



DiaMetra



## TESTOSTERONE SALIVA

para análisis de rutina

Determinación inmunoenzimática directa de testosterona en la saliva.

IVD



LOT

Ver etiqueta externa

2°C - 8°C



Σ = 96 ensayos

REF DKO021

### USO PREVISTO

Método competitivo inmunoenzimático colorimétrico para la determinación cuantitativa de testosterona en la saliva.

El kit Testosterona Saliva está destinado al uso en laboratorio exclusivamente.

### 1. SIGNIFICADO CLÍNICO

La testosterona (17β-OH-4-androstene-3-one) es una hormona esteroidea de la familia de los andrógenos.

En varones postpuberales, la testosterona es secretada principalmente por los testículos y una parte proviene de la conversión periférica de la androstenediona. En las mujeres, más del 50% de la testosterona sérica proviene de la conversión periférica de la androstenediona secretada por el ovario y de la secreción directa de testosterona de estas glándulas

Los niveles de testosterona en saliva (pg/mL) son significativamente inferiores con respecto a los niveles séricos.

Los efectos de la testosterona pueden clasificarse como sexuales y anabólicos, aunque la distinción sea artificial. Entre los efectos anabólicos se incluyen el desarrollo de la masa y la resistencia muscular, el aumento de la densidad y de la resistencia ósea, y el desarrollo y maduración lineal del hueso. Entre los efectos sexuales se incluyen la maduración de los órganos involucrados y, después del nacimiento (durante la pubertad), el agravamiento de la voz, el crecimiento de la barba y de vello corporal (características sexuales secundarias masculinas).

Los niveles de testosterona disminuyen gradualmente con la edad en los hombres (andropausia). Los síntomas de la andropausia se asocian generalmente al envejecimiento, como la pérdida de la masa muscular y la disminución de la densidad ósea, la disminución de la resistencia física, la disminución de la capacidad de memoria y la pérdida de la libido.

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

### 2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

La testosterona (antígeno) presente en la muestra compete con el antígeno marcado con peroxidasa frente al anticuerpo anti-testosterona absorbido en la microplaca (fase sólida).

La separación libre-unido se obtiene mediante un simple lavado de la fase sólida.

La enzima presente en la fracción unida cataliza la reacción entre el sustrato (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y el sustrato TMB (TMB), desarrollando una coloración azul que cambia a amarillo tras la adición de la solución de parada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

La intensidad del color desarrollado es proporcional a la concentración de antígeno marcado y, por lo tanto, inversamente proporcional a la concentración de testosterona "libre" presente en la muestra.

### 3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

#### 3.1. Reactivos y materiales suministrados en el kit

1. Estándares (STD) de testosterona (5 frascos, 1 mL cada uno)

STD0	REF DCE002/2106-0
STD1	REF DCE002/2107-0
STD2	REF DCE002/2108-0
STD3	REF DCE002/2109-0
STD4	REF DCE002/2110-0

2. Tampón de incubación (1 frasco, 30 mL)

Tampón fosfato pH 7,5; BSA 1 g/L; Conservantes  
REF DCE001-0

3. Conjugado (1 frasco, 1 mL)

Testosterona conjugada con peroxidasa de rabano (HRP)  
REF DCE002/2102-0

4. Microplaca recubierta (1 microplaca rompible)  
IgG-anti-testosterona absorbido en la microplaca

REF DCE002/2103-0

5. Sustrato TMB (1 frasco, 15 mL)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-TMB (0,26 g/L) (evitar el contacto con la piel)  
REF DCE004-0

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

Ácido sulfúrico 0,15 mol/L (evitar el contacto con la piel)  
REF DCE005-0

#### 3.2. Reactivos necesarios no suministrados en el kit

Agua destilada.

#### 3.3. Material e instrumentación auxiliares

Dispensadores automáticos.

Lector de microplacas (450 nm).

Dispositivo para la obtención de saliva (*Saliva Collection Device*) **REF DKO063**

#### Nota

Conservar los reactivos a 2-8 °C, protegidos de la luz.

Abrir la bolsa del reactivo 4 (microplaca recubierta) solo cuando se encuentre a temperatura ambiente y cerrarla inmediatamente después de extraer las tiras que se vayan a utilizar; una vez abierta, permanece estable hasta la fecha de caducidad del kit.

No retirar las hojas adhesivas de las tiras que no se vayan a usar en la sesión de análisis.

#### 4. PRECAUCIONES

- Los reactivos contienen Proclin 300<sup>R</sup> como conservante.
- Evitar la exposición del reactivo TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a la luz directa del sol, metales u oxidantes.
- Observar la máxima precisión en la reconstitución y en la dispensación de los reactivos.
- No usar reactivos de distintos lotes.
- Este método permite determinar concentraciones de testosterona de 10 pg/mL a 1000 pg/mL.
- Para muestras con una concentración superior a 1000 pg/mL, diluir la muestra (1/1) con estándar 0.
- El suministro de esteroides naturales o sintéticos puede alterar los niveles salivales de testosterona.

#### 5. PROCEDIMIENTO

##### 5.1. Preparación de los estándares (S<sub>0</sub>...S<sub>4</sub>)

Antes del uso, dejar durante al menos 5 minutos en el agitador giratorio.

Los estándares tienen las siguientes concentraciones de testosterona:

	S <sub>0</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>
pg/mL	0	10	50	200	1000

Una vez abierto, las estándares son estables 6 meses a 2-8°C.

Para unidades del S.I.: pg/mL x 3,47 = pmol/l

##### 5.2. Preparación del conjugado diluido

Preparar inmediatamente antes del uso.

Diluir 10 µL de conjugado (reactivo 3) con 1 mL de tampón de incubación (reactivo 2).

Los volúmenes pueden variarse respetando esta proporción. Mezclar con cuidado durante al menos 5 minutos en el agitador giratorio. Estable durante 3 horas a temperatura ambiente (22-28°C).

##### 5.3. Preparación de la muestra

Para la obtención de la muestra se recomienda usar tubos de vidrio de centrifuga y una cánula de plástico, o el dispositivo para la obtención de saliva (*Saliva Collection Device*) de Diametra.

Se recomienda no usar dispositivos de obtención disponibles en el mercado, como "SALIVETTE". Los otros tipos de dispositivos de obtención disponibles en el mercado no se han comprobado.

##### 5.3.1. Método y limitaciones

Obtener las muestras de saliva en los tiempos indicados.

Si no se dan indicaciones específicas para la obtención de saliva, es posible obtener las muestras en cualquier momento, pero teniendo en cuenta los siguientes factores:

- a) Si la obtención de saliva debe realizarse por la mañana, deberá realizarse antes de lavarse los dientes.
- b) Durante el día, esperar al menos una hora tras haber comido o bebido antes de obtener las muestras de saliva.
- c) Es muy importante obtener una muestra limpia (no contaminada con comida, cosméticos, sangre, chicle u otros materiales extraños).

##### 5.3.2. Procesamiento de la saliva

Hacer fluir la saliva a través de la cánula hasta el tubo de vidrio.

- 1) Centrifugar la muestra durante 15 minutos a 3000 rpm
- 2) Dejar a -20 °C durante al menos 1 hora
- 3) A continuación, descongelar la muestra.
- 4) Centrifugar durante otros 15 minutos a 3000 rpm
- 5) La muestra de saliva está lista para el ensayo.
- 6) Conservar la muestra a 2-8 °C durante una semana o a -20 °C para períodos más largos.

#### 5.4. Procedimiento

Puesto que es necesario operar por duplicado, preparar dos pocillos para cada punto de la curva estándar (S<sub>0</sub>-S<sub>4</sub>), dos para cada muestra y uno para el blanco.

Reactivo	Estándar	Muestra	Blanco
Muestra		100 µL	
Estándares S <sub>0</sub> -S <sub>4</sub>	100 µL		
Conjugado diluido	100 µL	100 µL	
Incubar 1 h a +37°C. Retirar la mezcla de reacción, lavar los pocillos 2 veces añadiendo 0,3 mL de agua destilada.			
Substrato TMB	100 µL	100 µL	100 µL
Incubar 15 minutos a temperatura ambiente (22÷28°C), protegida de la luz.			
Solución de parada	100 µL	100 µL	100 µL
Agitar la microplaca con cuidado. Leer la absorbancia (E) a 450 nm frente al blanco.			

#### 6. CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe analizar controles para los rangos bajo, medio y alto de testosterona para supervisar el rendimiento del análisis. Estas muestras deben tratarse como desconocidas y los valores deben determinarse en cada ensayo realizado. Se

deben mantener los gráficos de control de calidad para seguir el rendimiento de los reactivos suministrados. Se deben emplear métodos estadísticos adecuados para determinar las tendencias. El laboratorio debe establecer los límites de aceptabilidad del rendimiento del análisis. Entre otros parámetros que se deben controlar, se incluyen las intersecciones de 80, 50 y 20% de la curva estándar para evaluar la reproducibilidad. Además, la capacidad de absorción máxima debe ser constante con la experiencia anterior. Una desviación significativa del rendimiento establecido puede indicar un cambio inadvertido en las condiciones experimentales o la degradación de los reactivos del kit. Se deben usar reactivos frescos para determinar la causa de las variaciones.

## 7. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

### 7.1. Rendimiento del análisis

No usar muestras contaminadas microbiológicamente, ni muestras muy lipémicas o hemolizadas. Es importante que el tiempo de reacción de cada pocillo sea el mismo para obtener resultados reproducibles. El tiempo de dispensación de los pocillos no debe ser superior a 10 minutos. Si dura más de 10 minutos, se recomienda seguir el orden de dispensación. Si se usa más de una microplaca, repetir la curva estándar para cada placa. La adición del sustrato TMB inicia una reacción cinética que se termina con la adición de la solución de parada. La adición del sustrato y de la solución de parada debe realizarse en la misma secuencia para evitar distintos tiempos de reacción. Los lectores de microplacas miden las DO verticalmente. No tocar el fondo de los pocillos. Si no se aspira completamente la solución de lavado de los pocillos se pueden producir repeticiones pobres y resultados falsos.

### 7.2. Interpretación de los resultados

Si para calcular los resultados se ha usado el ordenador, es imprescindible que los valores de los calibradores se encuentren dentro del 10 % de las concentraciones asignadas.

## 8. RESULTADOS

### 8.1. Absorbancia media

Calcular la absorbancia media ( $E_m$ ) de cada punto de la curva estándar ( $S_0 - S_4$ ) y de cada muestra.

### 8.2. Curva estándar

Trazar en el gráfico de las absorbancias los valores calculados de las absorbancias medias ( $E_m$ ) de cada estándar ( $S_0 - S_4$ ) en función de las concentraciones. Trazar la curva de ajuste óptimo para los puntos estándar (p. ej.: Logística de cuatro parámetros).

### 8.3. Cálculo de los resultados

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

## 9. VALORES DE REFERENCIA

Puesto que los valores de testosterona en la saliva tienen un ritmo circadiano, se recomienda obtener las muestras a la misma hora (8 a.m.):

Se deben usar los siguientes valores como guía preliminar hasta que cada laboratorio establezca su propio rango de normalidad.

		pg/mL
MUJERES:	normales	10 – 55
	Hirsutismo	25 – 85
	(después del tratamiento)	16 – 40
	PCO	20 – 50
NIÑOS:		35 – 160
HOMBRES:		50 - 210
	hipogonadismo	10 – 80 pg/mL

## 10. PARÁMETROS CARACTERÍSTICOS

### 10.1. Precisión

#### 10.1.1. Intraensayo

La variabilidad dentro del mismo kit se ha determinado replicando (16x) la medición de dos muestras de saliva de control distintas. La variabilidad intraensayo es  $\leq 8,0\%$ .

#### 10.1.2. Interensayo

La variabilidad entre distintos kits se ha determinado replicando (12x) la medición de tres muestras de saliva de control distintas con kits pertenecientes a lotes distintos. La variabilidad interensayo es  $\leq 13,2\%$ .

### 10.2. Exactitud

La prueba de recuperación realizada en dos muestras de saliva enriquecidas con 37,5 – 100 – 500 pg/mL de testosterona ha dado un valor medio ( $\pm SD$ ) de 98,97%  $\pm 10,92\%$ .

### 10.3. Sensibilidad

La concentración mínima de testosterona medible es 2,96 pg/mL con un límite de confianza del 95%.

### 10.4. Especificidad

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

Testosterona	100%
Dihidrotestosterona	16%
Androstenediona	0,8%
Androsterona	0%
DHEA-S	0%
Cortisol	0%
Cortisona	0%
17 $\alpha$ Estradiol	0%
Estrona	0%
Prednisona	0%

### 10.5. Correlación

El kit Testosterona saliva (Diametra) se ha comparado con un kit disponible en el mercado. Se han comprobado 32 muestras de saliva. La curva de regresión es:

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

$$r^2 = 0,967$$

y = Kit Elisa Testosterona Saliva Diametra

x = Kit Elisa Testosterona Saliva DRG

### 11. DISPOSICIONES PARA LA ELIMINACIÓN

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con las leyes locales.

---

### BIBLIOGRAFÍA

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. 03/2011**

**DCM021-7**

**DiaMetra S.r.l. Headquarter:** Via Garibaldi, 18 – 20090 SEGRATE (MI) Italy

Tel. 0039-02-2139184 – 02-26921595 – Fax 0039-02-2133354.










**Manufactory:** Via Giustozzi, 35/35a – Z.I Paciana – 06034 FOLIGNO (PG) Italy

Tel. 0039-0742-24851 Fax 0039-0742-316197

E-mail: [info@diametra.com](mailto:info@diametra.com)

	<b>DIA.METRA SRL</b>	
Mod. PIS	<b>PACKAGING INFORMATION SHEET</b>	

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

	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 Fabricante FR Fabriqué par GB Manufacturer IT Produttore PT Produzido por
<b>REF</b>	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 fabricación 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 del 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 Riesgo biológico FR Risque biologique GB Biological risk IT Rischio biologico PT Risco biológico
 	DE Gebrauchsanweisung beachten ES Consultar las instrucciones de uso FR Consulter le mode d'emploi GB Consult instructions for use IT Consultare le istruzioni per l'uso PT Consultar instruções para uso	<b>LOT</b>	DE Chargenbezeichnung ES Código del lote FR Numero de lot GB Batch code IT Codice del lotto PT Codigo do lote
 $\Sigma = xx$	DE Ausreichend für "h" Tests ES Contenido suficiente para "h" ensayos FR Contenu suffisant pour "h" tests GB Contains sufficient for "h" tests IT Contenuto sufficiente per "h" saggi PT Contém o suficiente para "h" testes	<b>Cont.</b>	DE Inhalt ES Contenido del kit FR Contenu du coffret GB Contents of kit IT Contenuto del kit PT Conteúdo do kit
 Max Min	DE Temperaturbereich ES Límites de temperatura FR Limites de température de conservation GB Temperature limitation IT Limiti di temperatura PT Temperaturas limites de conservação		

	<b>DIA.METRA SRL</b>	
Mod. PIS	<b>PACKAGING INFORMATION SHEET</b>	

## **SUGERENCIAS PARA LA SOLUCIÓN DE PROBLEMAS/TROUBLESHOOTING**

### **ERROR / POSIBLES CAUSAS / SUGERENCIAS**

#### **No se produce ninguna reacción colorimétrica del ensayo**

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

#### **Reacción escasa (DO demasiado bajas)**

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

#### **Reacción demasiado intensa (DO demasiado altas)**

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

#### **Valores inexplicablemente fuera de escala**

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

#### **CV% intraensayo elevado**

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

#### **CV% interensayo elevado**

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

## **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