

# Testosterone kit

ELISA Testkit zur quantitativen Bestimmung  
der Testosteron-Konzentration in humanem Blutserum  
(*Gebrauchsanweisung: Seite 3*)

Enzyme immunoassay for quantitative  
determination of testosterone in human serum  
(*Instructions for use: page 29*)

Manueller Test / Manual test

*Abschnitt / Section 13*

Automatisierter Test / Automated test

*Abschnitt / Section 14*

**IVD**

Testosterone Kit  
(Manueller Test)  
Testosterone kit  
(manual test)



96 Untersuchungen  
96 tests

**21-02**

**REF**

Testosterone Kit  
(Automatisierter Test für  
"Alisei")  
Testosterone kit  
(automated test for "Alisei")


























96 Untersuchungen  
96 tests

**21-02 A**

**REF**

# 1. KENNZEICHEN / SYMBOLS LEGEND

	In-vitro Diagnostika In vitro diagnostic medical device		EG-Konformitätserklärung EC Declaration of conformity
	Bestellnummer Catalogue number		Chargenbezeichnung Batch code
	Verwendbar bis Use by		Hersteller Manufacturer
	Herstellungsdatum Date of manufacture		Gebrauchsanweisung beachten Consult operating instructions
	Temperaturbegrenzung Temperature limitation		Biogefährdung Biological risks
	Ausreichend für <n> Prüfungen Contains sufficient for <n> tests		Konjugat Conjugate
	Beschichtete Mikrotiterplatte (96 Kavitäten) Coated microplate (96 wells)		Substrat Substrate
	Waschlösung, 20x konzentriert Wash solution, 20X concentrated		Stopplösung Stop solution
	Kalibratoren Calibrators		Deionisiertes, destilliertes Wasser Deionized or distilled water
	Kontrolle Control		Optische Dichte Optical density
	Auflösen mit angegebenem Volumen Reconstitute with specified volume of liquid		Trial-Lösung, 5000x konzentriert Trial, 5000X concentrated
			Reizend Irritant
		<b>Warning</b>	

## 2. VERWENDUNGSZWECK

Der **Testosterone Testkit** ist für die **quantitative Bestimmung** von **Testosteron** in **humanem Blutserum** bestimmt.

Der Testkit ist in zwei Variationen erhältlich:

**REF 21-02** Für den manuellen Gebrauch

**REF 21-02 A** Für den Gebrauch mit ELISA-Automat "Alisei", hergestellt durch die Firma Next Level S.r.l.

Die Gebrauchsanweisungen befinden sich:

Abschnitt 13 Manueller Test

Abschnitt 14 Automatisierter Test "Alisei"

**Anmerkung 1:** *Die Konzentrationswerte der Kalibratoren können bei manuellem und automatisiertem Testkit variieren.*

**Anmerkung 2:** *Wir garantieren verlässliche Testergebnisse bei folgender Anwendung der Testkits:*

**REF 21-02 A** *nur für ELISA-Automat "Alisei"*

**REF 21-02** *nur für den manuellen Gebrauch.*

*Bei Verwendung einer nicht vordefinierten Methode ist der Anwender dafür verantwortlich, sicherzustellen, dass diese für ELISA-Kits angemessen getestet wurde.*

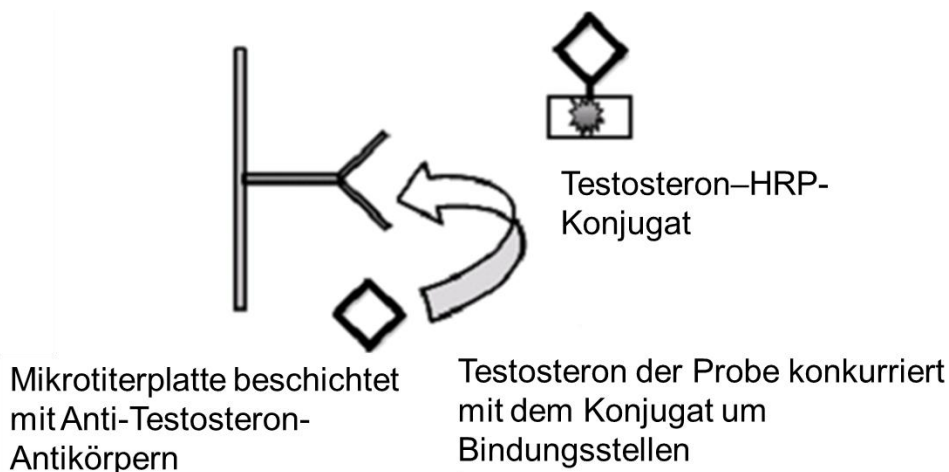
Testosteron ist ein Steroidhormon mit einer Molekularmasse von 288,4 Da. Es wird überwiegend in den Hoden und zu geringeren Mengen in den Eierstöcken und der Nebennierenrinde synthetisiert.

Die Analyse des Testosterons im Serum ist ein wichtiges Werkzeug bei der Bewertung der Hodenfunktion und der Diagnose von Tumoren in Hoden, Eierstock und Nebenniere sowie des Hirsutismus bei Frauen.

### 3. TESTPRINZIP

Der **Testosterone Testkit** ist ein kompetitiver Festphasen-Immunoassay. Während der Inkubation bindet das Testosteron der zu testenden Probe und das Testosteron-HRP-Konjugat an die Antikörper, die an der Innenfläche der Kavitäten der Mikrotiterplatte gekoppelt sind, bis sich ein Gleichgewicht einstellt. Freies Testosteron wird beim Leeren der Kavitäten von dem an die Antikörper gebundenem Testosteron sowie Testosteron-HRP-Konjugat getrennt. Dabei ist die Menge des gebundenen Konjugates umgekehrt proportional zur Menge des Testosterons in der Probe (Abb.1).

Während der Inkubation mit der TMB-Lösung entwickelt sich die Farbreaktion. Die Farbintensität ist indirekt proportional zur Testosteron-Konzentration der Probe. Die Testosteron-Konzentration in der Patientenprobe wird mit einer Standardkurve, die mit dem Testkit erarbeitet wird, ausgelesen.



*Abb. 1 Testschema*

## 4. LAGERUNG UND STABILITÄT DES TESTKITS

Das Verfallsdatum des kompletten Testkits ist auf dem Außenetikett angegeben; das Verfallsdatum jeder einzelnen Testkomponente ist auf dem jeweiligen Etikett angegeben.

Der **Testosterone Testkit** ist nach dem Empfang bei +2...+8 °C in der Originalverpackung des Herstellers bis zum Ablauf der Haltbarkeit zu lagern. Eine Lagerung bei Temperaturen bis +25 °C ist maximal für 5 Tage zulässig.

Die Haltbarkeitsdauer des Kits beträgt 18 Monate.

Nach dem Öffnen ist der Testkit bei einer Lagerung bei +2...+8 °C bis zu 12 Monate haltbar.

Wenn der Testkit in mehreren getrennten Experimenten verwendet wird, ist der Inhalt wie folgt zu lagern aber die Komponenten dürfen nie länger als bis zu ihrem Ablaufdatum verwendet werden:

- Die ungenutzten Mikrotiterplatten-Streifen: in einem fest verschlossenen Druckverschlussbeutel: bei +2...+8 °C bis zum Verfallsdatum;
- Fläschchen mit Kalibratoren und Kontrolle und Konjugat flüssig: bei +2...+8 °C für 12 Monate und gelöst aus Lyophilisat: bei +2...+8 °C für maximal 1 Monat nach dem Öffnen;
- Fläschchen mit Substrat-Lösung: bei einer Temperatur von +2...+8 °C bis zum Verfallsdatum, **lichtgeschützt**;
- Fläschchen des Trial- und Waschlösung-Konzentrates und der Stopplösung: bei +2...+8 °C bis zum Verfallsdatum;
- Gebrauchsfertige Waschlösung: in einem dicht verschlossenen Behälter bei Raumtemperatur (+18...+25

°C) für maximal 5 Tage oder bei +2...+8°C für maximal 4 Wochen;

- Gebrauchsfertige Trial-Lösung: in einem dicht verschlossenen Behälter bei Raumtemperatur (+18...+25 °C) für maximal 5 Tage.

### **Beschädigte Testkits**

Im Falle einer schweren Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss Astra Biotech GmbH schriftlich innerhalb einer Woche nach dem Empfang der Ware informiert werden. Der Gebrauch stark beschädigter Komponenten für einen Testlauf wird nicht empfohlen.

## **5. PROBENGEWINNUNG UND -LAGERUNG**

Blut durch Venenpunktion entnehmen und in ein Antikoagulantien-freies Röhrchen geben. Nach der Gerinnung wird das Serum durch Zentrifugation von den Blutkörperchen abgetrennt.

Es ist nicht zulässig, für eine Analyse Blutplasma, hämolysiertes (hell rot) oder lipämischer (milchig) Serum sowie Natriumazid-haltige Serumproben zu benutzen.

Die Proben sind bei der Temperatur von +2...+8 °C nicht länger als 2 Tage zu lagern. Bei Notwendigkeit einer dauerhaften Aufbewahrung wird empfohlen, die Probe zu aliquotieren und bei Temperatur von  $\leq -20$  °C gefroren zu lagern. Ein wiederholtes Einfrieren ist zu vermeiden.

## 6. REFERENZWERTE

Mit Hilfe des **Testosterone Testkits** wurden 70 Blutserumproben, die von 9 bis 11 Uhr morgens bei gesunden 21- bis 45-jährigen Männern und Frauen entnommen wurden, untersucht. Die ermittelten Konzentrationswerte sind in folgender Tabelle dargestellt. Der angegebene Bereich dient jedoch nur als eine Orientierungshilfe.

<b>Gruppe</b>	<b>Anzahl der Proben</b>	<b>Mittelwert (nmol/l)</b>	<b>Konzentrationsbereich (nmol/l)</b>
Frauen	37	1,8	0,5 - 4,3
Männer	33	19,2	12,1 - 38,3

Es wird ausdrücklich empfohlen, dass jedes Labor einen eigenen Referenzbereich für die Testosteron-Normkonzentrationen bestimmt.

## 7. QUALITÄTSKONTROLLE

Es wird empfohlen, Kontrollproben entsprechend der nationalen und regionalen Vorschriften zu benutzen. Der Einsatz der Kontrollproben sichert die Tag-zu-Tag Gültigkeit der Ergebnisse.

## 8. REAGENZVORBEREITUNG

Vor dem Gebrauch müssen alle Reagenzien auf Raumtemperatur (+18...+25 °C) gebracht und gründlich gemischt werden.

**MP Mikrotiterplatte**

Die Verpackung der **Mikrotiterplatte** vor der Öffnung mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur (+18...+25 °C) lagern und anschließend wie folgt vorbereiten:

- Notwendige Anzahl der Streifen in den Rahmen einsetzen. Die unbenutzten Streifen in einen Druckverschlussbeutel legen und gut verschließen.

**CAL CONTROL Kalibratoren und Kontrolle**

Flüssige Kalibratoren und die flüssige Kontrolle sind gebrauchsfertig. Die lyophilisierten Kalibratoren und die Kontrolle wie folgt vorbereiten:

- Durch leichtes Klopfen auf den Deckel wird der Feststoff vom Flaschenrand gelöst.
- Die Fläschchen werden vorsichtig geöffnet und die Deckelkappen umgedreht auf eine trockene und saubere Oberfläche gelegt.
- 0,5 ml destilliertes oder deionisiertes Wasser wird jeweils in die lyophilisierten Kalibratoren und die Kontrolle pipettiert, diese wieder mit dem jeweiligen Deckel verschlossen und 10 Minuten bei Raumtemperatur ohne Mischen inkubiert.
- Danach unter Vermeidung einer Schaumbildung sorgsam rühren bis der Feststoff komplett gelöst ist. Weitere 10 Minuten bei Raumtemperatur (+18...+25°C) unter periodischem Schütteln inkubieren. Es darf kein Feststoff im Deckel oder an den Wänden der Fläschchen zurückbleiben.



**WASH P Waschlösung**

Zubereitung der benötigten Menge der **Waschlösung** durch 20fache Verdünnung des Konzentrates mit destilliertem oder deionisiertem Wasser:

5 ml **WASH P 20X** + 95 ml Wasser

Sorgfältig mischen, Schaumbildung vermeiden.

**SUB Substrat** vor direktem Licht schützen.

**9. PROBENVORBEREITUNG**

Proben auf Raumtemperatur bringen und sorgfältig mischen, um Homogenität zu erreichen.

**10. TESTCHARAKTERISTIKA****10.1 Kalibrierung:**

Der **Testosterone Testkit** wurde gegen einen nach gravimetrischer Methode hergestellten Arbeitsstandard kalibriert. Die gravimetrische Methode basiert auf dem Abwiegen von aufgereinigtem, synthetischem Testosteron in einer analytenfreien Matrix.

**10. 2 Spezifität:**

Die Kreuzreaktion der monoklonalen Anti-Testosteron-Antikörpern mit unterschiedlichen Steroiden ist in folgender Tabelle dargestellt:

<b>Steroid</b>	<b>Kreuzreaktion, %</b>
Testosteron	100,0
5-Alpha-Dihydrotestosteron	9,8
Androstendiol	2,0
Androstenolon	0,2

Androstandion	1,3
Dehydroepiandrosteron	0,2
Kortisol	0,04
Progesteron	0,1
Östron	0,06
Östradiol	0,9
Östriol	0,02

### 10.3 Analytische Sensitivität:

Die analytische Sensitivität des **Testosterone Testkits**, d.h. die minimale Konzentration, die sich vom Kalibrator 0 sicher unterscheiden lässt, beträgt 0,2 nmol/l (für manuelles und Alisei Testkit) . Zur Ermittlung wurde der Mittelwert einer 10fach-Bestimmung der OD des Kalibrators 0 unter Berücksichtigung der Standardabweichung (minus 2 SD) gebildet.

### 10.4 Messbereich:

Der **Testosterone Testkit** ist validiert für die Detektion einer Testosteron-Konzentration von 0,2 - 50 nmol/l für den manuellen Test und 0,2 - 100 nmol/l für den automatisierten Test.

### 10.5 Messeinheit:

Die Konzentrationen der Kalibratoren im **Testosterone Testkit** sind in nmol/l angegeben. Zur Umrechnung in ng/ml, wird die Konzentration (nmol/l) mit 0,288 multipliziert.

### 10.6 Intra-assay und Inter-assay Varianz (Präzision):

Um einen **intra-assay Variationskoeffizienten** festzulegen, wurden 8 Blutserumproben, jeweils in 9fach-Bestimmung untersucht. Die Testresultate sind in der Tabelle dargestellt:

## Manuelles Testkit

Probe	Mittlere Testosteron- Konzentration, nmol/l	Intra-assay VK	
		SD	VK, %
1	1,14	0,177	15,4
2	1,37	0,209	15,3
3	4,68	0,295	6,3
4	13,0	0,75	5,8
5	16,9	0,42	2,5
6	17,2	0,60	3,5
7	19,6	0,59	3,0
8	26,2	0,74	2,8

## Alisei Testkit

Probe	Mittlere Testosteron- Konzentration, nmol/l	Intra-assay VK	
		SD	VK, %
1	1,07	0,050	4,7
2	2,83	0,100	3,5
3	5,61	0,183	3,3
4	7,47	0,229	3,1
5	11,34	0,436	3,8
6	15,70	0,557	3,5
7	19,11	0,488	2,6
8	29,56	0,726	2,5

Um einen **inter-Assay Variationskoeffizient** festzulegen, wurden 10 Blutserumproben viermal von verschiedenen Anwendern untersucht. Jede Probe wurde zweimal gemessen.

Die Testergebnisse sind in der Tabelle dargestellt:

## Manuelles Testkit

Probe	Mittlere Testosteron-Konzentration, nmol/l				Inter-assay VK	
	1. Test	2. Test	3. Test	4. Test	SD	VK, %
1	0,71	0,76	0,79	0,69	0,046	6,2
2	1,34	1,44	0,97	1,07	0,221	18,4
3	1,34	1,33	1,50	1,29	0,093	6,8
4	2,07	1,93	1,93	1,95	0,067	3,4
5	2,33	2,60	2,14	2,25	0,196	8,4
6	12,3	14,2	14,1	12,9	0,92	6,9
7	12,7	14,7	14,1	13,9	0,84	6,0
8	13,8	15,1	17,7	15,6	1,60	10,3
9	14,3	17,0	16,4	15,3	1,20	7,6
10	16,4	18,4	16,6	16,5	0,96	5,7

## Alisei Testkit

Probe	Mittlere Testosteron-Konzentration, nmol/l				Inter-assay VK	
	1. Test	2. Test	3. Test	4. Test	SD	VK, %
1	1,12	1,09	1,13	0,99	0,064	5,9
2	2,96	2,54	2,77	2,61	0,187	6,9
3	5,79	5,21	5,68	5,53	0,252	4,5
4	7,85	7,16	7,49	7,01	0,373	5,1
5	11,49	11,06	12,62	11,98	0,670	5,7
6	17,64	16,90	15,31	15,85	1,045	6,4
7	19,00	17,62	20,44	19,87	1,227	6,4
8	23,51	21,19	22,82	23,99	1,223	5,3
9	26,58	27,89	26,54	28,12	0,840	3,1
10	35,06	31,85	33,41	32,79	1,350	4,1

## 11. GRENZEN DER METHODE



Eine klinische Diagnose sollte nicht allein mit Hilfe der Ergebnisse einer einzelnen diagnostischen Methode erhoben werden. Zur Diagnosestellung sollten vom Arzt alle verfügbaren klinischen und Laborbefunde berücksichtigt werden.

## 12. VORSICHTSMAßNAHMEN

- **Der Testkit ist ausschließlich zum in vitro–Gebrauch bestimmt.** Um zuverlässige Testergebnisse zu erhalten, ist die Arbeitsanleitung strikt einzuhalten. Diese Gebrauchsanweisung ist nur für den vorliegenden Testkit mit dem aufgeführten Packungsinhalt gültig. Jeglicher Austausch der Kitkomponenten ist durch die CE-Regularien nicht gestattet.
- Der Testkit oder einzelne Kit-Komponenten dürfen nach Ablauf des auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden.  
Die Haltbarkeit der verdünnten Komponenten muss ebenfalls berücksichtigt werden.
- Das Mischen oder die gleichzeitige Verwendung von Reagenzien verschiedener Testchargen, ausgenommen Substrat, Stopp- und Waschlösung, ist nicht gestattet.
- Substrat, Stopplösung und Waschlösung anderer Hersteller nicht verwenden.
- Nur “P”-gekennzeichnete Astra Biotech Waschlösung benutzen.
- Die Stopplösung ist eine 1 N Salzsäure (HCl–Lösung). Vermeiden Sie Haut- und Schleimhautkontakt.  
Bei Haut- oder Schleimhautkontakt den betroffenen Bereich mit fließendem Wasser spülen und gegebenenfalls einen Arzt aufsuchen.
- Bitte folgende bekannte Verfahrensregeln beachten:
  - Reagenzien unmittelbar nach dem Waschen in die Kavitäten pipettieren;
  - Kontamination der Lösungen vermeiden;

- Bei teilweiser Nutzung des Testkits nur benötigtes Volumen in ein gesonderten Behälter geben;
  - Nicht benutzte Reagenzien NICHT zurück in die ursprünglichen Original-Fläschchen füllen;
  - Direkte Sonneneinstrahlung während der Inkubation vermeiden;
  - Reagenzien in gleicher Reihenfolge pipettieren, um Unterschiede in den Reaktionszeiten zwischen den Kavitäten zu vermeiden. Die gesamte Pipettierzeit für Kalibratoren, Kontrolle und Proben darf 15 Minuten nicht überschreiten;
  - Die Temperatur der Inkubation aller immunologischen Reaktionen muss bei +37 °C liegen;
  - Den Boden der Kavitäten nicht berühren;
  - Kalibratoren müssen bei jedem Testlauf gemessen werden. Es wird außerdem empfohlen, die Testosteron-Konzentration der Kontrolle zu bestimmen.
  - Entfernen Sie die Klebeschutzfolie vorsichtig um eine Kontamination zu vermeiden und verwenden Sie dieselbe Klebeschutzfolie nicht erneut.
- Die TMB-Lösung sollte farblos sein. Eine helle Färbung der Lösung ist zulässig. Vermeiden Sie direkte Sonneneinstrahlung des Substrates.
  -  Alle Reagenzien dieses Testkits, die humanen Ursprungs sind, ergaben bei der Prüfung auf HBsAg (Hepatitis B surface Antigen) bzw. Antikörper gegen HIV („Human Immunodeficiency Virus“) und HCV (Hepatitis C Virus) ein negatives Ergebnis. Dennoch kann das Vorhandensein infektiöser Erreger durch keinen Test mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen

werden. Die Reagenzien und Proben sollten deshalb immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.

-  Nach dem Gebrauch werden Streifen, Kalibratoren, Kontrollen, Proben und alle Verbrauchsmittel (Reaktionsgefäße, Fläschchen, Handschuhe, Pipettenspitzen), die mit den Proben während der Bearbeitung oder Lagerung in Kontakt kamen, separat gesammelt und autoklaviert. Pipettenspitzen können anstelle des Autoklavierens durch Inkubation in desinfizierenden Substanzen sterilisiert werden. Nach der Sterilisation können alle Komponenten und Einmal-Artikel als nicht gefährlicher Müll behandelt werden. Andere Kitbestandteile werden auf konventionelle Weise entsorgt.
-  Während der manuellen Waschprozedur Überstände nicht in den Abfluss geben, sondern in einen Behälter mit Desinfektionsmittel.
-  Beim Umgang mit potentiell infektiösem Material müssen die folgenden Vorsichtsmaßnahmen beachtet werden:
  - Im Laborraum nicht rauchen, nicht trinken und nicht essen;
  - Schutzhandschuhe verwenden;
  - Nie mit dem Mund pipettieren;
  - Verspritzen von Flüssigkeiten vermeiden. Sollte doch Flüssigkeit vergossen worden sein, diese sofort aufnehmen und die verschmutzte Oberfläche desinfizieren.

- Bei der Verwendung des Testkits müssen die Anforderungen der guten Laborpraxis (GLP) inklusive aller Richtlinien beachtet werden.



Der Testkit beinhaltet Reizstoffe (**CONJ**, **CAL**, **CONTROL**). Daher sollten folgende Vorsichtsmaßnahmen beachtet werden:

- P261 - Einatmen von Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol vermeiden;
- P272 - Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen;
- P280 - Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen;
- P302+P352 - Bei Berührung mit der Haut: Mit viel Wasser und Seife waschen;
- P333+P313 - Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen;
- P363 - Kontaminierte Kleidung vor erneutem Tragen waschen;
- P501 - Inhalt/Behälter den nationalen Vorschriften entsprechend der Entsorgung zuführen.

Die Vorsichtsmaßnahmen entsprechen der Verordnung EG Nr. 1272/2008.



## 13. MANUELLER TEST (REF 21-02)

### 13.1 Packungsinhalt

<b>MP</b>	<b>Mikrotiterplatte:</b> Zwölf Streifen mit acht Kavitäten (insgesamt 96 Kavitäten), beschichtet mit monoklonalen Anti-Testosteron-Antikörpern	1 Platte
<b>CONJ</b>	<b>Konjugat:</b> Lösung aus Testosteron konjugiert mit HRP	18 ml, gebrauchsfertig
<b>0-5 CAL</b>	<b>Testosteron Kalibratoren:</b> Protein-basierter Puffer oder Lyophilisate mit definierter Testosteron-Konzentration - 0; 0,5; 1,5; 5; 15; 50 nmol/l (ungefähre Werte - verwenden Sie die Daten nicht für die Auswertung des Assays). Die exakten Lot spezifischen Testosteron-Konzentrationen sind im Quality Control Sheet angegeben.	6 Fläschchen, je 0,5 ml, gebrauchsfertig oder lyophilisiert
<b>CONTROL</b>	<b>Testosteron Kontrolle:</b> Protein-basierter Puffer oder Lyophilisat mit definierter Testosteron-Konzentration. Der Lot spezifische Testosteron-Konzentrationsbereich ist im Quality Control Sheet angegeben.	0,5 ml, gebrauchsfertig oder lyophilisiert
<b>SUB</b>	<b>Substrat (TMB-Lösung):</b> 3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin in Citrat-Puffer, mit Wasserstoffperoxid	14 ml, gebrauchsfertig
<b>WASH P 20X</b>	<b>Waschlösung P, 20x konzentriert,</b> Tensid in Salzlösung, ausreichend für die Vorbereitung von 560 ml Lösung.	2x14 ml, konzentriert
<b>STOP</b>	<b>Stopplösung:</b> 1 N HCl - Lösung	14 ml, gebrauchsfertig
	<b>Klebeschutzfolie</b>	2x1 Folie (optional)

## 13.2 Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien und Equipment

- geeichte, verstellbare Einkanal-Pipetten mit Einweg-Pipettenspitzen;
- geeichte, verstellbare 8-Kanal-Pipette mit Einweg-Pipettenspitzen;
- Mikrotiterplatten-Inkubator (+37 °C) oder Mikrotiterplatten/Inkubator-Schüttler (+37 °C, 500-800 rpm);
- Equipment zum manuellen oder automatischen Waschen;
- Spektralphotometer für Mikrotiterplatten (450 nm);
- Vortexer;
- Destilliertes oder entionisiertes Wasser;
- Messzylinder, Becherglas;
- Labor-Handschuhe;
- Behälter zum Pipettieren mit 8-Kanal-Pipette;
- Desinfektionsmittel;
- Absorbierendes Material (zum manuellen Waschen).

## 13.3 Testablauf

Der **Testosterone Testkit** ist für 96 Untersuchungen bestimmt. Vorbehaltlich einer gleichzeitigen Anwendung aller Streifen reicht ein Testkit für eine quantitative Doppelbestimmung von 40 Serumproben, 6 Kalibratoren, 1 Kontrolle und 1x Blank (=OD der TMB-Lösung).

### 13.3.1 Assay-Durchführung

#### Assay-Protokoll 1

(siehe auch Assay-Schema für Assay-Protokoll 1,  
Abschnitt 13.5)

- A. 50 µl Kalibratoren [CAL] (0-5), Kontrolle [CONTROL] und die vorbereiteten Serumproben in Zweifachbestimmung in entsprechende Kavitäten pipettieren. Kavitäten, A1-A2, bleiben frei (Blank)!**
- B. 150 µl Konjugat [CONJ] in alle Kavitäten, außer Kavitäten A1-A2, pipettieren.**

**Anmerkung:** *Die Gesamtzeit der Pipettiertschritte darf 15 Minuten nicht überschreiten, da es somit zu einer erheblichen Variation der Inkubationszeit zwischen den Proben kommt und das Testergebnis somit unzuverlässig sein kann.*

**Anmerkung:** *Wenn eine Klebeschutzfolie verwendet wird, nutzen sie diese jetzt um die Mikrotiterplatten zu verschließen.*

- C. 90 Minuten bei Raumtemperatur (+18...+25 °C) unter Schütteln (500 bis 800 rpm) inkubieren.**

**Anmerkung:** *Wenn eine Klebeschutzfolie verwendet wird, entfernen sie diese nun vorsichtig von der Mikrotiterplatte.*

- D. 4x, wie unten beschrieben, waschen.**
- E. 100 µl Substrat [SUB] in jede Kavität pipettieren (auch Blank); Streifen entweder bei Raumtemperatur im Dunkeln für 15–30 Minuten (abhängig von der Farbintensität) oder für 10 Minuten bei +37 °C unter Schütteln (500-800 rpm) inkubieren.**

- F. 100 µl Stopplösung STOP** in alle Kavitäten (auch Blank) in selber Reihenfolge und Geschwindigkeit wie das Substrat pipettieren und für **1-2 Minuten** bei Raumtemperatur schütteln.
- G. Messen der Optischen Dichte bei 450 nm innerhalb von 20 Minuten.**

### **Assay Protokoll 2: ohne Thermoschüttler**

(siehe auch Assay-Schema für Assay-Protokoll 2, Abschnitt 13.6)

- A. 50 µl Kalibratoren CAL (0-5), Kontrolle CONTROL** und die vorbereiteten **Serumproben in Zweifachbestimmung** in entsprechende Kavitäten pipettieren. **Kavitäten, A1-A2, bleiben frei («Blank»)!**
- B. 150 µl Konjugat CONJ** in alle Kavitäten, **außer** Kavitäten **A1-A2**, pipettieren.

**Anmerkung:** *Die Gesamtzeit der Pipettiertschritte darf 15 Minuten nicht überschreiten, da eine unterschiedliche Inkubationszeit zwischen den Proben zu unzuverlässigen Testergebnis führen kann.*

**Anmerkung:** *Wenn eine Klebeschutzfolie verwendet wird, nutzen sie diese jetzt um die Mikrotiterplatten zu verschließen.*

- C. 90 Minuten** bei **Raumtemperatur** (+18...+25 °C) inkubieren.

**Anmerkung:** *Wenn eine Klebeschutzfolie verwendet wird, entfernen sie diese nun vorsichtig von der Mikrotiterplatte.*

- D. 4x**, wie unten beschrieben, waschen.

- E. 100 µl Substrat SUB** in jede Kavität pipettieren (auch Blank); Streifen bei **Raumtemperatur im Dunkeln** für **15–30 Minuten** abhängig von der Farbintensität inkubieren.
- F. 100 µl Stopplösung STOP** in alle Kavitäten (auch Blank) in selber Reihenfolge und Geschwindigkeit wie das Substrat pipettieren und für **1-2 Minuten** bei Raumtemperatur schütteln.
- G. Messen der Optischen Dichte bei 450 nm innerhalb von 20 Minuten.**

### 13.3.2 Waschen

Es wird empfohlen, ein automatisches Mikroplatten-Waschgerät mit 4 Waschzyklen und einem jeweiligen Waschvolumen von 300 µl pro Kavität und Zyklus zu benutzen.

Die Waschprozedur kann ebenso manuell durchgeführt werden:

- Überstand aus den Kavitäten in einen Behälter mit Desinfektionsmittel werfen.
- 300 µl der vorbereiteten Waschlösung (Abschnitt 8) in jede Kavität geben, die Platte für 5 bis 10 Sekunden sorgfältig schütteln und den Überstand werfen. 4 Mal wiederholen.
- Ausklopfen der Kavitäten auf einer saugfähigen Unterlage bis alle Flüssigkeit entfernt ist.

### 13.4 Datenverarbeitung

Bei Benutzung eines Photometers, welcher keine Nullstellung erlaubt, wird der OD-Wert der Kavitäten A1-A2 («Blank») von allen anderen OD-Werten vor weiterer Kalkulation subtrahiert. *Beispiel:*

OD (Kalibrator 0) gemessen = 2,28 und OD (Blank) = 0,06;  
OD (Kalibrator 0) berechnet =  $2,28 - 0,06 = \underline{2,22}$

### 13.4.1 Datenverlässlichkeit (OD 450 nm)

Die Daten sollten folgende Kriterien erfüllen:

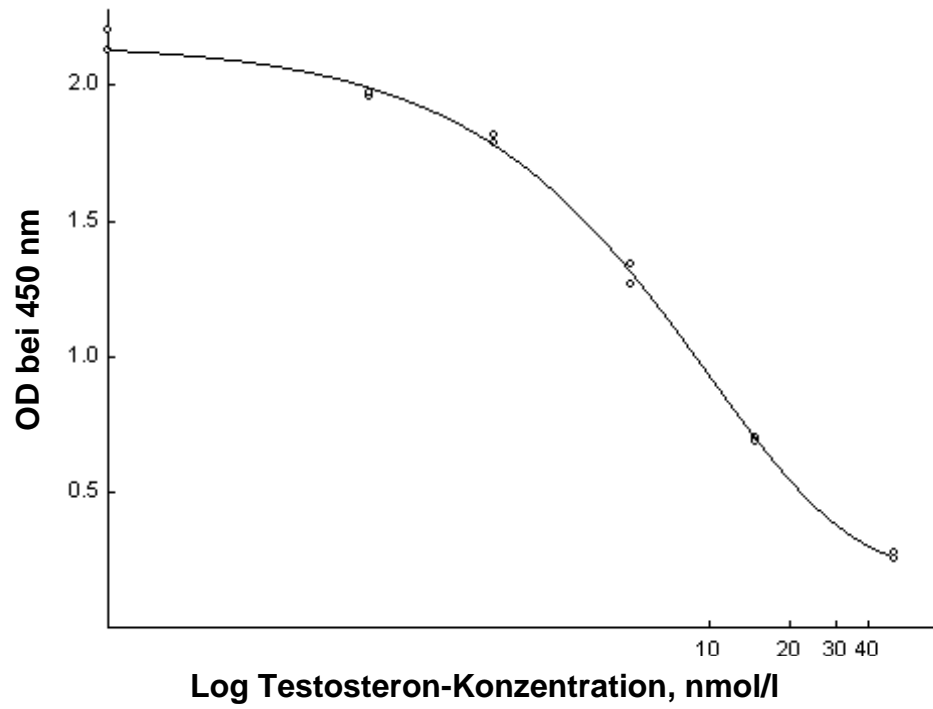
- Mittelwert der OD des Blank (der Kavitäten A1-A2)  $\leq 0,100$ ;
- Mittelwert der OD des Kalibrators 0  $\geq 1,0$  (nach Blank Subtraktion);
- Konzentration der Kontrolle muss innerhalb des Bereiches liegen, welcher auf dem Quality Control Sheet angegebenen ist.

Sollten die gemessenen Daten die Bedingungen nicht erfüllen, werden die Resultate als unzulässig betrachtet und der Test sollte wiederholt werden.

### 13.4.2 Quantitative Bestimmung

Eine spezialisierte Software zur quantitativen Bestimmung wird empfohlen. Die Mittelwerte der OD der Kalibratoren werden gegen deren jeweilige Testosteron-Konzentration mittels **4PL oder 5PL Näherung** (Abb. 2 Typische Standardkurve) aufgetragen. Die Konzentration des Testosterons in der Probe wird mit der Standardkurve ermittelt.

Eine Extrapolation der Standardkurve für Testosteron-Konzentrationswerte, die die Konzentration in Kalibrator 5 überschreiten (etwa 50 nmol/l), ist nicht zulässig.



*Abb. 2 Typische Standardkurve*

***Beispielstandardkurve! Nicht zur Auswertung benutzen***

### 13.5 Assay-Schema zum Assay-Protokoll 1

Reagenzien	Kavitäten		
	«Blank»	<b>CAL</b> <b>CONTROL</b>	Proben
<b>CAL</b> <b>CONTROL</b>	–	50 µl	–
Proben	–	–	50 µl
<b>CONJ</b>	–	150 µl	150 µl
Inkubation No.1	90 min, +18...+25 °C, 500–800 rpm		
<b>WASH P</b> (verdünnt)	4 x 300 µl		
<b>SUB</b>	100 µl	100 µl	100 µl
Inkubation No.2	15-30 min, +18...+25 °C, im Dunkeln		
	10 min, +37 °C, 500–800 rpm		
<b>STOP</b>	100 µl	100 µl	100 µl
Rühren	1–2 min, +18...+25 °C		
OD-Messung	450 nm		
Berechnung	Spezielle Software		



### 13.6 Assay-Schema zum Assay-Protokoll 2: ohne Thermoschüttler

Kavitäten Reagenzien	«Blank»	<b>CAL</b> <b>CONTROL</b>	Proben
	<b>CAL</b> <b>CONTROL</b>	–	50 µl
Proben	–	–	50 µl
<b>CONJ</b>	–	150 µl	150 µl
Inkubation No.1	90 min, +18...+25 °C (vorher 1-2 Min bei Raumtemperatur schütteln)		
<b>WASH P</b> (verdünnt)	4 x 300 µl		
<b>SUB</b>	100 µl	100 µl	100 µl
Inkubation No.2	15-30 min, +18...+25 °C, im Dunkeln		
<b>STOP</b>	100 µl	100 µl	100 µl
Rühren	1–2 min, +18...+25 °C		
OD-Messung	450 nm		
Berechnung	Spezielle Software		

## 14. AUTOMATISIERTER TEST (REF 21-02 A)

### 14.1 Packungsinhalt

<b>MP</b>	<b>Mikrotiterplatte:</b> Zwölf Streifen mit acht Kavitäten (insgesamt 96 Kavitäten), beschichtet mit monoklonalen Anti-Testosteron-Antikörpern.	1 Platte
<b>CONJ</b>	<b>Konjugat:</b> Lösung aus Testosteron-konjugiert mit HRP.	18 ml, gebrauchsfertig
<b>0-5 CAL</b>	<b>Testosteron Kalibratoren:</b> Protein-basierte-Lösung oder Lyophilisate mit definierter Testosteron-Konzentration: 0; 1,5; 5; 15; 50, 100 nmol/l (ungefähre Werte- bitte nicht für die Auswertung von realen Testdaten verwenden). Für Lot spezifische Testosteron-Konzentrationen siehe Werte im Quality Control Sheet.	8 Fläschchen, je 0,5 ml <b>CAL</b> 2, 3 – 2 × 0,5 ml; <b>CAL</b> 0, 1, 4, 5 – 1 × 0,5 ml; gebrauchsfertig oder lyophilisiert
<b>CONTROL</b>	<b>Testosteron Kontrolle:</b> Protein-basierte-Lösung oder Lyophilisat mit definierter Testosteron-Konzentration. Der Testosteron-Konzentrationsbereich ist im Quality Control Sheet angegeben.	2 x 0,5 ml gebrauchsfertig oder lyophilisiert
<b>WASH P 20X</b>	<b>Waschlösung P, 20x konzentriert:</b> Tensid in Salzlösung, ausreichend für die Vorbereitung von 1000 ml Lösung.	50 ml, konzentriert
<b>SUB</b>	<b>Substrat (TMB-Lösung):</b> 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in Citrat-Puffer mit Wasserstoffperoxid.	14 ml, gebrauchsfertig
<b>STOP</b>	<b>Stopplösung:</b> 1 N HCl-Lösung Reinigungslösung	19 ml, gebrauchsfertig
<b>TRIAL 5000X</b>	<b>Trial-Lösung, 5000x konzentriert:</b> Reinigungslösung	Muss separat bestellt werden

**Anmerkung:** *Extra Fläschchen der **CAL** 2 und 3 sowie **CONTROL** werden zur Rekalibrierung der Referenz-Standardkurve bereitgestellt. Genauere Informationen sind in der Gebrauchsanleitung des ELISA-Automaten "Alisei" zu finden.*

## 14.2 Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien und Equipment

- ELISA-Automat "Alisei";
- Polypropylen Röhren 12x 75, Volumen: 5,5 ml;
- **TRIAL 5000X** Trial-Lösung, 5000x konzentriert\*;
- Deionisiertes oder destilliertes Wasser,
- Laborhandschuhe.

## 14.3 Testverfahren

Der **Testosterone Testkit** ist für 96 Untersuchungen bestimmt. Vorbehaltlich einer gleichzeitigen Anwendung aller Streifen reicht ein Testkit für eine Einzelbestimmung von 88 Serumproben, 6 Kalibratoren, 1 Kontrolle und für die Bestimmung des Blank (=OD der TMB-Lösung).

### 14.3.1 Reagenzienvorbereitung

Vor dem Gebrauch müssen alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht und gründlich gemischt werden.

**Anmerkung:** *Vorbereitung der anderen Reagenzien siehe Abschnitt 8.*

**TRIAL** Trial-Lösung zum Reinigen der gerät-internen Hydraulikleitungen und Nadeln des ELISA-Automaten.

Zubereitung der benötigten Menge der Trial-Lösung vor der

---

\* Reagenz ist nicht Teil des Kits und kann separat bezogen werden.

Analyse durch 5000fache Verdünnung des Konzentrates mit destilliertem oder deionisiertem Wasser:

2 ml **TRIAL** **5000X** + 9998 ml Wasser

Sorgfältig mischen, Schaumbildung vermeiden.

### **14.3.2 Testablauf des automatisierten Tests**

Bei Benutzung des ELISA-Automaten "Alisei" ist die entsprechende Gebrauchsanweisung des Gerätes zu verwenden. Die Durchführung des Enzymassays mit „Alisei“ ist komplett automatisch: Pipettieren der Reagenzien, Waschschritte, Inkubation, OD-Messung und Analyse der Testergebnisse. Das Programm zur Berechnung der Testosteron-Konzentration ist im Gerät ebenfalls enthalten.

## **14.4 Datenverarbeitung**

### **14.4.1 Daten Verlässlichkeit (OD 450 nm)**

Siehe Kriterien des Abschnittes **13.4.1**.

## **14.5 Vorsichtsmaßnahmen**

- Bei mehrfacher Nutzung des Testkit in einem ELISA-Automaten müssen die Reagenzien aufgrund der Verdunstung unmittelbar nach Beenden des Pipettiervorganges aus dem Automaten genommen werden, um einen möglichen Verlust durch Verdunstung zu vermeiden. Die Reagenzien sind in den Kühlschrank zu stellen.
- Die Rekalibrierung anhand der Standardkurve eines Testkits mit anderer Lotnummer ist nicht zulässig.

## 2. INTENDED USE

The **Testosterone kit** is provided for the **quantitative** determination of **testosterone** in human serum.

This test has 2 complete sets:

**REF 21-02** for manual use,

**REF 21-02 A** must be used with ELISA automatic instrument "Alisei" manufactured by NEXT Level S.r.l. hereinafter referred to as analyser "Alisei".

Instructions for use:

Section 13 for manual test,

Section 14 for analyser "Alisei".

**Note 1:** *Take into account that calibrators' nominals can be different for manual and automatic test kits.*

**Note 2:** *We guarantee applications of test:*

**REF 21-02 A** only on analyser "Alisei",

**REF 21-02** only for manual use.

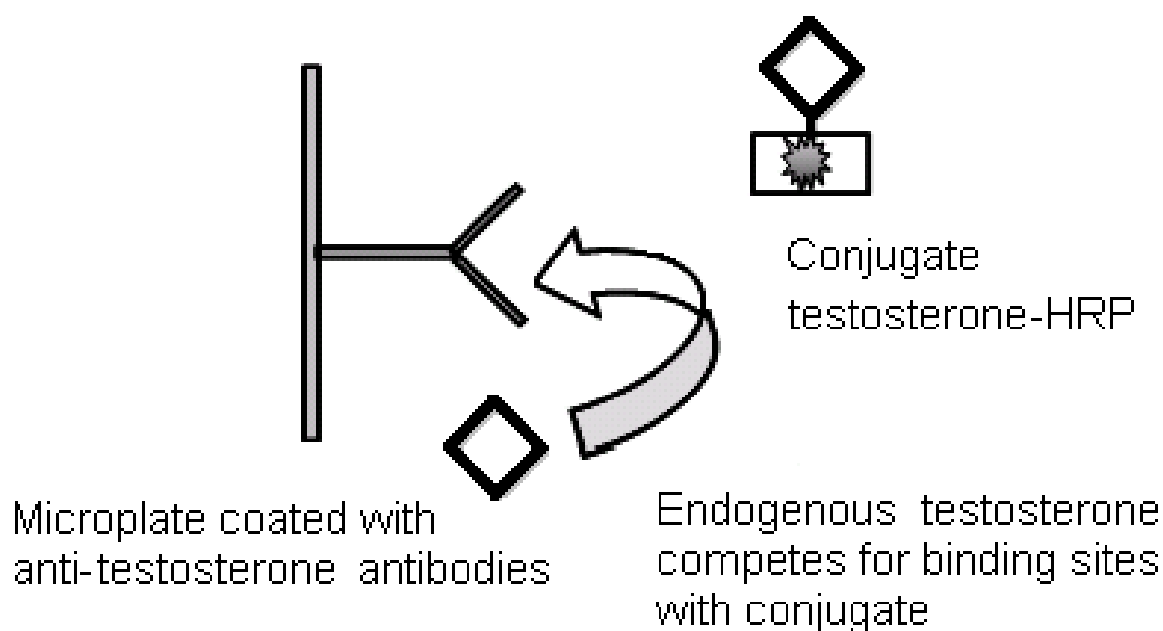
*While using non predefined methods of use, it is under end user responsibility, to make sure that it was appropriately tested for ELISA kits.*

Testosterone is a steroid hormone with a molecular mass of 288.4 Da. Testosterone is synthesized mainly in testicles and, in sufficiently less extent, in ovaries and adrenal cortex. The determination of serum testosterone is a valuable tool for investigation of testis function and diagnostics of some adrenal, ovary and testicle tumors as well as female hirsutism.

### 3. PRINCIPLE OF THE TEST

The **Testosterone kit** is a competitive solid phase enzyme immunoassay. During the incubation testosterone of tested samples and horseradish peroxidase (HRP) labeled testosterone bind to the antibodies coated onto the inner surface of the microplate wells until balance between them occurs. Separation of free and bound to antibodies testosterone and conjugate testosterone-peroxidase occurs while extracting the contents of the wells. The amount of bound conjugate is inversely proportional to the quantity of testosterone in the sample (Fig. 1).

During the incubation with TMB solution the colour is developing. The intensity of the colour is inversely proportional to the testosterone concentration in specimens. The testosterone concentration in the patient sample is read from a standard curve that is processed in each assay.



*Fig. 1 Assay scheme*

## 4. STORAGE AND STABILITY OF THE KIT

Expiry date of the kit is printed on the box label; expiry date for each component is printed on the respective label.

The **Testosterone kit** should be stored at +2...+8 °C upon receipt, preferably in the original kit box, until the expiration date. Storage at +25 °C is allowed but for no more than 5 days.

Shelf life of the kit is 18 months.

After initial opening the kit is stable for 12 months if stored at +2...+8 °C.

If used in several separate experiments, after initial opening kit contents should be stored as follows but never used longer than the expiration date:

- unused strips: in a firmly closed resealable zipper bag at +2...+8 °C until expiration date;
- vials with calibrators and control and conjugate (liquid): at +2...+8 °C for 12 months; vials with calibrators and control (reconstituted): at +2...+8 °C for no more than 1 month after opening;
- vial with substrate: at +2...+8 °C until expiration date, protected from light;
- vials with concentrated Trial, concentrated wash solution, and stop solution: at +2...+8 °C until expiry date;
- wash solution prepared for use: at room temperature (+18...+25 °C) for no more than 5 days or at +2...+8°C for no more than 4 weeks in a firmly closed bottle;
- Trial solution prepared for use: at room temperature (+18...+25 °C) for no more than 5 days in a firmly closed bottle.

## Damaged Test Kits

In case of any severe damage of the test kit or components, Astra Biotech GmbH has to be informed in writing, during one week after receiving the kit. Usage of severely damaged single components for a test run is not recommended.

### 5. SAMPLE COLLECTION AND STORAGE

Collect blood by venipuncture in a tube without anticoagulants. Allow blood to clot. Centrifuge the specimens to separate serum from the blood corpuscles.

Do not use plasma, haemolyzed (bright red) or lipaemic (milky) serum samples as well as samples containing sodium azide as preservative.

Store serum samples at +2...+8 °C for no more than 2 days. Aliquot and freeze the samples for longer storage ( $\leq -20$  °C). Avoid repeated freezing.

### 6. EXPECTED VALUES

Serum samples collected between 9 and 11 a.m. from 70 apparently healthy people, both males and females, between the ages of 21–45, were assayed with **Testosterone kit**. The results are listed below. These limits should be considered as guidelines only.

Group	Number of samples	Mean (nmol/L)	Range (nmol/L)
Female	37	1.8	0.5-4.3
Male	33	19.2	12.1-38.3

It is highly recommended each laboratory to determine its own reference range of testosterone concentrations.



## 7. QUALITY CONTROL

It is recommended to use control samples according to the state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results.

## 8. REAGENT PREPARATION

Allow all the reagents to reach room temperature (+18...+25 °C), and then thoroughly stir.

### **MP** Microplate

Keep the **microplate** at room temperature for at least 30 minutes before opening the bag. Place required number of strips onto strip holder. Place unused strips into the resealable zipper bag and reseal duly.

### **CAL** **CONTROL** Calibrators and Control

Liquid calibrators and control are ready to use.

Prepare lyophilized calibrators and control as follows. Gently tap on the vial caps to knock off all the dry matter. Open the vials and carefully place the caps upside down on the clean dry surface. Add 0.5 mL of distilled or deionized water to each vial with lyophilized calibrators and control, close vials with the corresponding caps and leave for 10 min at room temperature without stirring. Then stir gently avoiding foaming, until the dry matter is completely dissolved. Leave for another 10 minutes at room temperature stirring gently periodically. Make sure that no dry matter is left on the caps and walls of the vials.

### **WASH P** Wash solution

Prepare required volume of **wash solution** by dilution of the concentrate 20-fold with distilled or deionized water. For example:

5 mL **WASH P 20X** + 95 mL water

Mix thoroughly, avoid foaming.

### **SUB** Substrate

Protect **substrate** from direct light.

## 9. SAMPLE PREPARATION

Allow samples to reach room temperature. Stir samples gently in order to ensure homogeneity.

## 10. PERFORMANCE CHARACTERISTICS OF THE ASSAY

### 10.1 Calibration-Traceability:

The **Testosterone kit** was calibrated against the Working Standard, which had been manufactured by gravimetric method based on weighing purified synthetic testosterone into analyte-free matrix.

### 10.2 Specificity:

Cross-reaction of anti-testosterone monoclonal antibodies with different steroids is shown below.

<b>Steroid</b>	<b>Cross-reaction, %</b>
Testosterone	100.0
5- $\alpha$ -Dihydrotestosterone	9.8
Androstendiol	2.0
Androstenolone	0.2
Androstandione	1.3
Dehydroepiandrosterone	0.2
Cortisol	0.04
Progesterone	0.1
Estrone	0.06
Estradiol	0.9
Estriol	0.02

### 10.3 Analytical Sensitivity:

Analytical sensitivity of **Testosterone kit**, i.e. concentration, that can be distinguished from zero calibrator is 0.2 nmol/L (for manual and Alisei kits). It was defined as mean OD of 10 replicates of calibrator 0 minus 2 SD.

### 10.4 Measurement Range:

The **Testosterone kit** was validated for measurement of testosterone concentration within the concentration diapason of 0.2 - 50 nmol/L (for manual test) and 0.2 - 100 nmol/L (for Alisei kit).

### 10.5 Measurement Units:

In **Testosterone kit** the concentrations of calibrators are specified in nmol/L. To convert into ng/mL, multiply the concentration in nmol/L by 0.288.

### 10.6 Intra- and Inter-Assay Variation (Precision):

For **intra-assay CV** determination, 8 serum samples were run, each in 9 replicates. The results are shown below.

Manual kit

Sample	Mean testosterone concentration, nmol/L	Intra-assay CV	
		SD	CV, %
1	1.14	0.177	15.4
2	1.37	0.209	15.3
3	4.68	0.295	6.3
4	13.0	0.75	5.8
5	16.9	0.42	2.5
6	17.2	0.60	3.5
7	19.6	0.59	3.0
8	26.2	0.74	2.8

## Alisei kit

Sample	Mean testosterone concentration, nmol/L	Intra-assay CV	
		SD	CV, %
1	1.07	0.050	4.7
2	2.83	0.100	3.5
3	5.61	0.183	3.3
4	7.47	0.229	3.1
5	11.34	0.436	3.8
6	15.70	0.557	3.5
7	19.11	0.488	2.6
8	29.56	0.726	2.5

For **inter-assay CV** determination, 10 serum samples were assayed 4 times by different operators with 1-week interval. Each specimen was run in 2 replicates. The results are shown below.

## Manual kit

Sample	Mean testosterone concentration, nmol/L				Inter-assay CV	
	Assay 1	Assay 2	Assay 3	Assay 4	SD	CV, %
1	0.71	0.76	0.79	0.69	0.046	6.2
2	1.34	1.44	0.97	1.07	0.221	18.4
3	1.34	1.33	1.50	1.29	0.093	6.8
4	2.07	1.93	1.93	1.95	0.067	3.4
5	2.33	2.60	2.14	2.25	0.196	8.4
6	12.3	14.2	14.1	12.9	0.92	6.9
7	12.7	14.7	14.1	13.9	0.84	6.0
8	13.8	15.1	17.7	15.6	1.60	10.3
9	14.3	17.0	16.4	15.3	1.20	7.6
10	16.4	18.4	16.6	16.5	0.96	5.7

## Alisei kit

Sample	Mean testosterone concentration, nmol/L				Inter-assay CV	
	Assay 1	Assay 2	Assay 3	Assay 4	SD	CV, %
1	1.12	1.09	1.13	0.99	0.064	5.9
2	2.96	2.54	2.77	2.61	0.187	6.9
3	5.79	5.21	5.68	5.53	0.252	4.5
4	7.85	7.16	7.49	7.01	0.373	5.1
5	11.49	11.06	12.62	11.98	0.670	5.7
6	17.64	16.90	15.31	15.85	1.045	6.4
7	19.00	17.62	20.44	19.87	1.227	6.4
8	23.51	21.19	22.82	23.99	1.223	5.3
9	26.58	27.89	26.54	28.12	0.840	3.1
10	35.06	31.85	33.41	32.79	1.350	4.1





## 11 LIMITATION OF THE METHOD

Any clinical diagnosis should not be based on the results of in vitro diagnostic methods alone. For diagnosis establishment, a physician is supposed to consider all available clinical and laboratory findings.

## 12 SAFETY PRECAUTIONS

- **This kit is for in vitro diagnostic use only.** Operator should follow the manual closely in order to ensure reliable data. The manual is valid for the present kit only, within the listed composition. Any substitution of kit components is not allowed by CE regulations.
- Do not use kit or its components after expiry date indicated on the label. Take into account stability period for reconstituted reagents.

- Do not mix or use together reagents from different lots of the kit except substrate, stop solution and wash solution.
- Do not use substrate, stop solution and wash solution supplied by other vendors.
- Use only “P”-labeled Astra Biotech wash solution.
- Note that stop solution is 1 N HCl solution. Avoid contacts with skin and mucosa. In case of contact rinse affected area thoroughly with plenty of water and seek medical advice.
- Take into account the following common procedural notes:
  - always pipette reagents into wells immediately after washing procedure;
  - avoid contamination of the solutions;
  - in case of partial use of the kit, dispense only required volume of the reagent into the tray;
  - do not pour unused reagents back into the original vials;
  - avoid exposure to direct sunlight during incubations;
  - always pipette reagents in the same order to minimize reaction time differences between wells; the total dispensing time for the calibrators, control and samples must not exceed 15 min;
  - the incubation temperature for all the immunological reactions must be kept at recommended by this instruction levels;
  - do not touch the bottom of the wells;
  - calibrators should be measured in each separate assay. It is also recommended to measure each time testosterone concentration in the control;
  - remove the adhesive foil carefully to avoid contamination and don't use the adhesive foil repeatedly.

- TMB solution should be colourless. Light colouring of solution is admissible. Avoid direct exposure of substrate to sunlight.
-  Source materials of human origin used for kit components preparation were tested and found negative for HBsAg, anti-HIV and anti-HCV antibodies. However, none of known laboratory test guarantees absence of these viral agents. Therefore, all kit components and patient's samples should be handled as potentially hazardous.
-  After usage strips, calibrators, control, specimens and all consumables which contacted with specimens during handling, storage or assay (tubes, vials, gloves, pipette tips etc.) should be collected separately and sterilized by autoclaving. Instead of autoclaving pipette tips may be sterilized by disinfectant treatment. After sterilization all components and expendable materials may be utilized as non-dangerous garbage. Other components of the kit should be discarded into conventional garbage.
-  During manual washing procedure do not discard the contents of the wells directly to drainage. Use a container with disinfectant solution.
-  As the kit contains potentially hazardous material, the following precautions should be taken:
  - do not smoke, eat or drink while performing the assay;
  - always use protective gloves;
  - never pipette material by mouth;

- in case of spilling, wipe up the spills promptly and wash affected area thoroughly using decontaminant.
- GLP including all general and individual regulations should be applied for the kit usage.



As the kit contains irritant (**CONJ**, **CAL**, **CONTROL**), the following precautions should be observed:

- P261 - Avoid breathing spray;
- P272 - Contaminated work clothing should not be allowed out of the workplace;
- P280 - Wear protective gloves/protective clothing/eye protection;
- P302+P352 - IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water;
- P333+P313 - If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention;
- P363 - Wash contaminated clothing before reuse;
- P501 - Dispose of contents/container in accordance with national regulation.

Precautionary statements according to Regulation EC No 1272/2008.



## 13 MANUAL TEST (REF 21-02)

### 13.1 Material Provided

<b>MP</b>	<b>Microplate:</b> 12 breakable 8-well strips (total 96 wells) coated with anti-testosterone monoclonal antibodies	1 pcs
<b>CONJ</b>	<b>Conjugate:</b> solution containing testosterone conjugated with HRP	18 mL, ready to use
<b>0-5 CAL</b>	<b>Testosterone calibrators:</b> protein-based solutions or lyophilized preparations containing known testosterone concentrations – 0; 0.5; 1.5; 5; 15; 50 nmol/L (approximate values - do not use for evaluation of real assay data). For lot specific testosterone concentrations see values in the Quality Control Sheet.	<b>6 vials,</b> 0.5 mL each; ready to use or lyophilized
<b>CONTROL</b>	<b>Testosterone control:</b> protein-based solution or lyophilized preparation containing known testosterone concentration. For lot specific ranges of testosterone concentration see values in the Quality Control Sheet.	0.5 mL, ready to use or lyophilized
<b>SUB</b>	<b>Substrate (TMB solution):</b> 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine solution in citrate buffer containing hydrogen peroxide	14 mL, ready to use
<b>WASH P 20X</b>	<b>Wash solution P, 20X concentrated:</b> surfactant in buffered saline, sufficient for preparation of 560 mL of solution	2x14 mL, concentrated
<b>STOP</b>	<b>Stop solution:</b> 1 N HCl solution	14 mL, ready to use
	<b>Adhesive foil</b>	2x1 foil (optional)

## 13.2 Equipment and Materials required but not provided

- 1-channel calibrated variable precision pipettes, with disposable tips;
- 8-channel calibrated variable precision pipette, with disposable tips;
- microplate incubator (+37 °C) or microplate incubator-shaker (+37 °C, shaking speed 500–800 rpm);
- manual or automatic equipment for rinsing wells;
- calibrated microplate reader (450 nm);
- vortex tube mixer;
- deionized or distilled water;
- graduated beaker and cylinder of appropriate volume;
- latex or plastic gloves;
- trays for pipetting reagents with 8-channel pipette;
- disinfectant;
- absorbent material (for manual wash).

## 13.3 Test Procedure

The **Testosterone kit** is designed for 96 tests. This is sufficient for the **quantitative assay** of 40 unknowns, 6 calibrators, 1 control and 1 blank (OD of TMB solution) in duplicates, provided that all the strips are used simultaneously.

### 13.3.1 Assay Procedure

#### Assay Protocol 1

(see also Assay scheme to Assay Protocol 1, section 13.5)

**All samples should be tested in duplicates.**

- A.** Pipette **50 µL** calibrators **CAL** (0-5), control **CONTROL** and prepared **patient's samples in duplicates** into the respective wells; **Leave wells A1-A2 empty for blank!**
- B.** Pipette **150 µL** conjugate **CONJ** into each well, **except wells A1-A2.**

**Note:** *total time of dispensing must not exceed 15 minutes, otherwise the test result may be unreliable, because the time of incubation will substantially vary for different samples.*

**Note:** *If an adhesive foil is used, put it now onto the plate to seal the cavities.*

- C.** Incubate strips for **90 minutes while shaking (500–800 rpm) at room temperature (+18...+25 °C).**

**Note:** *If an adhesive foil is used, remove it now from the plate.*

- D.** Wash 4 times, as described below.
- E.** Pipette **100 µL** substrate **SUB** into each well (including blank); incubate **at room temperature in the dark for 15-30 minutes** (depending on the colour intensity) **or 10 minutes while shaking (500-800 rpm) at +37 °C.**
- F.** Pipette **100 µL** stop solution **STOP** into each well (including blank) in the same sequence and at the same speed as used for dispensing TMB substrate. **Shake for 1–2 min at room temperature.**
- G.** Read **OD at 450 nm within 20 min.**

## Assay Protocol 2: (without shaking)

(see also Assay scheme to Assay Protocol 2, section 13.6)

**All samples should be tested in duplicates.**

- A. Pipette **50 µL** calibrators **CAL** (0-5), control **CONTROL** and **patient's samples in duplicates** into the respective wells; **Leave wells A1-A2 empty for blank!**
- B. Pipette **150 µL** conjugate **CONJ** into each well, **except wells A1-A2.**

**Note:** *total time of dispensing must not exceed 15 minutes, otherwise the test result may be unreliable, because the time of incubation will substantially vary for different samples.*

**Note:** *If an adhesive foil is used, put it now onto the plate to seal the cavities.*

- C. Incubate strips for **90 minutes at room temperature** (+18...+25 °C) (pre-shake for 1-2 minutes at room temperature).

**Note:** *If an adhesive foil is used, remove it now from the plate.*

- D. Wash 4 times, as described below.
- E. Pipette **100 µL** substrate **SUB** into each well (including blank); incubate **at room temperature in the dark for 15-30 minutes** (depending on the colour intensity).
- F. Pipette **100 µL** stop solution **STOP** into each well (including blank) in the same sequence and at the same speed as used for dispensing TMB substrate. **Shake for 1–2 min at room temperature.**
- G. Read **OD at 450 nm within 20 min.**

### 13.3.2. Wash Procedure

It is advisable to use an automatic microplate washer set at 4 wash cycles and a volume of 300  $\mu\text{L}$  of wash solution per well per cycle.

If an automatic washer is not available, the wash procedure can be carried out manually as follows:

- remove the contents of the wells into a container with disinfectant;
- dispense 300  $\mu\text{L}$  of wash solution (section 8) into each well, shake the plate carefully for 5–10 sec and remove the contents of the wells; repeat 4 times;
- strike the wells sharply on absorbent material to remove any liquid residue.

### 13.4 Data Processing

If the reader cannot be adjusted to zero using the substrate blank in wells A1-A2, subtract mean OD value of wells A1-A2 from all OD values before further calculations.

*Example:*

OD (Cal 0) measured = 2.28 and OD (blank) = 0.06;

OD (Cal 0) calculated =  $2.28 - 0.06 = \underline{2.22}$

#### 13.4.1 Data Reliability (for OD measured at 450 nm)

The data should meet the following criteria:

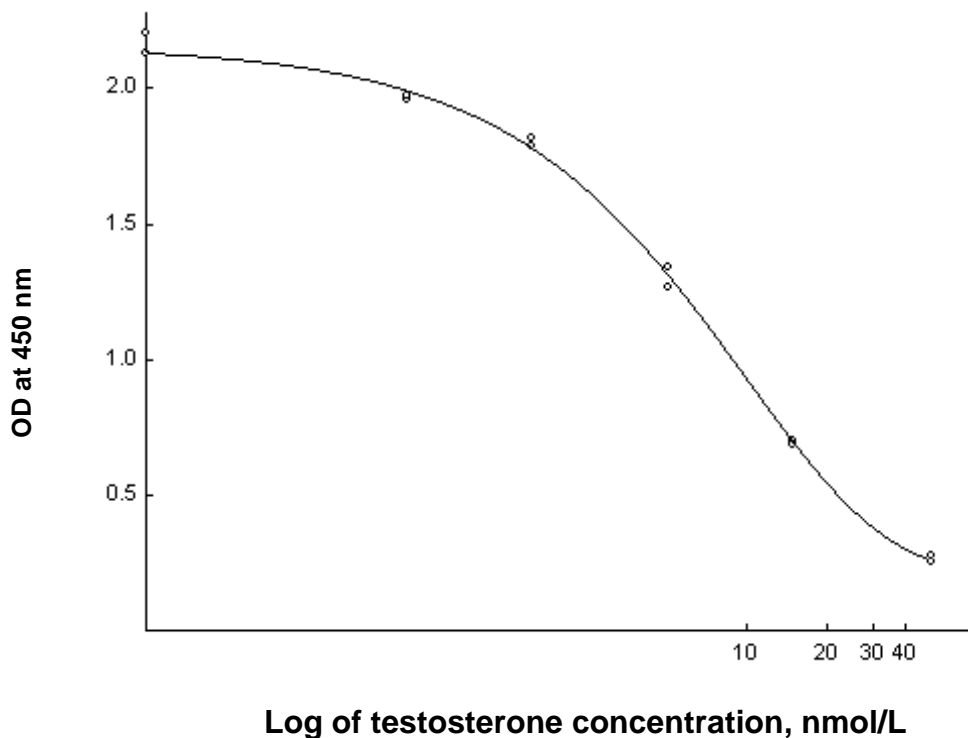
- average blank OD (in wells A1-A2)  $\leq 0.100$ ;
- average OD of Cal 0  $\geq 1.0$  (after blank subtraction);
- control's concentration must fall within the acceptability range that is shown in Quality Control Sheet.

If the data obtained do not meet the criteria, the results are considered unreliable and the test should be repeated.

### 13.4.2 Quantitative Determination

Specialized software for quantitative determination is recommended. Mean OD of calibrators are plotted versus their respective testosterone concentrations using **4PL** or **5PL** fit (Fig. 2 Typical standard curve). Calculate concentration of testosterone in samples using standard curve.

Any extrapolation of the standard curve to testosterone concentration above the nominal value of the calibrator 5 (approximately 50 nmol/L) is forbidden.



*Fig. 2 Example of typical standard curve*  
**Do not use for evaluation of real assay data!**

### 13.5 Assay scheme to Assay Protocol 1

Reagents	Wells	«Blank»	<b>CAL</b>	Samples
			<b>CONTROL</b>	
<b>CAL</b>		–	50 µL	–
<b>CONTROL</b>				
Samples		–	–	50 µL
<b>CONJ</b>		–	150 µL	150 µL
Incubation No.1	90 min, +18...+25 °C, 500–800 rpm			
<b>WASH P</b> (diluted)	4 x 300 µL			
<b>SUB</b>	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Incubation No.2	15-30 min, +18...+25 °C, in the dark			
	10 min, +37 °C, 500–800 rpm			
<b>STOP</b>	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Stirring	1–2 min, +18...+25 °C			
OD measuring	450 nm			
Calculations	Corresponding software			

## 13.6 Assay scheme to Assay Protocol 2 (without shaking)

Wells	«Blank»	<b>CAL</b> <b>CONTROL</b>	Samples
Reagents			
<b>CAL</b> <b>CONTROL</b>	–	50 µL	–
Samples	–	–	50 µL
<b>CONJ</b>	–	150 µL	150 µL
Incubation No.1	90 min, +18...+25 °C (pre-shake for 1-2 minutes at room temperature)		
<b>WASH P</b> (diluted)	4 x 300 µL		
<b>SUB</b>	100 µL	100 µL	100 µL
Incubation No.2	15-30 min, +18...+25 °C, in the dark		
<b>STOP</b>	100 µL	100 µL	100 µL
Stirring	1–2 min, +18...+25 °C		
OD measuring	450 nm		
Calculations	Corresponding software		



## 14. AUTOMATIC TEST (REF 21-02 A)

### 14.1. Material Provided

<b>MP</b>	<b>Microplate:</b> 12 breakable 8-well strips (total 96 wells) coated with anti-testosterone monoclonal antibodies	1 pcs
<b>CONJ</b>	<b>Conjugate:</b> solution containing testosterone conjugated with HRP	18 mL, ready to use
<b>0-5 CAL</b>	<b>Testosterone calibrators:</b> protein-based solutions or lyophilized preparations containing known testosterone concentrations – 0; 1.5; 5; 15; 50, 100 nmol/L (approximate values - do not use for evaluation of real assay data). For lot specific testosterone concentrations see values provided in the Quality Control Sheet	<b>8 vials,</b> 0.5 mL each: <b>CAL</b> 2, 3 – 2 × 0.5 mL; <b>CAL</b> 0, 1, 4, 5 – 1 × 0.5 mL; ready to use or lyophilized
<b>CONTROL</b>	<b>Testosterone control:</b> protein-based solution or lyophilized preparation containing known testosterone concentration. For lot specific ranges of testosterone concentration see Quality Control Sheet	2 × 0.5 mL; ready to use or lyophilized
<b>WASH P 20X</b>	<b>Wash solution P, 20X concentrated:</b> surfactant in buffered saline, sufficient for preparation of 1000 mL of solution	50 mL, concentrated
<b>SUB</b>	<b>Substrate (TMB solution):</b> 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine solution in citrate buffer containing hydrogen peroxide	14 mL, ready to use
<b>STOP</b>	<b>Stop solution:</b> 1 N HCl solution	19 mL, ready to use
<b>TRIAL 5000X</b>	<b>Trial solution, 5000X concentrated:</b> solution of detergent	It is delivered by separate order

**Note:** *Extra vials of **CAL** 2, 3 and **CONTROL** are provided for recalibration on reference calibration curve. For detailed information see instructions for use for analyser “Alisei”.*

## 14.2. Equipment and Materials Required but not provided

- Automatic analyser for ELISA kits on microplate (analyser “Alisei”);
- multipurpose polypropylene tubes 12x75 volume 5.5 mL;
- **TRIAL** **5000X** Trial solution, 5000X concentrated\*;
- deionized or distilled water;
- latex or plastic gloves.

## 14.3. Test Procedure

The **Testosterone kit** is designed for 96 tests. This is sufficient for 88 unknowns, 6 calibrators, 1 control and 1 blank (OD of TMB solution) in monoplicates, provided that all the strips are used simultaneously.

### 14.3.1. Reagent Preparation

Allow all the reagents to reach room temperature, and then thoroughly stir.

**Note:** *Preparation of other reagents see in section 8.*

**TRIAL** Working solution of Trial for washing internal hydraulic lines and needles of automatic analyser “Alisei”.

Prepare required volume of **Trial solution** by dilution of the concentrate 5000-fold with distilled or deionized water before analysis:

2 mL **TRIAL** **5000X** + 9998 mL water

Mix thoroughly, avoid foaming.

---

\* Reagent is not included in the kit, it is delivered by separate order.

### **14.3.2. Assay Procedure for Automatic Test**

While using for the procedure analyser “Alisei”, refer to its relative manual.

The analysis on analyser “Alisei” is completely automatic: pipetting of reagents, washing, incubation, OD measurement, analysis of results. The program of calculation testosterone concentration is hardwired in analyser memory.

### **14.4. Data Processing**

#### **14.4.1. Data Reliability (OD 450 nm)**

See criteria in section 13.4.1.

### **14.5. Safety precautions**

- If kit for analyser “Alisei” is used in several separate experiments it is necessary to take reagents from analyser “Alisei” immediately after pipetting them in the wells of all plates because liquid evaporates from vials. Put the reagents in refrigerator;
- Recalibration using calibration curve, obtained with a kit of any other lot, is not permitted.

August, 22, 2019



Astra Biotech GmbH  
Rudower Chaussee 29,  
12489 Berlin, Germany  
Telefon: +49 (0)30 74696509  
E-Mail: [info@astrabiotech.de](mailto:info@astrabiotech.de)  
[www.astrabiotech.de](http://www.astrabiotech.de)