eingesetzt.

Nur für In-vitro Diagnostik.

2 TESTPRINZIP

Der DRG Salivary Testosterone ELISA ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay, der auf dem Prinzip der kompetitiven Bindung basiert.

Die Wells der Mikrotiterplatten sind mit einem monoklonalen Antikörper beschichtet, der gegen eine Antikörper-Bindungsstelle des Testosteron-Moleküls gerichtet ist.

Die Proben werden in die beschichteten Wells gegeben und zusammen mit einem Testosteron-Enzymkonjugat inkubiert. Während der Inkubation konkurriert das Testosteron aus der Probe mit dem Testosteron-Enzymkonjugat um die freien Bindungsstellen auf den beschichteten Wells.

Das nicht gebundene Konjugat wird durch Waschen der Wells entfernt. Anschließend wird die Substratlösung zugegeben und die Farbentwicklung nach einer definierten Zeit gestoppt.

Die Intensität der gebildeten Farbe ist umgekehrt proportional der Testosteron-Konzentration in der Probe. Die Extinktion wird bei 450 nm mit einem Mikrotiterplattenleser gemessen.

3 VORSICHTSMAßNAHMEN

- Dieser Kit ist nur zum in vitro diagnostischen Gebrauch geeignet.
- Nur die gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung verwenden.
- Informationen zu im Kit enthaltenen gefährlichen Substanzen entnehmen Sie bitte dem Materialsicherheitsdatenblatt.
- Alle Bestandteile dieses Testkits, die humanes Serum oder Plasma enthalten, wurden mit FDA-geprüften Methoden auf HIV I/II, HbsAg und HCV getestet und als negativ bestätigt. Jedoch sollten alle Bestandteile im Umgang und bei der Entsorgung wie mögliche Gefahrenstoffe betrachtet werden.
- Der Kontakt mit der *Stop Solution* sollte vermieden werden, da sie 0.5 M H₂SO₄ enthält. Schwefelsäure kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
- Nicht mit dem Mund pipettieren und den Kontakt von Kitbestandteilen und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
- In den Bereichen, in denen Proben oder Kitbestandteile verwendet werden, nicht rauchen, essen oder Kosmetika verwenden.
- Beim Umgang mit Proben oder Reagenzien Einweg-Latexhandschuhe tragen. Die Verunreinigung von Reagenzien oder Proben mit Mikroben kann zu falschen Ergebnissen führen.
- Der Gebrauch sollte gemäß der Vorschriften einer entsprechenden nationalen Gefahrstoff-Sicherheitsrichtlinie erfolgen.
- Reagenzien nicht nach dem auf dem Kit-Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.
- Alle im Kit-Protokoll angegebenen Mengen müssen genau eingehalten werden. Optimale Ergebnisse können nur durch Verwendung kalibrierter Pipetten und Mikrotiterplatten-Lesegeräte erreicht werden.
- Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Lotnummern nicht untereinander vertauschen. Es wird empfohlen, keine Wells von verschiedenen Platten zu verwenden, auch nicht, wenn es sich um das gleiche Lot handelt. Die Kits können unter anderen Bedingungen gelagert oder versendet worden sein, so dass die Bindungscharakteristik der Platten leicht unterschiedlich ausfällt.
- Chemikalien und zubereitete oder bereits benutzte Reagenzien müssen gemäß den nationalen Gefahrstoffvorschriften wie gefährlicher Abfall behandelt werden.
- Sicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt von der Firma DRG Instruments GmbH erhältlich.

4 BESTANDTEILE DES KITS

4.1 Kitinhalt

1. **Microtiterwells**, 96 Wells, 12 x 8 Wells (einzeln brechbar);
Mit anti-Testosteron-Antikörper (monoklonal) beschichtet.
2. **Standard (Standard 0-6)**, 7 Fläschchen, je 1 mL, gebrauchsfertig;
Konzentrationen: 0 – 10 – 40 – 80 – 160 – 400 – 1000 pg/mL
Umrechnungsfaktor: pg/mL x 3,47 = pmol/L
Die Standards sind gegen Massenspektrometrie kalibriert.
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
3. **Control Low & High** (Kontrolle), 2 Fläschchen, je 1 mL; gebrauchsfertig
Kontrollwerte und -bereiche entnehmen Sie bitte dem Fläschchenetikett oder dem QC-Datenblatt.
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
4. **Enzyme Conjugate** (Enzymkonjugat), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig;
Testosteron mit Meerrettichperoxidase konjugiert.
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
5. **Substrate Solution** (Substratlösung), 1 Fläschchen, 25 mL, gebrauchsfertig;
Substratlösung TMB.
6. **Stop Solution** (Stopplösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig;
enthält 0,5 M H₂SO₄,
Kontakt mit der Stopplösung vermeiden! Kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
7. **Wash Solution** (Waschlösung), 1 Fläschchen, 30 mL, **40X** konzentriert;
Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.

Anmerkung: Zusätzlicher *Standard 0* zur Probenverdünnung ist auf Anfrage erhältlich.

4.2 Erforderliche aber nicht enthaltene Geräte und Materialien

- Kalibriertes Mikrotiterplattenlesegerät mit 450 ± 10 nm Filter), (z.B. das DRG Instruments Mikrotiterplattenlesegerät)
- Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipetten (100 µL, 200 µL)
- Saugfähiges Papier
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser
- Kurzzeitwecker
- Halblogarithmisches Millimeterpapier oder eine Software zur Datenauswertung

4.3 Lagerung und Haltbarkeit des Kits

Die ungeöffneten Reagenzien behalten bei Lagerung um 2 °C - 8 °C ihre Reaktivität bis zum Verfallsdatum. Nach dem Verfallsdatum die Reagenzien nicht mehr verwenden.

Nach dem Öffnen sollten alle Reagenzien bei 2 °C - 8 °C gelagert werden.

Die Mikrotiterwells sollten bei 2 °C - 8 °C gelagert werden. Der einmal geöffnete Folienbeutel sollte stets sehr sorgfältig wieder verschlossen werden.

Unter den beschriebenen Lagerbedingungen behalten geöffnete Kits zwei Monate ihre Reaktivität.

4.4 Vorbereitung der Reagenzien

Alle Reagenzien sowie die benötigte Anzahl von Wells sollen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht werden.

Wash Solution

Die 40-fach konzentrierte *Wash Solution* (30 mL) mit 1170 mL destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1200 mL verdünnen. *Die verdünnte Waschlösung ist bei Raumtemperatur für 2 Wochen stabil.*

4.5 Entsorgung des Kits

Die Entsorgung des Kits muss gemäß den nationalen gesetzlichen Vorschriften erfolgen. Spezielle Informationen für dieses Produkt finden Sie im Sicherheitsdatenblatt.

4.6 Beschädigte Testkits

Im Falle einer starken Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss die Firma DRG in schriftlicher Form spätestens eine Woche nach Erhalt des Kits informiert werden. Stark beschädigte Einzelkomponenten sollten nicht für den Testlauf verwendet werden. Sie müssen gelagert werden bis eine endgültige Lösung gefunden wurde. Danach sollten Sie gemäß den offiziellen Richtlinien entsorgt werden.

5 PROBENVORBEREITUNG

Speichelproben werden in diesem Test als Probenmaterial eingesetzt.

Der Patient sollte vor der Probennahme 30 Minuten nicht essen, trinken, Kaugummi kauen oder Zähne putzen. Andernfalls 5 Minuten vor der Probennahme den Mund gründlich mit kaltem Wasser spülen.

Speichelproben sollten nicht bei Krankheiten, Entzündungen oder Verletzungen der Mundhöhle entnommen werden (Blutkontamination).

Im Falle einer sichtbaren Kontamination mit Blut sollte die Probe verworfen werden. Das Probenbesteck wird mit Wasser gewaschen und nach 10 Minuten kann eine neue Probe genommen werden.

Achtung: Proben, die Natriumazid enthalten, sollten nicht verwendet werden.

5.1 Probenentnahme

Wir empfehlen Speichelproben mit einem kommerziell verfügbaren Besteck zu sammeln, z.B. SALI-TUBES 100 (REF SLV-4158), erhältlich bei DRG .

Bitte verwenden sie keine Salivette-Röhrchen.

Da die Steroidhormone ein deutliches zyklisches Sekretionsmuster zeigen, ist es wichtig auf den richtigen Zeitpunkt der Probenentnahme zu achten.

Um arbiträre (willkürliche) Ergebnisse zu vermeiden, empfehlen wir 5 Proben in einem Zeitraum von 2 bis 3 Stunden zu sammeln (mehrfache Probeentnahme). Dies sollte vorzugsweise vor einer Mahlzeit durchgeführt werden.

Da Lebensmittel eine bedeutende Menge an Steroidhormonen enthalten können, sollten die Proben möglichst nüchtern entnommen werden. Ist dies nicht möglich, sollte die Sammelperiode auf jeden Fall vor einer Mahlzeit liegen.

5.2 Probenaufbewahrung

Proben sollten stets gut verschlossen sein und können vor Testbeginn bis zu 1 Woche bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden.

Für eine längere Aufbewahrung sollten die Proben eingefroren bei -20 °C bis zum Testbeginn gelagert werden.

Mehrfaches Auftauen und erneutes Einfrieren ist möglich.

Um Muzine aus der Probe zu entfernen, muss jede Probe mindestens einmal eingefroren und aufgetaut und anschließend zentrifugiert werden.

Nach der Ankunft im Labor muss eine Probe mindestens über Nacht tiefgekühlt gelagert werden. Am nächsten Morgen wird die eingefrorene Probe auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig gemischt. Dann muss die Probe 5 bis 10 Minuten zentrifugiert werden (bei 3000 - 2000 × g).

Der klare, farblose Überstand kann jetzt einfach pipettiert werden.

Wird ein solches Set an Mehrfach-Proben getestet (nach mindestens einem Einfrier- Auftau- und Zentrifugationszyklus) muss im Labor in einem separaten Probengefäß eine Mischprobe aus Aliquots aller 5 Einzelproben hergestellt werden. Diese Mischprobe wird im Test eingesetzt.

5.3 Probenverdünnung

Wenn in einem ersten Testdurchlauf bei einer Probe eine Konzentration höher als der höchste Standard gefunden wird, kann diese Probe mit *Standard 0* weiter verdünnt und nochmals bestimmt werden. Die Verdünnung muss jedoch bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

Beispiel:

a) Verdünnung 1:10: 10 µL Speichel + 90 µL *Standard 0* gründlich mischen)

b) Verdünnung 1:100: 10 µL Verdünnung a) 1:10 + 90 µL *Standard 0* (gründlich mischen).

6 TESTDURCHFÜHRUNG

6.1 Allgemeine Hinweise

- Alle Reagenzien und Proben müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht und gut durchmischt werden. Dabei sollte Schaumbildung vermieden werden.
- Wenn die Testdurchführung einmal begonnen wurde, muss sie ohne Unterbrechung zu Ende geführt werden.
- Für jeden Standard, jede Kontrolle oder Probe eine neue Plastikspitze verwenden, um Verschleppungen zu vermeiden.
- Die Optische Dichte ist abhängig von Inkubationszeit und Temperatur. Deshalb ist es notwendig, vor Beginn der Testdurchführung alle Reagenzien in einen arbeitsbereiten Zustand zu bringen, die Deckel der Fläschchen zu öffnen, alle benötigten Wells in den Halter zu setzen. Nur eine solche Vorbereitung garantiert gleiche Zeiten für jeden Pipettiervorgang ohne Pausen.
- Als generelle Regel gilt, dass die enzymatische Reaktion linear proportional zu Zeit und Temperatur ist.

6.2 Testdurchführung

Jeder Lauf muss eine Standardkurve beinhalten.

Der Test muss bei Raumtemperatur (21 °C - 24 °C) durchgeführt werden. Eine geringere Temperatur führt zu deutlich verringerten OD-Werten.

1. Die benötigte Anzahl Wells in der Halterung befestigen.
2. **Je 75 µL Standard, Control und Probe mit neuen Plastikspitzen** in die entsprechenden Wells geben.
3. **100 µL Enzyme Conjugate** in jedes Well geben.
Für 10 Sekunden gut schütteln. Es ist sehr wichtig, in diesem Schritt eine komplette Durchmischung zu erreichen.
4. **60 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
5. Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln. Wells **5-mal** mit verdünnter *Wash Solution* (400 µL) waschen. Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Wells auf saugfähigem Papier entfernen.
Achtung: Die Sensitivität und Präzision dieses Assays wird erheblich beeinflusst von der korrekten Durchführung des Waschschrittes!
6. **200 µL Substrate Solution** in jedes Well geben.
7. **30 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
8. Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von **100 µL Stop Solution** in jedes Well abstoppen.
9. Die Optische Dichte bei **450 ±10 nm** mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät innerhalb von **10 Minuten** nach Zugabe der **Stop Solution** bestimmen.

6.3 Ergebnisermittlung

1. Die durchschnittlichen Werte der Optischen Dichte (OD) für jedes Set von Standards, Controls und Patientenproben bestimmen.
2. Eine Standardkurve ermitteln durch Auftragen der mittleren Optischen Dichte jedes Standards gegen die Konzentration, wobei der OD-Wert auf der vertikalen (Y) Achse und die Konzentration auf der horizontalen (X) Achse eingetragen wird.
3. Unter Verwendung der mittleren OD wird für jede Probe die entsprechende Konzentration aus der Standardkurve ermittelt.
4. Automatische Methode: Die in der Gebrauchsanweisung angegebenen Werte wurden automatisch mit Hilfe der 4 Parameter-Gleichung bestimmt. (4 Parameter Rodbard oder 4 Parameter Marquardt sind die bevorzugten Methoden.) Andere Auswertungsfunktionen können leicht abweichende Werte ergeben.
5. Die Konzentration der Proben kann direkt von der Standardkurve abgelesen werden. Proben, die eine höhere Konzentration als die des höchsten Standards enthalten, müssen verdünnt werden. Dieser Verdünnungsfaktor muss bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

6.3.1 Beispiel für eine Standardkurve

Nachfolgend wird ein typisches Beispiel für eine Standardkurve mit dem DRG ELISA gezeigt. Diese Werte sollten **nicht** zur Berechnung von Patientendaten verwendet werden.

Standard	Optische Dichte (450 nm)
Standard 0 (0 pg/mL)	1,95
Standard 1 (10 pg/mL)	1,75
Standard 2 (40 pg/mL)	1,48
Standard 3 (80 pg/mL)	1,15
Standard 4 (160 pg/mL)	0,80
Standard 5 (400 pg/mL)	0,43
Standard 6 (1000 pg/mL)	0,15

7 ERWARTETE WERTE

Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen normalen und abnormalen Werte ermittelt.

In einer Studie wurden die Speichelproben von gesunden Individuen untersucht. Die Proben wurden morgens gesammelt.

Dabei ergaben sich mit dem DRG Salivary Testosterone ELISA folgende Werte:

Tabelle 1:

Population	n	Alter (Jahre)	Mittelwert (pg/mL)	Median (pg/mL)	2,5. - 97,5. Perzentile (pg/mL)	Bereich (Min. - Max.) (pg/mL)
Männer	174	13 - 71	71,5	64,1	10,0 - 169,7	6,1 - 230,9
Frauen	67	15 - 73	19,8	18,9	3,5 - 44,9	3,1 - 50,2

Tabelle 2:

Population	n	Alter (Jahre)	Mittelwert (pg/mL)	Median (pg/mL)	2,5. - 97,5. Perzentile (pg/mL)	Bereich (Min. - Max.) (pg/mL)
Männer	8	14	30,7	19,6	13,8 - 59,0	13,5 - 59,02
	22	15	47,3	43,8	12,0 - 125,5	8,23 - 131,1
	10	16	69,9	68,9	7,5 - 152,3	6,1 - 167,8
	14	17	100,3	113,4	54,1 - 157,3	53,7 - 170,6
	12	18	125,1	135,0	61,3 - 209,7	53,7 - 230,9
	5	19	95,5	87,2	50,8 - 156,1	46,8 - 162,9
	15	21 - 25	96,4	93,3	56,1 - 168,1	52,9 - 186,5
	4	26 - 30	96,7	81,6	70,1 - 148,9	69,9 - 153,7
	2	31 - 35	74,7	74,7	54,4 - 95,0	53,3 - 96,1
	5	36 - 40	81,8	80,2	48,9 - 118,4	45,8 - 122,2
	12	46 - 50	64,3	56,8	28,6 - 127,4	23,03 - 127,4
	12	51 - 55	61,1	72,4	28,1 - 81,4	28,1 - 81,4
	4	56 - 60	79,7	79,7	68,5 - 90,8	68,5 - 90,8

Testosteronwerte im Speichel zeigen einen deutlichen zirkadianen Rhythmus. Aus diesem Grund sollten Proben immer zur selben Zeit gewonnen werden.

8 QUALITÄTSKONTROLLE

Es wird empfohlen, die Kontrollproben gemäß den nationalen gesetzlichen Bestimmungen einzusetzen. Durch die Verwendung von Kontrollproben wird eine Tag-zu-Tag Überprüfung der Ergebnisse erzielt. Es sollten Kontrollen sowohl mit normalem als auch pathologischem Level eingesetzt werden.

Die Kontrollen mit den entsprechenden Ergebnissen des QC-Labors sind im QC-Zertifikat, das dem Kit beiliegt, aufgeführt. Die im QC-Blatt angegebenen Werte und Bereiche beziehen sich stets auf die aktuelle Kitcharge und sollten zum direkten Vergleich der Ergebnisse verwendet werden.

Es wird ebenfalls empfohlen, an nationalen oder internationalen Qualitätssicherungs-Programmen teilzunehmen, um die Genauigkeit der Ergebnisse zu sichern.

Es sollten geeignete statistische Methoden zur Analyse von Kontroll-Werten und Trends angewendet werden. Wenn die Ergebnisse des Assays nicht mit den angegebenen Akzeptanzbereichen des Kontrollmaterials übereinstimmen, sollten die Patientenergebnisse als ungültig eingestuft werden.

In diesem Fall überprüfen Sie bitte die folgenden Bereiche: Pipetten und Zeitnehmer, Photometer, Verfallsdatum der Reagenzien, Lagerungs- und Inkubationsbedingungen, Absaug- und Waschmethode.

Sollten Sie nach Überprüfung der vorgenannten Bereiche keinen Fehler erkannt haben, setzen Sie sich bitte mit Ihrem Lieferanten oder direkt mit der Firma DRG in Verbindung.

9 ASSAY-CHARAKTERISTIKA

9.1 Messbereich

Der Messbereich des Testes liegt zwischen 0,94 - 1000 pg/mL.

9.2 Spezifität der Antikörper (Kreuzreaktivität)

Die Daten entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

9.3 Sensitivität

Die Sensitivitätsstudie wurde gemäß der CLSI-Richtlinie EP17-A2 durchgeführt.

Der „Limit of Blank“ (LoB) ist 0,94 pg/mL.

Die Nachweisgrenze (LoD) ist 2,63 pg/mL.

Die Quantifizierungsgrenze (LoQ) ist 10,07 pg/mL.

Die Daten zu:

9.4 Reproduzierbarkeit (Präzision)

9.5 Wiederfindung

9.6 Linearität

9.7 Vergleichsstudien

entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

10 GRENZEN DES TESTS

Jede unsachgemäße Behandlung von Proben oder Modifikationen dieses Tests können die Ergebnisse beeinflussen.

10.1 Interferenzen

Eine Kontamination der Speichelproben mit Blut von > 0,16 % beeinflusst das Ergebnis. Eine solche Verunreinigung kann bereits mit den Augen wahrgenommen werden.

Konzentrationen von Natriumazid \geq 0,02 % beeinflussen den Test und können zu falschen Ergebnissen führen.

10.2 Beeinflussung durch Medikamente

Uns sind bislang keine Stoffe (Medikamente) bekannt geworden, deren Einnahme die Messung des Testosteron-Gehaltes der Probe beeinflussen würde.

10.3 High-Dose-Hook Effekt

Ein Hook-Effekt tritt in diesem Test nicht auf.

11 RECHTLICHE GRUNDLAGEN

11.1 Zuverlässigkeit der Ergebnisse

Der Test muss exakt gemäß der Testanleitung des Herstellers abgearbeitet werden. Darüber hinaus muss der Benutzer sich strikt an die Regeln der GLP (Good Laboratory Practice) oder andere eventuell anzuwendende Regeln oder nationale gesetzliche Vorgaben halten. Dies betrifft besonders den Gebrauch der Kontrollreagenzien. Es ist sehr wichtig, bei der Testdurchführung stets eine ausreichende Anzahl Kontrollen zur Überprüfung der Genauigkeit und Präzision mitlaufen zu lassen.

Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn alle Kontrollen in den vorgegebenen Bereichen liegen, und wenn alle anderen Testparameter die vorgegebenen Spezifikationen für diesen Assay erfüllen. Wenn Sie bezüglich eines Ergebnisses Zweifel oder Bedenken haben, setzen Sie sich bitte mit der Firma DRG in Verbindung.

11.2 Therapeutische Konsequenzen

Therapeutische Konsequenzen sollten keinesfalls nur aufgrund von Laborergebnissen erfolgen, selbst dann nicht, wenn alle Testergebnisse mit den in 11.1. genannten Voraussetzungen übereinstimmen. Jedes Laborergebnis ist nur ein Teil des klinischen Gesamtbildes eines Patienten.

Nur in Fällen, in denen die Laborergebnisse in akzeptabler Übereinstimmung mit dem allgemeinen klinischen Bild des Patienten stehen, sollten therapeutische Konsequenzen eingeleitet werden.

Das Testergebnis allein sollte niemals als alleinige Grundlage für die Einleitung therapeutischer Konsequenzen dienen.

11.3 Haftung

Jegliche Veränderungen des Testkits und/oder Austausch oder Vermischung von Komponenten unterschiedlicher Chargen von einem Testkit zu einem anderen, können die gewünschten Ergebnisse und die Gültigkeit des gesamten Tests negativ beeinflussen. Solche Veränderungen und/oder Austausch haben den Ausschluss jeglicher Ersatzansprüche zur Folge.

Reklamationen, die aufgrund von Falschinterpretation von Laborergebnissen durch den Kunden gemäß Punkt 11.2. erfolgen, sind ebenfalls abzuweisen. Im Falle jeglicher Reklamation ist die Haftung des Herstellers maximal auf den Wert des Testkits beschränkt. Jegliche Schäden, die während des Transports am Kit entstanden sind, unterliegen nicht der Haftung des Herstellers.

1 INTRODUZIONE

Il test immuno-enzimatico **Salivary Testosterone ELISA** contiene materiale per la determinazione quantitativa di testosterone nella saliva.

Questo test kit è adatto soltanto per l'uso diagnostico.

2 PRINCIPIO DEL TEST

Il test Salivary Testosterone ELISA è un test immunologico in fase solida con enzimi ancorati su un substrato (ELISA), basato sul principio del legame competitivo.

I micropozzetti sono ricoperti con un anticorpo monoclonale diretto contro un unico sito antigenico della molecola testosterone. Testosterone endogeno/a di un campione compete con il testosterone coniugato alla perossidasi di rafano per il sito di legame sull'anticorpo ancorato nel micropozzo. Dopo l'incubazione il coniugato non legato è lavato via.

La quantità della perossidasi coniugata legata è inversamente proporzionale alla concentrazione di testosterone nel campione. Dopo l'aggiunta della soluzione substrato l'intensità del colore sviluppato è inversamente proporzionale alla concentrazione di testosterone nel campione del paziente.

3 PRECAUZIONI

- Questo kit è adatto soltanto per l'uso diagnostico in vitro.
- Si prega di usare la versione valida dell'inserito del pacco a disposizione con il kit.
- Informazioni su sostanze pericolose contenute nel kit sono riportate nel regolamento di sicurezza.
- Tutti i componenti del kit che contengono siero o plasma umano sono controllati e confermati negativi per la presenza di HIV I/II, HbsAg e HCV con metodi conformi alle norme FDA. Ciononostante tutti i componenti dovrebbero essere trattati come potenziali sostanze nocive nella manutenzione e nello smaltimento.
- Il contatto con la *Stop Solution* dovrebbe essere evitato perché contiene 0.5 M H₂SO₄. L'acido solforico può provocare irritazioni cutanee e ustioni.
- Non pipettare con la bocca ed evitare il contatto con componenti del kit con la pelle o con le mucose.
- Nelle aree in cui il test viene utilizzato non fumare, mangiare, bere o fare uso di prodotti cosmetici.
- Nella manutenzione dei campioni o reagenti del kit portare guanti di latex monouso. La contaminazione dei reagenti o dei campioni con microbi può dare risultati falsi.
- L'utilizzo dovrebbe avvenire secondo regole che seguono le rispettive norme di sicurezza nazionali sulle sostanze nocive.
- Non utilizzare i reagenti dopo la scadenza indicata sul kit.
- Ogni indicazione sulla quantità indicata del protocollo del kit deve essere accuratamente seguito. Risultati ottimali possono essere ottenuti soltanto con l'uso di pipette calibrate e spettrofotometro calibrato.
- Componenti del kit con numeri di lotto diversi non devono essere combinati. È consigliabile di non utilizzare pozzetti di piastre diversi, anche se si tratta dello stesso lotto. I kit potrebbero essere stati immagazzinati o spediti a condizioni diverse, cosicché le caratteristiche di legame potrebbero divergere leggermente.
- I componenti chimici e reagenti preparati o già utilizzati devono essere trattati e smaltiti secondo le norme di sicurezza nazionali sulle sostanze nocive.
- I regolamenti di sicurezza di questo prodotto possono essere richiesti direttamente dalla ditta DRG Instruments GmbH.

4 COMPONENTI DEL KIT

4.1 Contenuto del kit

1. **Microtiterwells** (Micropozzetti), 12 x 8 file (separatamente staccabili), 96 pozzetti; Pozzetti ricoperti con l'anti-testosterone anticorpo (monoclonale)
2. **Standard (Standard 0 - 6)**, 7 flaconi, 1 mL, pronto all'uso
Concentrazioni: 0 – 10 – 40 – 80 – 160 – 400 – 1000 pg/mL
Conversione: $\text{pg/mL} \times 3,47 = \text{pmol/L}$
Gli standard sono calibrati contro la spettrometria di massa.
Contiene conservante senza mercurio.
3. **Control Low & High** (Controllo), 2 flaconi, 1 mL, pronto all'uso
I valori dei controlli sono indicati sull'etichetta dei flaconi o sulla descrizione QC.
Contiene conservante senza mercurio.
4. **Enzyme Conjugate** (Tracciante enzimatico), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso;
Testosterone coniugato alla perossidasi di rafano.
Contiene conservante senza mercurio.
5. **Substrate Solution** (Soluzione di substrato), 1 flacone, 25 mL, pronto all'uso;
TMB (benzidine tetrametilico).
6. **Stop Solution** (Soluzione d'arresto), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso;
contiene 0.5 M H_2SO_4 .
Evitare il contatto con la soluzione d'arresto. Può causare irritazioni cutanee e ustioni.
7. **Wash Solution** (Soluzione di lavaggio), 1 flacone, 30 mL (concentrata 40X);
vedi „preparazione dei reagenti“.

Nota: Ulteriore *Standard 0* per la diluizione dei campioni può essere richiesto alla ditta.

4.2 Materiali richiesti ma non contenuti nel kit

- Uno spettrofotometro calibrato per micropozzetti (450 ± 10 nm) (p.es. il DRG Instruments Microtiterplate Reader).
- Micropipette calibrate di precisione a volume variabile.
- Carta assorbente.
- Acqua distillata.

4.3 Magazzinaggio e stabilità del kit

A 2 °C - 8 °C i reagenti non aperti rimangono reattivi fino alla data di scadenza indicata. Non usare reagenti oltre questa data.

Tutti i reagenti aperti devono essere magazzinati a 2 °C - 8 °C. I micropozzetti devono essere magazzinati a 2 °C - 8 °C. Una volta aperti i pacchi, questi devono essere richiusi accuratamente.

Test kits aperti rimangono attivi per 2 mesi se magazzinati alle condizioni sopra descritte.

4.4 Preparazione dei reagenti

Prima dell'uso portare tutti i reagenti e il numero necessario di pozzetti a temperatura ambiente.

Wash Solution

Diluire 30 mL *Wash Solution* concentrata con 1170 mL di acqua deionizzata fino ad un volume finale di 1200 mL.

La soluzione di lavaggio diluita è stabile per 2 settimane a temperatura ambiente.

4.5 Smaltimento del kit

Lo smaltimento del kit deve avvenire secondo le regole a norma di legge. Informazioni particolareggiate per questo prodotto si trovano nel regolamento di sicurezza.

4.6 Test kits danneggiati

Nel caso di gravi danneggiamenti del kit o dei suoi componenti deve avvenire una dichiarazione scritta alla ditta DRG, al più tardi una settimana dopo il ricevimento del kit. Componenti danneggiati non dovrebbero essere utilizzati per il test. Questi componenti devono essere magazzinati fino alla soluzione del problema. Dopo di che essi devono essere smaltiti secondo le norme ufficiali.

5 CAMPIONI

Evitare di mangiare, bere, consumare gomme da masticare o di usare lo spazzolino da denti almeno fino a 30 minuti dal prelievo.

Altrimenti si raccomanda di sciacquare la bocca con abbondante acqua fredda per 5 minuti prima del prelievo.

Non prelevare campioni se esistono malattie orali, infiammazioni o lesioni (contaminazione di sangue) nella bocca.

Se esiste una contaminazione visibile con sangue del campione del paziente, bisogna descartarlo, sciacquare il contenitore con acqua, aspettare 10 minuti e prendere un campione nuovo.

Nota: Campioni contenenti azide di sodio non dovrebbero essere usati in questo saggio.

5.1 Raccolta dei campioni

Campioni di saliva devono essere raccolti usando soltanto uno strumento speciale per il campionamento (contenitore e filo di paglia), p.es. SALI-TUBES (SLV-4158).

Non usare Salivette (bastoncini di cotone) per il campionamento.

A causa del pattern ciclico di secrezione degli ormoni steroidei è importante di coordinare il campionamento.

Per evitare risultati arbitrari raccomandiamo che 5 campioni vengano raccolti sempre in un periodo di tempo di 2 -3 ore (*campionamento multiplo*), preferibilmente prima di un pasto.

Siccome il cibo può contenere quantità significative di ormoni steroidei, i campioni devono preferibilmente essere raccolti durante il digiuno. Se il digiuno dovesse causare problemi, la raccolta deve essere effettuata immediatamente prima del pranzo o la cena.

5.2 Conservazione e preparazione dei campioni

I campioni di saliva possono essere conservati a 2 °C fino a 8 °C fino ad una settimana e devono essere congelati a -20 °C per periodi più lunghi; cicli ripetuti di congelamento e scongelamento non causano problemi.

Ogni campione deve essere congelato, scongelato e centrifugato almeno una volta per separare le mucine tramite centrifugazione.

Quando i campioni arrivano nel laboratorio, essi devono rimanere nel congelatore almeno una notte. La mattina seguente i campioni congelati vengono portati a temperatura ambiente e mescolati gentilmente.

Poi i campioni devono essere centrifugati per 5 a 10 minuti (a 3000 - 2000 x g).

Adesso il surnatante chiaro ed incolore è facilmente pipettabile.

Se un set di campioni multipli deve essere analizzato, il laboratorio (dopo almeno un ciclo di congelamento, scongelamento e centrifugazione) deve mescolare i 5 campioni singoli in un contenitore separato e analizzare questa miscela.

5.3 Diluizione dei campioni

Se in un campione viene trovata una concentrazione oltre lo standard più alto, questo campione può essere diluito con lo *Standard 0* e nuovamente determinato.

Della diluizione deve essere però tenuto conto.

Esempio:

- a) diluizione 1:10: 10 µL campione + 90 µL *Standard 0* (agitare bene)
- b) diluizione 1:100: 10 µL della diluizione a) + 90 µL *Standard 0* (agitare bene).

6 ATTUAZIONE DEL TEST

6.1 Indicazioni generali

- Tutti i reagenti e i campioni devono essere portati a temperatura ambiente e ben mescolati prima dell'uso. Evitare la formazione di schiume.
- Una volta iniziato il procedimento del test, questo deve essere portato alla fine senza interruzione.
- Per ogni componente, standard, controllo o campione è necessario utilizzare una nuova punta monouso per evitare reazioni incrociate.
- La densità ottica dipende dal tempo d'incubazione e dalla temperatura. Perciò si rende necessario di preparare tutti i reagenti, di aprire i tappi dei flaconi e di appostare tutti i pozzetti nelle appropriate posizioni. Soltanto una tale preparazione garantisce gli stessi tempi per ogni processo di pipettamento.
- Come regola generale vale che la reazione enzimatica si svolge linearmente proporzionale con il tempo e con la temperatura.

6.2 Esecuzione del test

Ogni analisi deve includere una curva standard.

Il test deve essere eseguito a temperatura ambiente (21 ° C a 24 ° C). Temperature più basse portano ad un evidente decremento dei valori delle OD.

1. Fissare i pozzetti necessari sul supporto.
2. Pipettare **75 µL** di ogni **Standard, Control** e **campione** nei pozzetti, cambiando ogni volta la punta monouso.
3. Pipettare **100 µL Enzyme Conjugate** in ogni pozzetto.
Agitare bene per 10 secondi. È molto importante raggiungere un completo mescolamento.
4. Incubare per **60 minuti** a temperatura ambiente.
5. Rovesciare la piastra per vuotare i pozzetti.
Lavare i pozzetti **5 volte** con *Wash Solution* diluita (400 µL in ogni pozzetto). Rimuovere le gocce d'acqua rimanenti rivoltando la piastra su carta assorbente.
Importante: La sensibilità e la precisazione di questo kit sono fortemente influenzate dal corretto esecuzione del lavaggio!
6. Aggiungere **200 µL** della **Substrate Solution** ad ogni pozzetto.
7. Incubare per **30 minuti** a temperatura ambiente.
8. Fermare la reazione enzimatica aggiungendo **100 µL** della **Stop Solution** ad ogni pozzetto.
9. Determinare la densità ottica a **450 ±10 nm** con un fotometro per microtiter-piastre **entro 10 minuti** dopo l'aggiunta della *Stop Solution*.

6.3 Rilevamento dei risultati

1. Determinare i valori medi della densità ottica per ogni set di standard, controlli e campioni.
2. Costruire una curva standard: riportare i valori medi della densità ottica (OD) di ogni standard contro la rispettiva concentrazione dove i valori delle OD si devono trovare sull'asse verticale (Y) e le concentrazioni sull'asse orizzontale (X).
3. Utilizzando il valore medio delle OD per ogni campione si determina la rispettiva concentrazione dalla curva standard.
4. Metodo automatico: I valori riportati in queste istruzioni per l'uso sono stati determinati tramite l'equazione a 4 parametri. (I metodi preferiti sono 4 Parameter Rodbard oppure 4 Parameter Marquardt.) Altri funzioni usati per l'elaborazione dei dati possono dare risultati leggermente differenti.
5. La concentrazione dei campioni può essere determinata direttamente dalla curva standard. Campioni con una concentrazione più elevata dello standard più concentrato devono essere diluiti. Di questo fattore di diluizione deve essere tenuto conto per il calcolo della concentrazione.

6.3.1 Esempio di una curva standard tipica

I seguenti dati sono a scopo dimostrativo soltanto e **non possono** sostituire i dati generati dall'esecuzione del test.

Standard	Densità ottiche (450 nm)
Standard 0 (0 pg/mL)	1,95
Standard 1 (10 pg/mL)	1,75
Standard 2 (40 pg/mL)	1,48
Standard 3 (80 pg/mL)	1,15
Standard 4 (160 pg/mL)	0,80
Standard 5 (400 pg/mL)	0,43
Standard 6 (1000 pg/mL)	0,15

7 VALORI NORMALI

È consigliabile che ogni laboratorio determini i propri valori normali e anormali.

In uno studio condotto su persone apparentemente sane usando il test DRG Salivary Testosterone ELISA i seguenti valori sono stati ottenuti:

Campioni sono stati raccolti alla mattina.

Tabella 1:

Popolazione	n	Età (anni)	Media (pg/mL)	Mediano (pg/mL)	2,5. - 97,5. percentile (pg/mL)	Intervallo (Min. - Max.) (pg/mL)
Uomini	174	13 - 71	71,5	64,1	10,0 - 169,7	6,1 - 230,9
Donne	67	15 - 73	19,8	18,9	3,5 - 44,9	3,1 - 50,2

Tabella 2:

Popolazione	n	Età (anni)	Media (pg/mL)	Mediano (pg/mL)	2,5. - 97,5. percentile (pg/mL)	Intervallo (Min. - Max.) (pg/mL)
Uomini	8	14	30,7	19,6	13,8 - 59,0	13,5 - 59,02
	22	15	47,3	43,8	12,0 - 125,5	8,23 - 131,1
	10	16	69,9	68,9	7,5 - 152,3	6,1 - 167,8
	14	17	100,3	113,4	54,1 - 157,3	53,7 - 170,6
	12	18	125,1	135,0	61,3 - 209,7	53,7 - 230,9
	5	19	95,5	87,2	50,8 - 156,1	46,8 - 162,9
	15	21 - 25	96,4	93,3	56,1 - 168,1	52,9 - 186,5
	4	26 - 30	96,7	81,6	70,1 - 148,9	69,9 - 153,7
	2	31 - 35	74,7	74,7	54,4 - 95,0	53,3 - 96,1
	5	36 - 40	81,8	80,2	48,9 - 118,4	45,8 - 122,2
	12	46 - 50	64,3	56,8	28,6 - 127,4	23,03 - 127,4
	12	51 - 55	61,1	72,4	28,1 - 81,4	28,1 - 81,4
	4	56 - 60	79,7	79,7	68,5 - 90,8	68,5 - 90,8

Dato che i livelli di testosterone mostrano un ciclo diurno, raccomandiamo che i campioni vengano raccolti alla stessa ora del giorno.

8 CONTROLLO QUALITÀ

È consigliabile utilizzare i campioni controllo secondo le norme di legge. Attraverso l'utilizzo dei campioni controllo si può raggiungere una verifica dei risultati giorno per giorno. Dovrebbero essere adoperati campioni controllo sia con un livello normale sia con uno patologico.

Le referenze con i rispettivi risultati del laboratorio QC sono elencati nel QC certificato, che è allegato al kit. I valori riportati nel QC certificato si riferiscono al lotto del kit attuale e dovrebbero essere utilizzati per un raffronto dei risultati.

È altresì consigliabile di partecipare a programmi di sicurezza sulla qualità nazionali o internazionali, per assicurarsi dell'esattezza dei risultati.

Appropriati metodi statistici per l'analisi dei valori controllo e delle rappresentazioni grafici dovrebbero essere adoperati. Nel caso che i risultati del test non combaciano con il campo di accettazione indicato dal materiale di controllo, i risultati dei pazienti devono essere considerati invalidi. In questo caso si prega di controllare i seguenti fattori d'errore: pipette, cronometri, fotometro, data di scadenza dei reagenti, condizione di magazzinaggio e d'incubazione, metodi di aspirazione e di lavaggio.

Se dopo il controllo dei suddetti fattori non è rilevabile alcun errore, si prega di contattare il fornitore o direttamente la ditta DRG.

9 CARATTERISTICHE DEL TEST

9.1 Assay Dynamic Range

Le concentrazioni determinabili con questo test stanno tra 0,94 - 1000 pg/mL.

9.2 Specificità degli anticorpi (reazioni ad incrocio)

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

9.3 Sensitività

Lo studio della sensitività è stato disegnato seguendo le line guide CLSI EP17-A2.

Il limite del bianco (LoB) è 0,94 pg/mL.

Il limite di rilevabilità (LoD) è 2,63 pg/mL.

Il limite di quantificazione (LoQ) è 10,07 pg/mL.

Dati dettagliati su

9.4 Precisione

9.5 Ritrovato

9.6 Linearità

9.7 Comparazione metodica

si prega di consultare le dettagliate istruzioni per l'uso in inglese.

10 LIMITAZIONE DEL TEST

Ogni manutenzione impropria dei campioni o modificazione del protocollo può influenzare i risultati.

10.1 Sostanze interferenti

Una contaminazione di sangue > 0.16 % nella saliva avrà effetti sui risultati e può normalmente essere vista a occhio.

Una concentrazione di azide di sodio \geq 0.02 % interferisce con questo saggio e può portare a risultati falsi.

10.2 Droghe interferenti

Fino ad oggi nessuna sostanza (farmaco) è conosciuta a noi che abbia influenzato la determinazione di testosterone nel campione.

10.3 Effetto Hook di alti dosaggi

Nessun effetto gancio (effetto hook) è stato osservato in questo test.

11 ASPETTI LEGALI

11.1 Affidabilità dei risultati

Il test deve essere eseguito esattamente secondo il protocollo dato dal produttore. Inoltre l'utente deve seguire le regole del GLP (Good Laboratory Practice) o eventualmente altre regole comportamentali o disposizioni legali. Questo vale soprattutto per l'uso delle referenze. È molto importante utilizzare un numero appropriato di referenze in parallelo ai campioni test per poter controllare l'esattezza e la precisione del test.

I risultati del test sono validi soltanto se tutte le referenze cadono nei margini prestabiliti e se tutti gli altri parametri del test soddisfano la specificazione per questo test. Se esistono dubbi o domande su questi risultati, si prega di contattare la ditta DRG.

11.2 Conseguenze terapeutiche

Soltanto sulla base dei risultati dei laboratori non dovrebbero essere intraprese delle conseguenze terapeutiche di alcun tipo, anche se i risultati del test sono d'accordo con gli aspetti articolati nel punto 11.1. Ogni risultato di laboratorio è soltanto una parte di un quadro clinico completo di un paziente.

Soltanto in casi in cui i risultati di un test del laboratorio si accordano con il quadro clinico dell'ammalato, si possono intraprendere delle conseguenze terapeutiche.

Il risultato del test da solo non è base sufficiente per lo stabilimento di una terapia.

11.3 Responsabilità legali

Ogni cambiamento del protocollo del test e/o lo scambio o il mescolamento di componenti provenienti da cariche diverse possono influenzare negativamente i risultati e compromettere la validità del test. Questi cambiamenti e/o scambi annullano ogni diritto al risarcimento.

Si respingano inoltre tutti i richiami risultanti da interpretazioni sbagliate da parte dell'utente secondo il paragrafo 11.2. Nel caso di reclamazione, la garanzia del produttore è limitato al valore massimo del test kit. Ogni danno provocato durante il trasporto del kit non sottostà alla responsabilità del produttore.

1 INTRODUCCIÓN

El kit Salivary Testosterone ELISA proporciona los materiales necesarios para la determinación cuantitativa de la testosterona en saliva.

Este ensayo está diseñado solo para diagnóstico *in vitro*.

2 FUNDAMENTO DEL ENSAYO

El kit Salivary Testosterone ELISA es un ensayo en fase sólida de inmunoadsorción unido a enzimas (ELISA), basado en el principio de unión competitiva.

Los pocillos de las placas están recubiertos con un anticuerpo monoclonal dirigido contra un foco antigénico en la molécula de testosterona. En las muestras de los pacientes la testosterona compite con un conjugado de testosterona - peroxidasa de rábano en la unión al anticuerpo inmovilizado. Después de la incubación el conjugado no unido se lava.

La cantidad de conjugado de peroxidasa unido es inversamente proporcional a la concentración de testosterona en la muestra. Después de la adición de la solución sustrato, la intensidad de color desarrollado es inversamente proporcional a la concentración de testosterona en la muestra del paciente.

3 PRECAUCIONES

- Este kit es solamente para diagnóstico *in vitro*.
- Por favor, se usa solo la versión válida de la metodología técnica incluida aquí en el kit.
- Para obtener información de las sustancias peligrosas incluidas en el kit por favor mirar las hojas de los datos de seguridad del material.
- Todos los reactivos en este kit de ensayo que contienen suero o plasma humano se han ensayado y confirmado ser negativos para HIV I/II, HBsAg y HCV mediante procedimientos aprobados por la FDA. Sin embargo, todos los reactivos deben ser tratados tanto en su uso como dispensación como potencialmente biopeligrosos.
- Evitar contacto con *Stop Solution* que contiene H_2SO_4 0,5 M. Puede provocar irritación y quemaduras en la piel.
- Nunca pipetear con la boca y evitar el contacto de los reactivos y las muestras con la piel y con membranas mucosas.
- No fumar, comer, beber o usar cosméticos en áreas donde las muestras o los reactivos del kit están siendo usados.
- Usar guantes de látex cuando se utilicen las muestras y los reactivos. La contaminación microbiana de los reactivos o las muestras puede dar resultados erróneos.
- El manejo debe realizarse de acuerdo a los procedimientos definidos por las guías o regulaciones nacionales de seguridad de sustancias biopeligrosas.
- No utilizar los reactivos después de su fecha de caducidad que aparece en las etiquetas del kit.
- Todos los volúmenes indicados han de ser realizados de acuerdo con el protocolo. Los resultados óptimos del ensayo se obtienen solo cuando se utilizan pipetas y lectores de microplacas calibrados.
- No mezclar o usar componentes de kits con distinto número de lote. Se recomienda no intercambiar pocillos de distintas placas incluso si son del mismo lote. Los kits pueden haber sido enviados o almacenados bajo diferentes condiciones y las características de unión de las placas pueden resultar diferentes.
- Los compuestos químicos y los reactivos preparados o utilizados han de tratarse como residuos peligrosos de acuerdo con las guías o regulaciones nacionales de seguridad de sustancias biopeligrosas.
- Las hojas de los datos de seguridad de este producto están disponibles bajo pedido directamente a DRG Instruments GmbH.

4 COMPONENTES DEL KIT

4.1 Componentes del Kit

1. **Microtiterwells** (Placas multipocillo), 12 x 8 tiras separables, 96 pocillos; Pocillos recubiertos con anticuerpo anti-testosterona (monoclonal).
2. **Standard (Standard 0 - 6)**, (Estándar), 7 viales, 1 mL, listo para usar; Concentraciones: 0 – 10 – 40 – 80 – 160 – 400 – 1000 pg/mL
Conversión: $\text{pg/mL} \times 3,47 = \text{pmol/L}$
Los estándares son calibrados frente a espectrometría de masas.
Contiene conservante sin mercurio.
3. **Control Low & High** (Control), 2 viales, 1 mL, listo para usar; Referir los valores y rangos del control a la etiqueta del vial o a la Hoja de datos QC.
Contiene conservante sin mercurio.
4. **Enzyme Conjugate** (Conjugado enzimático), 1 vial, 14 mL, listo para usar, Testosterona conjugado con la Peroxidasa de rábano;
Contiene conservante sin mercurio.
5. **Substrate Solution** (Solución de sustrato), 1 vial, 25 mL, listo para usar, Tetrametilbencidina (TMB).
6. **Stop Solution** (Solución de parada), 1 vial, 14 mL, listo para usar, contiene 0.5 M H_2SO_4 , Evitar el contacto con la Solución de parada. Puede causar irritación y quemaduras en la piel.
7. **Wash Solution** (Solución de lavado), 1 vial, 30 mL (concentrado 40X), ver "Preparación de los Reactivos".

Nota: Se puede solicitar el *Standard 0* para la dilución de la muestra.

4.2 Equipamiento y material requerido pero no provisto

- Lector de microplacas calibrado (450 ± 10 nm) (ej. DRG Instruments Microtiter Plate Reader).
- Micropipetas de precisión variable calibradas.
- Papel absorbente.
- Agua destilada.

4.3 Almacenamiento y estabilidad del kit

Cuando se almacena a 2 °C - 8 °C, los reactivos sin abrir mantienen su reactividad hasta la fecha de caducidad. No utilizar los reactivos más allá de esta fecha.

Los reactivos abiertos han de almacenarse a 2 °C - 8 °C. Las placas multipocillo han de almacenarse a 2 °C - 8 °C. Una vez se ha abierto la bolsa hay que tener cuidado y cerrarla de nuevo.

Los kits abiertos conservan su actividad durante 2 meses si se almacenan como se ha descrito arriba.

4.4 Preparación de los Reactivos

Dejar que todos los reactivos y el número requerido de tiras alcancen la temperatura ambiente antes de usarse.

Wash Solution

Mezclar 30 mL de *Wash Solution* concentrada con 1170 mL de agua desionizada hasta un volumen final de 1200 mL.

La solución del lavado diluida es estable durante 2 semanas a temperatura ambiente.

4.5 Eliminación del Kit

La eliminación del kit debe realizarse de acuerdo con las leyes nacionales. En las hojas de datos de seguridad se proporciona información especial de este producto.

4.6 Kits de ensayo dañados

En caso de que exista cualquier daño severo del kit de ensayo o de sus componentes, ha de informarse por escrito a DRG, no más tarde de una semana después de recibir el kit. No deben utilizarse componentes dañados para llevar a cabo un ensayo. Han de almacenarse hasta que se encuentre una solución. Después de esto, deben ser eliminados de acuerdo con las leyes oficiales.

5 MUESTRAS

Evitar: comer, beber, tomar chicles o limpiarse los dientes, al menos 30 minutos antes de la recogida de la muestra. Por el contrario, se recomienda enjuagarse la boca a fondo con agua fría 5 minutos antes de la recogida de la muestra.

No recoger muestras cuando hay enfermedades bucales, inflamación o lesiones (contaminación por sangre) de la boca .

Si existe una contaminación por sangre visible en la muestra del paciente, ésta debe ser descartada, enjuagar el aparato de recogida de muestra con agua, esperar 10 minutos y recoger una nueva muestra.

Nota: No deben utilizarse muestras que contengan acida sódica.

5.1 Toma de muestras

Las muestras de saliva han de ser recogidas solamente utilizando aparatos especiales para recogida de muestras de saliva (vial y pajita), ej. SALI-TUBES 100 (REF SLV-4158).

No utilizar Salivette (hisopo de algodón) para recogida de muestra.

Debido al patrón de secreción cíclica de las hormonas esteroideas, es importante preocuparse por una recogida coordinada.

Para evitar resultados arbitrarios recomendamos la recogida de 5 muestras siempre en un período de 2 - 3 horas (recogida múltiple) preferentemente antes de una comida.

Debido a que la comida puede contener una cantidad significativa de hormonas esteroideas, las muestras han de recogerse preferentemente en ayuno. Si el ayuno fuera un problema, el período de recogida debe ser coordinado justo antes de comer o de cenar.

5.2 Almacenamiento de las muestras

Las muestras de saliva han de almacenarse entre 2 °C - 8 °C hasta una semana, y deben congelarse a -20 °C para períodos superiores; no es un problema el descongelado y congelado repetido.

Cada muestra ha de ser congelada, descongelada y centrifugada al menos una vez para separar las mucinas por centrifugación.

Cuando llegan las muestras al laboratorio, estas han de permanecer en el congelador al menos durante una noche. A la mañana siguiente las muestras congeladas se calientan hasta temperatura ambiente y se mezclan cuidadosamente.

Entonces, las muestras han de ser centrifugadas de 5 a 10 minutos (a 3000 - 2000 × g).

Ahora el sobrenadante incoloro es fácil de pipetear.

Si se ha de ensayar un conjunto de múltiples muestras, se han de mezclar (al menos con un ciclo de congelado, descongelado y centrifugación) una mezcla de 5 muestras a parte y realizar el ensayo de esta mezcla.

5.3 Dilución de las muestras

Si en un ensayo inicial, se encuentra una muestra que presenta valores mayores que el estándar mas concentrado, ha de diluirse con *Standard 0* y volver a ensayarse como se describe en el Procedimiento de Ensayo.

Para el cálculo de las concentraciones habrá que tener en cuenta el factor de dilución.

Ejemplo:

a) dilución 1:10: 10 µL saliva + 90 µL *Standard 0* (mezclar totalmente)

b) dilución 1:100: 10 µL dilución a) 1:10 + 90 µL *Standard 0* (mezclar totalmente)

6 PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

6.1 Consideraciones generales

- Todos los reactivos y muestras han de estar a temperatura ambiente antes de su uso. Todos los reactivos deben mezclarse sin formar espuma.
- Una vez se ha comenzado el ensayo deben completarse todos los pasos sin interrupción.
- Utilizar puntas de pipeta de plástico nuevas para cada estándar, control o muestra para evitar combinaciones cruzadas.
- La absorbancia es función del tiempo de incubación y la temperatura. Antes de comenzar el ensayo, se recomienda que todos los reactivos estén preparados, tapas removidas, todos los pocillos que se necesiten asegurados en recipiente, etc. Esto asegurará un tiempo similar para cada paso de pipeteo sin que haya interrupciones.
- Como regla general, la reacción enzimática es linealmente proporcional al tiempo y a la temperatura.

6.2 Procedimiento de ensayo

Cada uno debe incluir una curva de estándares.

El ensayo se debe llevar a cabo a temperatura ambiente (21 °C - 24 °C). Temperaturas más bajas provocarán un descenso apreciable en los valores de DO.

1. Asegurar el número deseado de pocillos en el recipiente.
2. Dispensar **75 µL** de cada **Standard, Control** y **muestras** con puntas nuevas en los pocillos adecuados.
3. Dispensar **100 µL** de **Enzyme Conjugate** a cada pocillo.
Mezclar totalmente durante 10 segundos. Es importante mezclar completamente en este paso.
4. Incubar durante **60 minutos** a temperatura ambiente.
5. Sacudir enérgicamente el contenido de los pocillos.
Lavar los pocillos **5 veces** con *Wash Solution* diluida (400 µL por pocillo). Realizar un golpe seco de los pocillos contra el papel absorbente para eliminar las gotas residuales.

Nota importante:

La sensibilidad y la precisión de este ensayo se ve marcadamente influenciada por la realización correcta del proceso de lavado!

6. Adicionar **200 µL** de **Substrate Solution** a cada pocillo.
7. Incubar durante **30 minutos** a temperatura ambiente.
8. Parar la reacción enzimática mediante la adición de **100 µL** de **Stop Solution** a cada pocillo.
9. Leer la OD a **450 ±10 nm** con un lector de microplacas **dentro de los 10 minutos** después de la adición de la *Stop Solution*.

6.3 Cálculo de los Resultados

1. Calcular los valores de absorbancia media para cada conjunto de estándares, controles y muestras de pacientes.
2. Construir una curva estándar mediante la representación de la absorbancia media obtenida para cada estándar frente a su concentración con el valor de absorbancia en el eje vertical (Y) y la concentración en el eje horizontal (X).
3. Usando el valor de absorbancia media de cada muestra determinar la concentración correspondiente a partir de la curva estándar.
4. Método automatizado: Los resultados en las instrucciones de uso se han calculado automáticamente usando una curva de regresión 4 Parámetros. (4 Parámetros Rodbard o 4 Parámetros Marquardt son los métodos preferidos.) Otras funciones de regresión darán lugar a resultados sensiblemente diferentes.
5. La concentración de las muestras puede leerse directamente de la curva de estándares. Las muestras con concentraciones superiores al mayor estándar han de diluirse. Para el cálculo de las concentraciones hay que tener en cuenta el factor de dilución.

6.3.1 Ejemplo de una Curva Estándar Típica

Los siguientes datos son solamente para la explicación y **no** pueden ser utilizados en lugar de los datos generados en el momento del ensayo.

Estándar	Unidades Ópticas (450 nm)
Standard 0 (0 pg/mL)	1,95
Standard 1 (10 pg/mL)	1,75
Standard 2 (40 pg/mL)	1,48
Standard 3 (80 pg/mL)	1,15
Standard 4 (160 pg/mL)	0,80
Standard 5 (400 pg/mL)	0,43
Standard 6 (1000 pg/mL)	0,15

7 VALORES ESPERADOS

Se recomienda encarecidamente que cada laboratorio determine sus valores normales e inusuales.

En un estudio llevado a cabo con individuos aparentemente sanos, usando el DRG Salivary Testosterone ELISA, se obtuvieron los siguientes valores:

Pruebas se muestreaban por la mañana.

Tabla 1:

Población	n	Edad (años)	Media (pg/mL)	Mediana (pg/mL)	Percentil 2,5 - 97,5 (pg/mL)	Rango (Min. - Max.) (pg/mL)
Hombres	174	13 - 71	71,5	64,1	10,0 - 169,7	6,1 - 230,9
Mujeres	67	15 - 73	19,8	18,9	3,5 - 44,9	3,1 - 50,2

Tabla 2:

Población	n	Edad (años)	Media (pg/mL)	Mediana (pg/mL)	Percentil 2,5 - 97,5 (pg/mL)	Rango (Min. - Max.) (pg/mL)
Hombres	8	14	30,7	19,6	13,8 - 59,0	13,5 - 59,02
	22	15	47,3	43,8	12,0 - 125,5	8,23 - 131,1
	10	16	69,9	68,9	7,5 - 152,3	6,1 - 167,8
	14	17	100,3	113,4	54,1 - 157,3	53,7 - 170,6
	12	18	125,1	135,0	61,3 - 209,7	53,7 - 230,9
	5	19	95,5	87,2	50,8 - 156,1	46,8 - 162,9
	15	21 - 25	96,4	93,3	56,1 - 168,1	52,9 - 186,5
	4	26 - 30	96,7	81,6	70,1 - 148,9	69,9 - 153,7
	2	31 - 35	74,7	74,7	54,4 - 95,0	53,3 - 96,1
	5	36 - 40	81,8	80,2	48,9 - 118,4	45,8 - 122,2
	12	46 - 50	64,3	56,8	28,6 - 127,4	23,03 - 127,4
	12	51 - 55	61,1	72,4	28,1 - 81,4	28,1 - 81,4
	4	56 - 60	79,7	79,7	68,5 - 90,8	68,5 - 90,8

Ya que niveles de testosterona tienen ciclos diurnales recomendamos que las pruebas se muestrean al mismo hora cada día.

8 CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda usar muestras control de acuerdo con las leyes estatales y federales. El uso de muestras control se recomienda para asegurar la validez diaria de los resultados. Usar controles tanto a niveles normal como patológico.

Los controles y los correspondientes resultados del Laboratorio de control de calidad están fijados en el certificado de control de calidad que acompañan al kit. Los valores y los rangos fijados en la hoja del control de calidad se refieren siempre al kit actual y deben usarse para la comparación directa de los resultados.

Es recomendable también hacer uso de programas de Aseguramiento de la Calidad nacionales o internacionales para asegurar la exactitud de los resultados.

Utilizar métodos estadísticos apropiados para el análisis de los valores y tendencia de los controles. Si los resultados del ensayo no se ajustan a los rangos aceptables establecidos en los controles, los resultados obtenidos de los pacientes han de considerarse inválidos.

En este caso, por favor comprobar las siguientes áreas técnicas: Pipeteo y tiempo empleado, fotómetro, fecha de caducidad de los reactivos, condiciones de almacenamiento e incubación, métodos de aspiración y lavado.

Después de comprobar los asuntos arriba mencionado sin encontrar ningún error, contactar con su distribuidor o con DRG directamente.

9 CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

9.1 Rango dinámico del ensayo

El rango del ensayo se encuentra entre 0,94 - 1000 pg/mL.

9.2 Especificidad de los Anticuerpos (Reactividad Cruzada)

Consultar el manual de usuario en inglés.

9.3 Sensibilidad

El estudio de sensibilidad se diseñó de acuerdo con la normativa EP17-A2 del CLSI.

El límite del blanco (LoB) es 0,94 pg/mL.

El Límite de Detección (LoD) es 2,63 pg/mL.

El Límite de Cuantificación (LoQ) es 10,07 pg/mL.

Para información sobre

9.4 Precisión

9.5 Recuperación

9.6 Linealidad

9.7 Comparativa de métodos

por favor consulte la versión detallada en inglés de las Instrucciones de Uso.

10 LIMITACIONES DE USO

Cualquier manipulación inadecuada de las muestras o modificaciones del ensayo pueden influenciar los resultados.

Para la obtención de resultados fiables y reproducibles en el desarrollo del ensayo es necesario un conocimiento completo de las instrucciones del interior del paquete y de acuerdo a las buenas prácticas de laboratorio.

10.1 Sustancias que pueden interferir

Una contaminación con sangre de más de 0,16 % en las muestras de saliva afectará los resultados, y puede verse normalmente a simple vista.

Las concentraciones de acida sódica $\geq 0,02$ % interfieren en el ensayo y pueden conducir a falsos resultados.

10.2 Interferencias con drogas

Hasta ahora no se han encontrado sustancias (drogas) conocidas por nosotros, que tengan influencia en la medida de testosterona en una muestra.

10.3 Efecto Gancho-Dosis-Elevada

No se ha observado efecto gancho en este ensayo.

11 ASPECTOS LEGALES

11.1 Fiabilidad de los Resultados

El ensayo debe realizarse exactamente de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Mas aún, el usuario debe ajustarse estrictamente a las reglas BPL (Buenas Prácticas de Laboratorio) o a otros estándares y/o leyes nacionales aplicables. Esto es especialmente relevante para el uso de reactivos control. Es importante incluir siempre, dentro del procedimiento de ensayo, un número suficiente de controles para validar la exactitud y la precisión del ensayo.

Los resultados del ensayo son válidos sólo si todos los controles se encuentran dentro de los rangos especificados y si todos los otros parámetros del ensayo se encuentran dentro de las especificaciones dadas para el ensayo. En caso de alguna duda o inquietud, por favor, contactar con DRG.

11.2 Consecuencias Terapéuticas

Las consecuencias terapéuticas nunca deben basarse sólo en los resultados de laboratorio incluso si todos los resultados del ensayo están de acuerdo con los asuntos fijados en el punto 11.1. Cualquier resultado de laboratorio es solamente una parte del cuadro clínico de un paciente.

Solamente en los casos donde los resultados de laboratorio están en acuerdo con todo el cuadro clínico de un paciente, se pueden derivar consecuencias terapéuticas.

Nunca deben derivarse consecuencias terapéuticas a partir de solamente el resultado obtenido en el ensayo

11.3 Responsabilidad












Cualquier modificación del kit y/o cambio o mezcla de cualquier componente procedentes de kits de lotes diferentes puede afectar negativamente a los resultados esperados y en la validez de todo el test. Esas modificaciones y/o cambios invalidan cualquier reclamación de reposición.

Las reclamaciones emitidas debidas a una mala interpretación de los resultados de laboratorio por parte del comprador referidos al punto 11.2 son también inválidas. A pesar de todo, en el caso de cualquier reclamación, la responsabilidad del fabricante no excede el valor del kit. Cualquier daño provocado al kit durante su transporte no está sujeto a la responsabilidad del fabricante.

12 REFERENCES / LITERATURE

1. Mulhall JP, et al. (2004); Effect of testosterone supplementation on sexual function in hypogonadal men with erectile dysfunction, *Urology* 63, 348-352
2. Grinspoon S et al. (2000); Effects of hypogonadism and testosterone administration on depression indices in HIV-infected men, *J Clin. Endocrinol Metab.* 85, 60-65
3. Leder BZ, et al. (2004): Effect of aromatase inhibition in elderly men with low or borderline-low serum testosterone levels, *J Clin Endocrinol Metab.* 89, 1174-1180
4. Bunch T. et al. (2002): Pituitary radiographic abnormalities and clinical correlates of hypogonadism in elderly males presenting with erectile dysfunction, *Aging Male.* 5, 38-46
5. Ruutinen K. et al. (1987): Salivary testosterone in hirsutism: correlations with serum testosterone and the degree of hair growth, *J Clin Endocrinol Metab.* 64, 1015-1020
6. Cserepes E. et al. (2002): Ovarian steroid cell tumor and a contralateral Ovarian thecoma in a postmenopausal woman with severe hyperandrogenism, *Gynecol Endocrinol.* 16, 213-216
7. Baldwin L. J. et al. (2004): Virilisation in a case of transitional cell carcinoma of the ovary, *J Clin Pathol.* 57, 1331-1332
8. Blumberg J. et al. (1991): Testicular tumors in congenital adrenal hyperplasia: steroid measurements from adrenal and spermatic veins, *J Clin Endocrinol Metab.* 73, 1129-1133.
9. Cardoso EM et al. (2011): Salivary testosterone for the diagnosis of androgen deficiency in end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant.* 26; 677-83
10. Arregger AL et al. 2007: Salivary testosterone: a reliable approach to the diagnosis of male hypogonadism. *Clin Endocrinol (Oxf)* 67; 656-62
11. Ostatníková D et al. 2002: Salivary testosterone levels in preadolescent children. *BMC Pediatr.* 3; 2:5
12. Büttler RM et al. 2016: Reference values for salivary testosterone in adolescent boys and girls determined using Isotope-Dilution Liquid-Chromatography Tandem Mass Spectrometry (ID-LC-MS/MS). *Clin Chim Acta.* 456; 15-8
13. Karrer-Voegeli S. et al. 2009: Androgen dependence of hirsutism, acne, and alopecia in women: retrospective analysis of 228 patients investigated for hyperandrogenism. *Medicine (Baltimore).* 88; 32-45

SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Italiano	Español	Français
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conformità europea	Conformidad europea	Conformité normes européennes
	Consult instructions for use *	Gebrauchsanweisung beachten *	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso	Consulter les instructions d'utilisation
	<i>In vitro</i> diagnostic medical device *	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum *	Diagnostica in vitro	Diagnóstico in vitro	Diagnostic in vitro
	Catalogue number *	Artikelnummer *	No. di Cat.	No de catálogo	Référence
	Batch code *	Chargencode *	Lotto no	Número de lote	No. de lot
	Contains sufficient for <n> tests *	Ausreichend für <n> Prüfungen *	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests
	Temperature limit *	Temperaturbegrenzung *	Temperatura di conservazione	Temperatura de conservación	Température de conservation
	Use-by date *	Verwendbar bis *	Data di scadenza	Fecha de caducidad	Date limite d'utilisation
	Manufacturer *	Hersteller *	Fabbricante	Fabricante	Fabricant
	Caution *	Achtung *			
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Solo a scopo di ricerca	Sólo para uso en investigación	Seulement dans le cadre de recherches
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertreiber	Distributore	Distribuidor	Distributeur
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Conditionnement
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen / Anzahl	Volume / Quantità	Volumen / Número	Volume / Quantité
<i>Microtiterwells</i>	Microtiterwells	Mikrotiterwells	Micropozzetti	Placas multipocillo	Plaques de micro-titration
<i>Antiserum</i>	Antiserum	Antiserum	Antisiero	Antisuero	Antisérum
<i>Enzyme Conjugate</i>	Enzyme Conjugate	Enzymkonjugat	Tracciante enzimatico	Conjugado enzimático	Conjugué enzymatique
<i>Enzyme Complex</i>	Enzyme Complex	Enzymkomplex	Complesso enzimatico	Complejo enzimático	Complexe enzymatique
<i>Substrate Solution</i>	Substrate Solution	Substratlösung	Soluzione di substrato	Solución de sustrato	Solution substrat
<i>Stop Solution</i>	Stop Solution	Stopplösung	Soluzione d'arresto	Solución de parada	Solution d'arrêt
<i>Zero Standard</i>	Zero Standard	Nullstandard	Standard zero	Estándar cero	Zero Standard
<i>Standard</i>	Standard	Standard	Standard	Estándar	Standard
<i>Control</i>	Control	Kontrolle	Controllo	Control	Contrôle
<i>Assay Buffer</i>	Assay Buffer	Assaypuffer	Tampone del test	Tampón de ensayo	Tampon d'essai
<i>Wash Solution</i>	Wash Solution	Waschlösung	Soluzione di lavaggio	Solución de lavado	Solution de lavage
<i>1N NaOH</i>	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH (idrossido di sodio 1N)	1N NaOH	1N NaOH
<i>1 N HCl</i>	1 N HCl	1 N HCl		1 N HCl	1N HCl
<i>Sample Diluent</i>	Sample Diluent	Probenverdünnungs-medium	Diluyente dei campioni	Solución para dilución de la muestra	Solution pour dilution de l'échantillon
<i>Conjugate Diluent</i>	Conjugate Diluent	Konjugatverdünnungs-medium	Diluyente del tracciante	Solución para dilución del conjugado	Solution pour dilution du conjugué