



DCM021-10
Ed. 01/2015

TESTOSTERONE SALIVA ELISA

per analisi di routine

Determinazione immunoenzimatica diretta del Testosterone nella saliva.

IVD



LOT

Vedere etichetta esterna



$\Sigma = 96$ test

REF DKO021

DESTINAZIONE D'USO

Metodo competitivo immunoenzimatico colorimetrico per la determinazione quantitativa del Testosterone nella saliva.

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

1. SIGNIFICATO CLINICO

Il testosterone (17 -OH-4-androstene-3-one) è un ormone steroideo della famiglia degli androgeni.

In maschi postpuberali, il testosterone è secreto soprattutto dai testicoli e una parte deriva dalla conversione periferica dell'androstenedione. Nelle donne più del 50% del testosterone sierico deriva dalla conversione periferica dell'androstenedione secreta dall'ovaia, e dalla secrezione diretta del testosterone da queste ghiandole

I livelli di testosterone salivare (pg/mL) sono significativamente inferiori rispetto ai livelli sierici.

Gli effetti del testosterone possono essere classificati come effetti sessuali e anabolici, anche se la distinzione è in qualche modo artificiale. Gli effetti anabolici includono lo sviluppo della massa e resistenza del muscolo, densità e resistenza ossea e sviluppo e maturazione lineare dell'osso. Gli effetti sessuali includono la maturazione degli organi coinvolti e dopo la nascita (durante la pubertà) un abbassamento della voce, sviluppo della barba e peluria (caratteristiche sessuali secondarie maschili).

I livelli del testosterone declinano gradualmente con l'età negli uomini (andropausa). I sintomi dell'andropausa sono generalmente associati all'invecchiamento quale la perdita della massa muscolare e diminuzione della densità ossea, diminuita resistenza fisica, diminuita capacità di memorizzazione e la perdita della libido.

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

2. PRINCIPIO DEL METODO

Il testosterone (antigene) presente nel campione, compete con l'antigene marcato con perossidasi di rafano nei confronti dell'anticorpo anti Testosterone adsorbito su micropiastra (fase solida).

Dopo l'incubazione, la separazione libero-legato si ottiene mediante semplice lavaggio della fase solida.

Infine l'enzima HRP presente nella frazione legata, catalizza la reazione tra il Substrato (H_2O_2) ed il TMB-Substrate (TMB), sviluppando una colorazione blu che vira al giallo dopo aggiunta dello Stop solution (H_2SO_4).

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

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

3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

1. Calibrators (5 flaconi, 1 mL ciascuno)

CAL0

REF DCE002/2106-0

CAL1

REF DCE002/2107-0

CAL2

REF DCE002/2108-0

CAL3

REF DCE002/2109-0

CAL4

REF DCE002/2110-0

2. Incubation Buffer (1 flacone, 30 mL)

Tampone fosfato pH 7,5; BSA 1 g/L

REF DCE001-0

3. Conjugate (1 flacone, 1 mL)

Testosterone coniugato con perossidasi di rafano (HRP)

REF DCE002/2102-0

4. Coated Microplate (1 micropiastra breakable)

Anticorpo anti Testosterone adsorbito sulla micropiastra

REF DCE002/2103-0

5. TMB Substrate (1 flacone, 15 mL)

H_2O_2 -TMB (0,26 g/L) (evitare il contatto con la pelle)

REF DCE004-0

6. Stop Solution (1 flacone, 15 mL)

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

REF DCE005-0

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

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

3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit

Acqua distillata.

3.3. Materiale e strumentazione ausiliare

Dispensatori automatici.

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

Saliva Collection Device

REF DKO063

Salivette Sarstedt

REF 51.1534.500

Note

Conservare i reattivi a $2\pm 8^{\circ}\text{C}$, al riparo dalla luce.
Aprire la busta del Reattivo 4 (Coated Microplate) solo dopo averla riportata a temperatura ambiente e chiuderla subito dopo il prelievo delle strip da utilizzare; una volta aperta è stabile fino alla data di scadenza del kit.

4. AVVERTENZE

- Questo test kit è per uso in vitro, da eseguire da parte di personale esperto. Non per uso interno o esterno su Esseri Umani o Animali.
- Usare i previsti dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le Buone Pratiche di Laboratorio (GLP) per la manipolazione di prodotti derivati da sangue.
- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di Proclin 300^R come conservante. Evitare il contatto con la pelle e le mucose.
- Il TMB Substrato contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito attraverso la cute. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con la cute e con gli occhi.
- La Stop Solution è costituita da una soluzione di acido solforico diluito. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire possibili ustioni chimiche, evitare il contatto con la cute e con gli occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente TMB/H₂O₂ a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.
- Questo metodo consente di determinare concentrazioni di Testosterone da 10 pg/mL a 1000 pg/mL.
- La somministrazione di steroidi naturali o sintetici può alterare i livelli salivari di Testosterone.

5. PRECAUZIONI

- Si prega di attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi indicata in questo protocollo. I risultati presentati qui sono stati ottenuti usando specifici reagenti elencati in queste Istruzioni per l'Uso.
- Tutti i reattivi devono essere conservati a temperatura controllata di $2-8^{\circ}\text{C}$ nei loro contenitori originali. Eventuali eccezioni sono chiaramente indicate. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza se conservati e trattati seguendo le istruzioni fornite.
- Prima dell'uso lasciare tutti i componenti dei kit e i campioni a temperatura ambiente ($22-28^{\circ}\text{C}$) e mescolare accuratamente.
- Non scambiare componenti dei kit di lotti diversi. Devono essere osservate le date di scadenza

riportate sulle etichette della scatola e di tutte le fiale. Non utilizzare componenti oltre la data di scadenza.

- Qualora si utilizzi strumentazione automatica, è responsabilità dell'utilizzatore assicurarsi che il kit sia stato opportunamente validato.
- Un lavaggio incompleto o non accurato dei pozzetti può causare una scarsa precisione e/o un'elevato background. Per migliorare le prestazioni del kit su strumentazione automatica, si consiglia di aumentare il numero di lavaggi.
- Per la riproducibilità dei risultati, è importante che il tempo di reazione di ogni pozzetto sia lo stesso. Per evitare il time shifting durante la dispensazione degli reagenti, il tempo di dispensazione dei pozzetti non dovrebbe estendersi oltre i 10 minuti. Se si protrae oltre, si raccomanda di seguire lo stesso ordine di dispensazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva di calibrazione in ogni piastra.
- L'aggiunta del TMB Substrato dà inizio ad una reazione cinetica, la quale termina con l'aggiunta della Stop Solution. L'aggiunta del TMB Substrato e della Stop Solution deve avvenire nella stessa sequenza per evitare tempi di reazione differenti.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori clinici testando controlli e/o pool di salive.
- Osservare la massima precisione nella ricostituzione e dispensazione dei reagenti.
- I lettori di micropiastre leggono l'assorbanza verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.

6. PROCEDIMENTO

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

Prima dell'uso lasciare su agitatore rotante per almeno 5 minuti.

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

| | C ₀ | C ₁ | C ₂ | C ₃ | C ₄ |
|-------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| pg/mL | 0 | 10 | 50 | 200 | 1000 |

Per campioni con concentrazioni maggiori di 1000 pg/mL diluire il campione (1:2) con C₀.

Una volta aperti, i Calibratori sono stabili a $2-8^{\circ}\text{C}$ per 6 mesi.

Per Unità SI: $\text{pg/mL} \times 3,47 = \text{pmol/L}$

6.2. Preparazione del Coniugato Diluito

Preparare al momento dell'uso.

Diluire 10 μL di Conjugate (reattivo 3) con 1 mL di Incubation Buffer (reattivo 2). I volumi possono essere variati rispettando tale proporzione.

Mescolare delicatamente per almeno 5 minuti su agitatore rotante. Stabile 3 ore a temperatura ambiente ($22-28^{\circ}\text{C}$).

6.3. Preparazione della Wash Solution

Prima dell'uso, diluire il contenuto di ogni fiala di "10X Conc. Wash Solution" con acqua distillata fino al volume di 500 mL. Per preparare volumi minori rispettare il rapporto di diluizione di 1:10. La soluzione

di lavaggio diluita è stabile a 2-8°C per almeno 30 giorni.

Nella wash solution concentrata è possibile osservare la presenza di cristalli; in tal caso agitare a temperatura ambiente fino a completa dissoluzione dei cristalli; per una maggiore precisione diluire tutto il flacone della soluzione di lavaggio concentrata a 500 mL, avendo cura di trasferire anche i cristalli, poi agitare fino a completa dissoluzione dei cristalli.

6.4. Preparazione del campione

La determinazione di Testosterone con questo kit va effettuata su campioni di saliva.

Per la raccolta del campione si consiglia l'utilizzo di tubi in vetro da centrifuga e di una cannuccia in plastica, o dei *Saliva Collection Device* Diametra, o delle "Salivette" (Sarstedt, Ref. 511534500). Altri tipi di dispositivi di raccolta commercialmente disponibili non sono stati testati.

6.4.1. Metodo e limitazioni

Raccogliere i campioni di saliva nei tempi indicati.

Se non vengono date indicazioni specifiche per la raccolta delle salive, è possibile raccogliere i campioni in qualsiasi momento ma tenendo conto dei seguenti fattori:

- Se la raccolta della saliva viene effettuata al mattino, questa deve essere prelevata prima di lavarsi i denti.
- Durante la giornata prima di raccogliere i campioni di saliva, attendere almeno un'ora dopo aver mangiato, aver assunto farmaci per via orale o essersi lavati i denti.
- E' molto importante ottenere un campione limpido – non contaminato da cibo, cosmetici, sangue, chewing gum od altri materiali estranei.

6.4.2. Processazione delle salive con il metodo *Saliva Collection Device* Diametra

- Far defluire la saliva attraverso la cannuccia nel tubo di vetro.
- Centrifugare il campione per 15 minuti a 3000 rpm
- Porlo a - 20°C per almeno 1 ora
- Centrifugare ancora per 15 minuti a 3000 rpm
- Il campione di saliva è così pronto per essere testato.
- Conservare il campione a 2÷8°C per una settimana o a - 20°C per un tempo maggiore.

6.4.3. Processazione delle salive con il metodo *Salivette* Sarstedt

- Rimuovere il tampone contenuto nell'apposita provetta all'interno del tubo.
- Mettere il tampone in bocca e bagnare con la saliva per circa 1 minuto.
- Riporre il tampone nell'apposita provetta all'interno del tubo e chiudere il tubo con l'apposto tappo.
- Centrifugare il tubo a 1000g (rcf) per 2 minuti
- Rimuovere il tampone e la provetta e recuperare la saliva sul fondo del tubo (almeno 1 mL di

saliva dovrebbe essere recuperato con questo metodo).

6.5. Procedimento

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

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

7. CONTROLLO QUALITA'

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

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

8. RISULTATI

8.1. Estinzione Media

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

8.2. Curva di calibrazione

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

8.3. Calcolo dei risultati

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

9. VALORI DI RIFERIMENTO

Siccome i valori del Testosterone Saliva hanno un ritmo circadiano suggeriamo di raccogliere i campioni alla stessa ora (8 A.M.):

I seguenti valori devono essere usati come guida preliminare fino a quando ogni laboratorio ha stabilito il proprio range di normalità.

| | | pg/mL |
|----------|--------------------|----------|
| DONNE: | normali | 10 – 55 |
| | Irsutismo | 25 – 85 |
| | (dopo trattamento) | 16 – 40 |
| | PCO | 20 – 50 |
| BAMBINI: | | 35 – 160 |
| UOMINI: | | 50 - 210 |
| | ipogonadismo | 10 – 80 |

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

10. PARAMETRI CARATTERISTICI

10.1. Precisione

10.1.1. Intra-Assay

La variabilità all'interno dello stesso kit è stata determinata replicando (16x) la misura di due differenti campioni di saliva di controllo. La variabilità intra-assay è 8,0%.

10.1.2. Inter-Assay

La variabilità tra kit differenti è stata determinata replicando (12x) la misura di tre differenti campioni di saliva di controllo con kit appartenenti a lotti diversi. La variabilità inter-assay è 13,2%.

10.2. Accuratezza

La prova di recupero condotta su due campioni di saliva arricchiti con 37,5 – 100 – 500 pg/mL di Testosterone, ha dato un valore medio (\pm SD) di 98,97% \pm 10,92%.

10.3. Sensibilità

La concentrazione minima di Testosterone misurabile che può essere distinta dal Calibratore 0 è 2,96 pg/mL con un limite di confidenza del 95%.

10.4. Specificità

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

| | |
|---------------------|------|
| Testosterone | 100% |
| Diidrottestosterone | 16% |
| Androstenedione | 0,8% |
| Androsterone | 0% |
| DHEA-S | 0% |
| Cortisolo | 0% |
| Cortisone | 0% |
| 17 Estradiolo | 0% |
| Estrone | 0% |
| Prednisone | 0% |

10.5. Correlazione

Il kit Testosterone saliva Diametra è stato comparato con un kit disponibile in commercio. Sono stati testati 32 campioni di saliva.

La curva di regressione è:

$$y = 1,10 x - 0,98$$

$$r^2 = 0,967$$

$$y = \text{Testosterone saliva Diametra Elisa kit}$$

$$x = \text{Testosterone saliva DRG Elisa kit}$$

11. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

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

BIBLIOGRAFIA

1. Joshi, U. M., et al. Steroids 34 (1) 35 (1979)
2. Turkes, A., et al. J Endocrinol. 81 (2) P165 (1979)
3. Ismail A.A, et al J. Clin. Endocr. Metab. 34, 177-184 (1972)
4. Rajkowski K.M, et al Steroids 29 (5) 1977
5. Widsom G. B., Clin.Chem. 22/8, 1243-1255 (1976)

Ed. 01/2015

DCM021-10

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

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



DCM021-10
Ed. 01/2015

TESTOSTERONE SALIVA ELISA

for routine analysis

Direct immunoenzymatic determination of Testosterone in saliva.

IVD



LOT

See external label



Σ = 96 tests

REF DKO021

INTENDED USE

Competitive immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination of Testosterone concentration in saliva.

Testosterone Saliva ELISA kit is intended for laboratory use only.

1. CLINICAL SIGNIFICANCE

Testosterone (17 -Hydroxy-4-androstene-3-one) is a steroid hormone from the androgen group.

In postpubertal males, testosterone is secreted primarily by the testes with only a small amount derived from peripheral conversion of androstenedione. In adult women over 50% of serum testosterone is derived from peripheral conversion of androstenedione secreted by the adrenal and ovary, with the remainder from direct secretion of testosterone by these glands. The level of testosterone in saliva (pg/mL) is significantly lower than levels in the general circulation (ng/mL).

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

Testosterone levels decline gradually with age in men (andropause). The signs and symptoms are non-specific, and are generally associated with aging such as loss of muscle mass and bone density, decreased physical endurance, decreased memory ability and loss of libido. In females of all ages, elevated testosterone levels can be associated with a variety of virilizing conditions, including adrenal tumors and polycystic ovarian disease.

2. PRINCIPLE

The Testosterone (antigen) in the sample competes with the antigenic Testosterone conjugated with horseradish peroxidase (HRP) for binding to the limited number of antibodies anti Testosterone coated on the microplate (solid phase).

After incubation, the bound/free separation is performed by a simple solid-phase washing.

Then, the enzyme HRP in the bound-fraction reacts with the Substrate (H_2O_2) and the TMB Substrate and develops a blue color that changes into yellow when the Stop Solution (H_2SO_4) is added.

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

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

3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

3.1. Reagent and material supplied in the kit

1. Calibrators (5 vials, 1 mL each)

| | |
|------|-------------------|
| CAL0 | REF DCE002/2106-0 |
| CAL1 | REF DCE002/2107-0 |
| CAL2 | REF DCE002/2108-0 |
| CAL3 | REF DCE002/2109-0 |
| CAL4 | REF DCE002/2110-0 |

2. Incubation Buffer (1 vial, 30 mL)

Phosphate buffer pH 7.5, BSA 1 g/L

REF DCE001-0

3. Conjugate (1 vial, 1 mL)

Testosterone conjugated with Horseradish peroxidase (HRP)

REF DCE002/2102-0

4. Coated Microplate (1 breakable microplate)

Anti Testosterone antibody adsorbed on microplate

REF DCE002/2103-0

5. TMB Substrate (1 vial, 15 mL)

H_2O_2 -TMB 0.26 g/L (avoid any skin contact)

REF DCE004-0

6. Stop Solution (1 vial, 15 mL)

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

REF DCE005-0

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

Phosphate buffer 0.2M, pH 7.4 REF DCE054-0

3.2. Reagents necessary not supplied

Distilled water.

3.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.

Microplates reader (450 nm, 620-630 nm)

Saliva Collection Device

REF DKO063

Salivette Sarstedt

REF 51.1534.500

Note

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

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

4. WARNINGS

- This kit is intended for in vitro use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
- Some reagents contain small amounts of Proclin 300^R as preservative. Avoid the contact with skin or mucosa.
- The TMB Substrate contains an irritant, which may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous and corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H₂O₂ to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.
- This method allows the determination of Testosterone from 10 pg/mL to 1000 pg/mL.
- The clinical significance of the determination of Testosterone can be invalidated if the patient was treated with cortisone or natural or synthetic steroids.

5. PRECAUTIONS

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

needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate

- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled saliva.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of reagents.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

6. PROCEDURE

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

Before use, mix for 5 minutes with a rotating mixer.

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

| | C ₀ | C ₁ | C ₂ | C ₃ | C ₄ |
|-------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| pg/mL | 0 | 10 | 50 | 200 | 1000 |

For samples with concentration higher than 1000 pg/mL dilute the sample 1:2 with C₀.

Once opened, the Calibrators are stable at 2-8°C for 6 months.

For SI UNITS: pg/mL x 3,47 = pmol/L

6.2. Preparation of Diluted Conjugate

Prepare immediately before use.

Add 10 µL Conjugate (reagent 3) to 1.0 mL of Incubation Buffer (reagent 2). The volumes can be varied according to this proportion.

Mix gently, for 5 minutes on a rotating shaker. Stable for 3 hours at room temperature (22-28°C).

6.3. Preparation of Wash Solution

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

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

6.4. Preparation of the Sample

The determination of Testosterone with this kit should be performed in saliva samples.

It is recommended to collect saliva samples with a centrifuge glass tube and a plastic straw, with the Diametra Saliva Collection Device or with the "Salivette" (Sarstedt, Ref. 511534500). Other commercially available sample collector devices have not been tested.

6.4.1. Method and Limitations

Collect saliva samples at the times indicated.

If no specific instructions have been given, saliva samples may be collected at any time; however the following should be noted:

- If saliva collection is carried out in the morning ensure that this is carried out prior to brushing teeth
- During the day allow 1 hour after a meal, oral intake of pharmaceutical drugs or tooth cleaning.
- It is very important that a good clear sample is received – i.e. no contamination with food, lipstick, blood (bleeding gums) or other extraneous materials.

6.4.2. Saliva Processing Instructions with Saliva Collection Device Diametra

- Let the saliva flow down through the straw into the centrifuge glass tube.
- Centrifuge the sample for 15 minutes at 3000 rpm
- Store at – 20°C for at least 1 hour
- Centrifuge again for 15 minutes at 3000 rpm
- The saliva sample is now ready to be tested.
- Store the sample at 2÷8°C for one week or at – 20°C for longer time.

6.4.3. Saliva Processing Instructions with Salivette Sardstedt

- Remove the swab from the suspended insert of the Salivette
- Gently chewing the swab for 1 minute produces a sufficient quantity of saliva.
- Replace the swab into the Salivette and firmly close the tube using the stopper.
- Centrifuge the Salivette for 2 minutes at 1000g (rcf) for saliva generation.
- Remove the insert complete with the swab from the centrifuge vessel and discard. The clear saliva is now ready for analysis (at least 1 mL of saliva should be recovered with this method).

6.5. Procedure

- Allow all reagents to reach room temperature (22-28°C).** At the end of the assay, store immediately the reagents at 2-8°C: avoid long exposure to room temperature.
- Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2-8°C.
- To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.
- As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the calibration curve (C₀-C₄), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

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

7. QUALITY CONTROL

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

8. RESULTS

8.1. Mean Absorbance

Calculate the mean of the absorbance (E_m) for each point of the calibration curve (C₀-C₄) and of each sample.

8.2. Calibration curve

Plot the mean value of absorbance (E_m) of the Calibrators (C₀-C₄) against concentration. Draw the best-fit curve through the plotted points. (es: Four Parameter Logistic).

8.3. Calculation of Results

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

9. REFERENCE VALUES

As the values of salivary Testosterone have a circadian pattern we suggest to collect the samples at the same hour (8 A.M.):

The following values can be used as preliminary guideline until each laboratory established its own normal range.

| | | pg/mL |
|-----------|-------------------|----------|
| WOMEN: | normal | 10 – 55 |
| | Hirsutism | 25 – 85 |
| | (after treatment) | 16 – 40 |
| | PCO | 20 – 50 |
| CHILDREN: | | 35 – 160 |
| MEN: | | 50 - 210 |
| | Hipogonadism | 10 – 80 |

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

10. PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

10.1. Precision

10.1.1. Intra Assay Variation

Within run variation was determined by replicate measurements (16x) of two different saliva control in one assay. The within assay variability is 8.0%.

10.1.2. Inter Assay Variation

Between run variation was determined by replicate measurements (12x) of three different saliva control in different lots of kit. The between assay variability is 13.2%.

10.2. Accuracy

The recovery of 37.5 – 100 – 500 pg/mL of Testosterone added to two saliva samples gave an average value (\pm SD) of 98.97% \pm 10.92% with reference to the original concentrations.

10.3. Sensitivity

The lowest detectable concentration of Testosterone that can be distinguished from the Calibrator 0 is 2.96 pg/mL at the 95% confidence limit.

10.4. Specificity

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

| | |
|---------------------|------|
| Testosterone | 100% |
| Dihydrotestosterone | 16% |
| Androstenedione | 0.8% |
| Androsterone | 0% |
| DHEA-S | 0% |
| Cortisol | 0% |
| Cortisone | 0% |
| 17 Estradiol | 0% |
| Estrone | 0% |
| Prednisone | 0% |

10.5. Correlation

Diametra Testosterone saliva ELISA kit was compared to another commercially available saliva assay. 32 saliva samples were analysed according in both test systems.

The linear regression curve was calculated:

$$y = 1,10 x - 0,98$$

$$r^2 = 0,967$$

$$y = \text{Testosterone saliva Diametra Elisa kit}$$

$$x = \text{Testosterone saliva DRG Elisa kit}$$

11. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

BIBLIOGRAPHY

1. Joshi, U. M., et al., Steroids 34 (1) 35 (1979)
2. Turkes, A., et al., J Endocrinol. 81 (2) P165 (1979)
3. Ismail A. A, et al J. Clin. Endocr. Metab. 34, 177-184 (1972)
4. Rajkowski K.M, et al Steroids 29 (5) (1977)
5. Widsdom G. B., Clin. Chem. 22/8, 1243-1255 (1976)

Ed. 01/2015






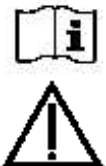




DCM021-10

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

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

| | | |
|----------|------------------------------------|--|
| | DIA.METRA SRL | |
| Mod. PIS | PACKAGING INFORMATION SHEET | |

IT*Spiegazione dei simboli***GB***Explanation of symbols***FR***Explication des symboles***ES***Significado de los simbolos***DE***Verwendete Symbole***PT***Explicação dos simbolos*

| | | | |
|---|---|--|--|
|  | DE In vitro Diagnostikum ES Producto sanitario para diagnóstico In vitro FR Dispositif medical de diagnostic in vitro GB In vitro Diagnostic Medical Device IT Dispositivo medico-diagnostico in vitro PT Dispositivos medicos de diagnostico in vitro |  | DE Hergestellt von ES Elaborado por FR Fabriqué par GB Manufacturer IT Produttore PT Produzido por |
| REF | DE Bestellnummer ES Número de catálogo FR Références du catalogue GB Catalogue number IT Numero di Catalogo PT Número do catálogo |  yyyy-mm | DE Herstellungs datum ES Fecha de fabricacion FR Date de fabrication GB Date of manufacture IT Data di produzione PT Data de produção |
|  yyyy-mm-dd | DE Verwendbar bis ES Estable hasta (usar antes de último día del mes) FR Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) GB Use by (last day of the month) IT Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) PT Utilizar (antes ultimo dia do mês) |  | DE Biogefährdung ES Riesco biológico FR Risque biologique GB Biological risk IT Rischio biologico PT Risco biológico |
|  | DE Gebrauchsanweisung beachten ES Consultar las instrucciones FR Consulter le mode d'emploi GB Consult instructions for use IT Consultare le istruzioni per l'uso PT Consultar instruções para uso |  | DE Chargenbezeichnung ES Codigo de lote FR Numero de lot GB Batch code IT Codice del lotto PT Codigo do lote |
|  = xx | DE Ausreichend für "n" Tests ES Contenido suficiente para "n" tests FR Contenu suffisant pour "n" tests GB Contains sufficient for "n" tests IT Contenuto sufficiente per "n" saggi PT Contém o suficiente para "n" testes |  | DE Inhalt ES Contenido del estuche FR Contenu du coffret GB Contents of kit IT Contenuto del kit PT Conteúdo do kit |
|  Max Min | DE Temperaturbereich ES Límitación de temperatura FR Limites de température de conservation GB Temperature limitation IT Limiti di temperatura PT Temperaturas limites de conservação | | |

| | | |
|----------|------------------------------------|--|
| | DIA.METRA SRL | |
| Mod. PIS | PACKAGING INFORMATION SHEET | |

SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI/TROUBLESHOOTING

ERRORE CAUSE POSSIBILI/ SUGGERIMENTI

Nessuna reazione colorimetrica del saggio

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

Reazione troppo blanda (OD troppo basse)

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

Reazione troppo intensa (OD troppo alte)

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

Valori inspiegabilmente fuori scala

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

CV% intrasaggio elevato

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

CV% intersaggio elevato

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

ERROR POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS

No colorimetric reaction

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

Too low reaction (too low ODs)

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

Too high reaction (too high ODs)

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

Unexplainable outliers

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