

Instructions for use / Gebrauchsanweisung**Testosterone ELISA**

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit

1. INTENDED USE

The **Testosterone ELISA** is an enzyme immunoassay for the quantitative *in vitro* diagnostic measurement of testosterone in serum or plasma (EDTA, lithium heparin or citrate plasma).

1.1 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. Free Testosterone and albumin-bound Testosterone are considered bioactive.

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, prostate cancer or intake of anabolic steroids.

Male 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: primary hypogonadism (e.g. Klinefelter's syndrome), testicular feminization, orchidectomy, congenital cryptorchidism, enzymatic defects, anorexia, liver cirrhosis, drug abuse, or prepubescent intake of anabolic steroids.

In adult women, excess testosterone production results in varying degrees of virilization, including hirsutism, acne, oligo-amenorrhea. Increased testosterone levels may be caused by polycystic ovaries, ovarian and adrenal tumors, adrenal hyperplasia, Cushing's syndrome, or congenital adrenal hyperplasia. Decreased testosterone in females can be caused by primary or secondary insufficiency of the ovaries, intake of ovulation blockers, liver cirrhosis, drug abuse, Addison's disease or anorexia. Symptoms of low testosterone may include decline in libido and nonspecific mood changes.

2. PRINCIPLE OF THE TEST

The Testosterone ELISA 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 a unique antigenic site of the testosterone molecule.

During the first incubation, the testosterone in the added sample competes with the added enzyme conjugate, which is testosterone conjugated to horseradish peroxidase, for binding to the coated antibody.

After a washing step to remove all unbound substances, the solid phase is incubated with the substrate solution. The colorimetric reaction is stopped by addition of stop solution, and optical density (OD) of the resulting yellow product is measured. The intensity of color is inversely proportional to the concentration of the analyte in the sample.

A standard curve is constructed by plotting OD values against concentrations of standards, and concentrations of unknown samples are determined using this standard curve.

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 coloured. 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 (20 °C to 26 °C) before starting the test. Temperature will affect the optical density 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 microtiter plate 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 the manufacturer.

4. REAGENTS

4.1 Reagents provided

AA E-1331



Microtiterwells

Content: 12x8 (break apart) strips, 96 wells;
Wells coated with anti-testosterone antibody (monoclonal).

Standards – ready to use

Cat. no.	Component	Standard	Concentration	Volume/Vial
AA E-1301	STANDARD A	Standard A	0 ng/ml	1 ml
AA E-1302	STANDARD B	Standard B	0.2 ng/ml	1 ml
AA E-1303	STANDARD C	Standard C	0.5 ng/ml	1 ml
AA E-1304	STANDARD D	Standard D	1.0 ng/ml	1 ml
AA E-1305	STANDARD E	Standard E	2.0 ng/ml	1 ml
AA E-1306	STANDARD F	Standard F	6.0 ng/ml	1 ml
AA E-1307	STANDARD G	Standard G	16.0 ng/ml	1 ml

Conversion: 1 ng/ml = 3.467 nmol/l

Content: Contain non-mercury preservative.

AA E-1340



Enzyme Conjugate – ready to use

Content: Testosterone conjugated with horseradish peroxidase;
Contains non-mercury preservative.

Volume: 1 x 25 ml

SA E-0055



Substrate Solution – ready to use

Content: Tetramethylbenzidine (TMB).

Volume: 1 x 25 ml

FR E-0080



Stop Solution – ready to use

Content: Contains 0.5 M H₂SO₄.

Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.

Volume: 1 x 14 ml

FR E-0030**WASH-CONC 40x****Wash Solution – 40X concentrated**

Volume: 1 x 30 ml;

See "Reagent Preparation".

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

4.2 Materials required but not provided

- A calibrated microtiter plate reader (450 nm, with reference wavelength at 620 nm to 630 nm)
- Calibrated variable precision micropipettes
- Absorbent paper
- Distilled water
- Timer
- Graph paper or software for data reduction

4.3 Storage Conditions

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

Opened kits retain activity for 8 weeks if stored as described above.

4.4 Reagent Preparation

Bring all reagents and required number of strips to room temperature (20 °C to 26 °C) prior to use.

Wash Solution

Add distilled water to the 40X concentrated Wash Solution.

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

The diluted Wash Solution is stable for 1 week at room temperature.

4.5 Disposal of the Kit

The disposal of the kit and all used materials/reagents must be performed according to the national regulations. Special information for this product is given in the Safety Data Sheet, section 13.

4.6 Damaged Test Kits

In case of any damage to the test kit or components, the manufacturer must be informed in writing, at the latest one week after receiving the kit. 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 of according to the official regulations.

5. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Serum or plasma (EDTA, lithium heparin or citrate plasma) can be used in this assay.

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

In general, it should be avoided to use haemolytic, icteric, or lipaemic specimens. For further information refer to chapter "*Interfering Substances*".

5.1 Specimen Collection**Serum:**

Collect blood by venipuncture (e.g. Sarstedt Monovette for serum), allow to clot, and separate serum by centrifugation at room temperature. Do not centrifuge before complete clotting has occurred. Patients receiving anticoagulant therapy may require increased clotting time.

Plasma:

Whole blood should be collected into centrifuge tubes containing anticoagulant (e.g. Sarstedt Monovette with the appropriate plasma preparation) and centrifuged immediately after collection.

5.2 Specimen Storage and Preparation

Specimens should be capped and may be stored for up to 7 days at 2 °C to 8 °C prior to assaying.

Specimens stored for a longer time (up to 12 months) should be frozen only once at -20 °C prior to assay.

Thawed samples should be inverted several times prior to testing.

5.3 Specimen Dilution

If in an initial assay, a specimen is found to contain more analyte than the highest standard, the specimen can be diluted with *Standard A* 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 sample + 90 µl *Standard A* (mix thoroughly)

b) dilution 1:100: 10 µl dilution a) 1:10 + 90 µl *Standard A* (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.
- Optical density 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.

1.	Secure the desired number of Microtiter wells in the frame holder.
2.	Dispense 25 µl of each Standard , control and sample <u>with new disposable tips</u> into appropriate wells.
3.	Dispense 200 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.	Rinse the wells 3 times with 400 µl diluted <i>Wash Solution</i> per well, if a plate washer is used. – OR – Briskly shake out the contents of the wells. Rinse the wells 3 times with 300 µl diluted <i>Wash Solution</i> per well for manual washing. Strike the wells sharply on absorbent paper 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 15 minutes at room temperature.
8.	Stop the enzymatic reaction by adding 100 µl of Stop Solution to each well.
9.	Determine the optical density of the solution in each well at 450 nm (reading) and at 620 nm to 630 nm (background subtraction, recommended) with a microtiter plate reader. It is recommended that the wells be read within 10 minutes after adding the <i>Stop Solution</i> .

6.3 Calculation of Results

1. Calculate the average optical density (OD) values for each set of standards, controls and patient samples.
2. Using graph paper, construct a standard curve by plotting the mean OD obtained from each standard against its concentration with OD value on the vertical (Y) axis and concentration on the horizontal (X) axis.
3. Using the mean OD 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 > 16.0 ng/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 Density (450 nm)
Standard A (0 ng/ml)	2.10
Standard B (0.2 ng/ml)	1.71
Standard C (0.5 ng/ml)	1.44
Standard D (1.0 ng/ml)	1.18
Standard E (2.0 ng/ml)	0.89
Standard F (6.0 ng/ml)	0.46
Standard G (16.0 ng/ml)	0.24

7. EXPECTED NORMAL VALUES

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

In a study conducted with apparently healthy adults, using the Testosterone ELISA the following data were observed:

Population	5% Percentile	95% Percentile
Males	2.0 ng/ml	6.9 ng/ml
Females	0.26 ng/ml	1.22 ng/ml

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.

8. QUALITY CONTROL

Good laboratory practice requires that controls be run with each standard 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 the manufacturer directly.

9. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

9.1 Assay Dynamic Range

The range of the assay is between 0.15 ng/ml – 16.0 ng/ml.

9.2 Specificity of Antibodies (Cross-Reactivity)

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

Analyte	Cross-Reactivity (%)
Testosterone	100.0
DHT	12.9
5 α -Dihydrotestosterone	0.8
Androstenedione	0.9
11 β -Hydroxytestosterone	3.3
17 α -Methyltestosterone	0.1
19-Nortestosterone	3.3
DHEA	0.3
DHEA-S	< 0.1
Epitestosterone	< 0.1
Progesterone	< 0.1
Cortisol	< 0.1
Estrone	< 0.1
Estradiol	< 0.1
Estriol	< 0.1
Danazol	< 0.1

9.3 Detection Capability

Limit of Blank (LOB): 0.09 ng/ml

Limit of Detection (LOD): 0.15 ng/ml

Limit of Quantification (LOQ): 0.21 ng/ml

9.4 Reproducibility

9.4.1 Intra-Assay

The within assay variability is shown below:

Sample	n	Mean (ng/ml)	CV (%)
1	20	0.7	4.2
2	20	4.9	3.3
3	20	11.3	3.3

9.4.2 Inter-Assay

The between assay variability is shown below:

Sample	n	Mean (ng/ml)	CV (%)
1	12	0.8	9.9
2	12	5.2	6.7
3	12	11.4	4.7

9.5 Recovery

Samples have been spiked by adding testosterone solutions with known concentrations.

The recovery (%) was calculated by multiplying the ratio of measured and expected values with 100.

	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Concentration (ng/ml)	1.1	6.1	11.6
Average Recovery (%)	109.2	100.5	109.1
Range of Recovery (%)	from	86.9	92.2
	to	110.7	110.1

9.6 Linearity

Samples were measured undiluted and in serial dilutions with Standard A. The recovery (%) was calculated by multiplying the ratio of expected and measured values with 100.

	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Concentration (ng/ml)	1.1	6.1	11.3
Average Recovery (%)	95.5	101.5	104.9
Range of Recovery (%)	from	86.1	89.0
	to	106.6	110.6

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.

10.1 Interfering Substances

Hemoglobin (up to 4 mg/ml), bilirubin (up to 0.25 mg/ml) and triglyceride (up to 7.5 mg/ml) have no influence on the assay 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

A High-Dose-Hook Effect is not known for competitive assays.

11. LEGAL ASPECTS

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 the manufacturer.

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.

12. REFERENCES/LITERATURE

1. Smith LB and Walker WH. The regulation of spermatogenesis by androgens. Semin Cell Dev Biol. 2014, 30, 2-13.
2. Zirkin BR and Papadopoulos V. Leydig cells: formation, function, and regulation. Biology of Reproduction, 2018, 99(1), 101-111.
3. Hammond GL. Plasma steroid-binding proteins: primary gatekeepers of steroid hormone action. J Endocrinol. 2016, 230, R13-25.
4. Durán-Pastén ML, Fiordeliso T. GnRH-Induced Ca(2+) signaling patterns and gonadotropin secretion in pituitary gonadotrophs. Functional adaptations to both ordinary and extraordinary physiological demands. Front Endocrinol (Lausanne). 2013,4, 127.
5. Santi D et al. Follicle-stimulating Hormone (FSH) Action on Spermatogenesis: A Focus on Physiological and Therapeutic Roles. J Clin Med. 2020, 9(4), 1014, 1-28.
6. Livingston M, Kalansooriya A and Hartland AJ. Serum testosterone levels in male hypogonadism: Why and when to check—A review. Int J Clin Pract. 2017, 71(11) 1-9.
7. Semet M et al. The impact of drugs on male fertility: a review. Andrology. 2017, 5(4), 640-663.
8. Basaria S. Male hypogonadism. Lancet. 2014, 383, 1250-63.
9. Rodprasert W et al. Hypogonadism and Cryptorchidism. Front Endocrinol. 2020, 10, (906), 1-27.
10. Bode D, Seehusen DA, and Baird D. Hirsutism in women. Am Fam Physician. 2012,85(4), 373-80.
11. Soman M et al. Serum androgen profiles in women with premature ovarian insufficiency: a systematic review and meta-analysis. Menopause: The Journal of The North American Menopause Society 2018, 26, 78-93.

Symbols:

	Storage temperature		Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Use-by date		Batch code		For in-vitro diagnostic use only!
	Consult instructions for use		Content		CE marking of conformity
	Caution		Catalogue number		Distributor
	Date of manufacture				

1. ZWECKBESTIMMUNG

Der **Testosterone ELISA** wird zur quantitativen Bestimmung von Testosteron in Serum oder Plasma (EDTA-, Lithium-Heparin- oder Zitratplasma) eingesetzt.

Nur für In-vitro Diagnostik.

2. TESTPRINZIP

Der 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 definierte Antikörper-Bindungsstelle des Testosteron-Moleküls gerichtet ist.

Während der ersten Inkubation konkurriert das Testosteron in der zugegebenen Probe mit dem Enzymkonjugat (Testosteron, konjugiert an Meerrettichperoxidase) um die freien Bindungsstellen auf den beschichteten Wells.

Nach einem Waschschrift, um alle ungebundenen Substanzen zu entfernen, wird die feste Phase mit der Substratlösung inkubiert. Die Farbreaktion wird durch die Zugabe der Stopplösung beendet und die optische Dichte (OD) des resultierenden gelben Produktes gemessen. Die Intensität der Farbe ist umgekehrt proportional zur Konzentration des Analyten in der Probe.

Durch Auftragen der OD-Werte gegen die Konzentrationen der Standards wird eine Standardkurve erstellt und die Konzentrationen der unbekannten Proben werden anhand dieser Standardkurve bestimmt.

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 Sicherheitsdatenblatt.
- 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 den Vorschriften einer entsprechenden nationalen Gefahrenstoff-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 Gefahrenstoffvorschriften wie gefährlicher Abfall behandelt werden.
- Sicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt vom Hersteller erhältlich.

4. BESTANDTEILE DES KITS

4.1 Kitinhalt

AA E-1331



Microtiterwells

Inhalt:

96 Wells, 12x8 Wells (einzeln brechbar);

Mit anti-Testosteron-Antikörper (monoklonal) beschichtet.

Standards – gebrauchsfertig

Artikelnr.	Komponente	Standard	Konzentration	Volumen/Fläschchen
AA E-1301	STANDARD A	Standard A	0 ng/ml	1 ml
AA E-1302	STANDARD B	Standard B	0,2 ng/ml	1 ml
AA E-1303	STANDARD C	Standard C	0,5 ng/ml	1 ml
AA E-1304	STANDARD D	Standard D	1,0 ng/ml	1 ml
AA E-1305	STANDARD E	Standard E	2,0 ng/ml	1 ml
AA E-1306	STANDARD F	Standard F	6,0 ng/ml	1 ml
AA E-1307	STANDARD G	Standard G	16,0 ng/ml	1 ml

Umrechnung: 1 ng/ml = 3,467 nmol/l

Inhalt: Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.

AA E-1340 CONJUGATE Enzyme Conjugate (Enzymkonjugat) – gebrauchsfertig

Inhalt: Testosteron mit Meerrettichperoxidase konjugiert;

Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.

Volumen: 1 x 25 ml

SA E-0055 SUBSTRATE Substrate Solution (Substratlösung) gebrauchsfertig

Inhalt: Substratlösung TMB.

Volumen: 1 x 25 ml

FR E-0080 STOP-SOLN Stop Solution (Stopplösung) – gebrauchsfertig

Inhalt: Enthält 0,5 M H₂SO₄;

Kontakt mit der Stopplösung vermeiden! Kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.

Volumen: 1 x 14 ml

FR E-0030 WASH-CONC 40x Wash Solution (Waschlösung) – 40X konzentriert

Volumen: 1 x 30 ml;

Siehe "Vorbereitung der Reagenzien".

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

4.2 Erforderliche aber nicht enthaltene Geräte und Materialien

- Kalibriertes Mikrotiterplattenlesegerät (450 nm, mit Referenzwellenlänge bei 620 nm bis 630 nm)
- Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipetten
- Saugfähiges Papier
- Destilliertes Wasser
- Laborwecker
- Millimeterpapier oder Software zur Datenauswertung

4.3 Lagerung und Haltbarkeit des Kits

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

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

Die Mikrotiterwells sollten bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden. Der einmal geöffnete Folienbeutel sollte stets sehr sorgfältig wieder verschlossen werden. Unter den beschriebenen Lagerbedingungen behalten geöffnete Kits 8 Wochen ihre Reaktivität.

4.4 Vorbereitung der Reagenzien

Alle Reagenzien sowie die benötigte Anzahl von Wells sollen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur (20 °C bis 26 °C) 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 1 Woche stabil.

4.5 Entsorgung des Kits

Die Entsorgung des Kits und aller verwendeten Materialien/Reagenzien muss gemäß den nationalen gesetzlichen Vorschriften erfolgen. Spezielle Informationen für dieses Produkt finden Sie im Sicherheitsdatenblatt, Abschnitt 13.

4.6 Beschädigte Testkits

Im Falle einer Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss der Hersteller in schriftlicher Form spätestens eine Woche nach Erhalt des Kits informiert werden. Beschädigte Einzelkomponenten dürfen nicht für den Testlauf verwendet werden. Sie müssen aufbewahrt werden, bis eine endgültige Lösung gefunden wurde. Danach sollten Sie gemäß den offiziellen Richtlinien entsorgt werden.

5. PROBENVORBEREITUNG

Serum oder Plasma (EDTA-, Lithium-Heparin- oder Zitratplasma) kann in diesem Test als Probenmaterial eingesetzt werden.

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

Generell sollte die Verwendung von hämolytischen, ikterischen oder lipämischen Proben vermieden werden. Weitere Informationen finden Sie im Kapitel „Interferenzen“.

5.1 Probenentnahme

Serum:

Blut durch Venenpunktion entnehmen (z.B. mit Sarstedt Monovette für Serum), gerinnen lassen und das Serum durch Zentrifugation bei Raumtemperatur abtrennen. Vor der Zentrifugation muss die Gerinnung vollständig abgeschlossen sein. Bei Patienten, die Antikoagulantien erhalten, kann die Gerinnungszeit länger dauern.

Plasma:

Die Blutentnahme erfolgt mit Röhrchen, die ein Antikoagulanzen enthalten (z.B.: Sarstedt Monovette – mit entsprechender Plasma-Präparierung). Das Plasma wird als Überstand nach einer Zentrifugation gewonnen.

5.2 Probenaufbewahrung

Proben sollten stets gut verschlossen sein und können vor Testbeginn bis zu 7 Tage bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden.

Für eine längere Aufbewahrung (bis zu 12 Monaten) sollten die Proben eingefroren bei -20 °C bis zum Testbeginn gelagert werden. Nur einmal einfrieren. Aufgetaute Proben sollten vor Testbeginn vorsichtig durchmischt werden, ohne Schaumbildung.

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 A* weiter verdünnt und nochmals bestimmt werden. Die Verdünnung muss jedoch bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

Beispiel:

- a) Verdünnung 1:10: 10 µl Probe + 90 µl *Standard A* (gründlich mischen)
- b) Verdünnung 1:100: 10 µl Verdünnung a) 1:10 + 90 µl *Standard A* (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.

1.	Die benötigte Anzahl Wells in der Halterung befestigen.
2.	Je 25 µl Standard , Kontrolle und Probe mit neuen Plastikspitzen in die entsprechenden Wells geben.
3.	200 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.	Wells 3-mal mit 400 µl verdünnter <i>Wash Solution</i> waschen, falls ein Waschautomat verwendet wird. – ODER – Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln. Wells 3-mal mit 300 µl verdünnter <i>Wash Solution</i> waschen bei manueller Durchführung. 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.	15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
8.	Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 100 µl Stop Solution in jedes Well abstoppen.
9.	Die Optische Dichte (OD) bei 450 nm (Messung) und 620 nm bis 630 nm (Abzug des Hintergrundes, empfohlen) mit einem Mikrotiterplattenleser innerhalb von 10 Minuten nach Zugabe der <i>Stop Solution</i> bestimmen.

6.3 Ergebnisermittlung

- Die durchschnittlichen Werte der Optischen Dichte (OD) für jedes Set von Standards, Kontrollen und Patientenproben bestimmen.
- 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.
- Unter Verwendung der mittleren OD wird für jede Probe die entsprechende Konzentration aus der Standardkurve ermittelt.
- 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.
- 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 ELISA gezeigt. Diese Werte sollten **nicht** zur Berechnung von Patientendaten verwendet werden.

Standard	Optische Dichte (450 nm)
Standard A (0 ng/ml)	2,10
Standard B (0,2 ng/ml)	1,71
Standard C (0,5 ng/ml)	1,44
Standard D (1,0 ng/ml)	1,18
Standard E (2,0 ng/ml)	0,89
Standard F (6,0 ng/ml)	0,46
Standard G (16,0 ng/ml)	0,24

7. ERWARTETE WERTE

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

In einer Studie mit dem Testosterone ELISA wurden die Proben von scheinbar gesunden Erwachsenen untersucht. Dabei ergaben sich folgende Werte:

Population	5% Perzentile	95% Perzentile
Männer	2,0 ng/ml	6,9 ng/ml
Frauen	0,26 ng/ml	1,22 ng/ml

Die mit diesem Testkit erzielten Ergebnisse sollten niemals als alleinige Grundlage für therapeutische Konsequenzen dienen. Die Ergebnisse müssen zusammen mit anderen klinischen Befunden und diagnostischen Tests des Patienten interpretiert 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 dem Hersteller in Verbindung.

9. ASSAY-CHARAKTERISTIKA

9.1 Messbereich

Der Messbereich des Testes liegt zwischen 0,15 ng/ml – 16,0 ng/ml.

9.2 Spezifität der Antikörper (Kreuzreaktivität)

Entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Version der Gebrauchsanweisung.

9.3 Detektionsfähigkeit

Der „Limit of Blank“ (LoB) ist 0,09 ng/ml.

Die Nachweisgrenze (LoD) ist 0,15 ng/ml.

Die Quantifizierungsgrenze (LoQ) ist 0,21 ng/ml.

Die Daten zu:

9.4 Reproduzierbarkeit (Präzision)

9.5 Wiederfindung

9.6 Linearität

entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Version der Gebrauchsanweisung.

10. GRENZEN DES TESTS

Zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse werden erzielt, wenn das Testverfahren mit vollständigem Verständnis der Anweisungen in der Gebrauchsanleitung und unter Befolgung der GLP (Good Laboratory Practice)-Richtlinien durchgeführt wird.

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

10.1 Interferenzen

Hämoglobin (bis zu 4 mg/ml), Bilirubin (bis zu 0,25 mg/ml) und Triglyceride (bis zu 7,5 mg/ml) haben keinen Einfluss auf das Testergebnis.

10.2 Beeinflussung durch Medikamente

Bislang sind uns keine Substanzen (Medikamente) bekannt geworden, die einen Einfluss auf die Bestimmung von Testosteron in einer Probe haben.

10.3 High-Dose-Hook Effekt

Ein Hook-Effekt ist für kompetitive Assays nicht bekannt.

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 dem Hersteller 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.

12. REFERENZEN/LITERATUR

1. Smith LB and Walker WH. The regulation of spermatogenesis by androgens. *Semin Cell Dev Biol.* 2014, 30, 2-13.
2. Zirkin BR and Papadopoulos V. Leydig cells: formation, function, and regulation. *Biology of Reproduction*, 2018, 99(1), 101-111.
3. Hammond GL. Plasma steroid-binding proteins: primary gatekeepers of steroid hormone action. *J Endocrinol.* 2016, 230, R13-25.
4. Durán-Pastén ML, Fiordeliso T. GnRH-Induced Ca(2+) signaling patterns and gonadotropin secretion in pituitary gonadotrophs. Functional adaptations to both ordinary and extraordinary physiological demands. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2013, 4, 127.
5. Santi D et al. Follicle-stimulating Hormone (FSH) Action on Spermatogenesis: A Focus on Physiological and Therapeutic Roles. *J Clin Med.* 2020, 9(4), 1014, 1-28.
6. Livingston M, Kalansooriya A and Hartland AJ. Serum testosterone levels in male hypogonadism: Why and when to check—A review. *Int J Clin Pract.* 2017, 71(11) 1-9.
7. Semet M et al. The impact of drugs on male fertility: a review. *Andrology.* 2017, 5(4), 640-663.
8. Basaria S. Male hypogonadism. *Lancet.* 2014, 383, 1250-63.
9. Rodprasert W et al. Hypogonadism and Cryptorchidism. *Front Endocrinol.* 2020, 10, (906), 1-27.
10. Bode D, Seehusen DA, and Baird D. Hirsutism in women. *Am Fam Physician.* 2012, 85(4), 373-80.
11. Soman M et al. Serum androgen profiles in women with premature ovarian insufficiency: a systematic review and meta-analysis. *Menopause: The Journal of The North American Menopause Society* 2018, 26, 78-93.

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit

Symbole:

	Lagertemperatur		Hersteller		Enthält Testmaterial für <n> Teste
	Verwendbar bis		Chargennummer		In vitro Diagnostikum
	Gebrauchsanweisung beachten		Inhalt		CE-Kennzeichnung
	Achtung		Katalognummer		Vertriebspartner
	Herstellungsdatum				