



DCM021-11  
Ed. 12/2015

# 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. Controlli (2 flaconi, 1 mL ciascuno)

Control A	REF DCE045/2103A-0
Control B	REF DCE045/2103B-0

La concentrazione dei Controlli è indicata sul Certificato di Analisi

3. Incubation Buffer (1 flacone, 30 mL)

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

4. Conjugate (1 flacone, 1 mL)

Testosterone coniugato con perossidasi di rafano (HRP)  
REF DCE002/2102-0

5. Coated Microplate (1 micropiastra breakable)

Anticorpo anti Testosterone adsorbito sulla micropiastra  
REF DCE002/2103-0

6. TMB Substrate (1 flacone, 15 mL)

$H_2O_2$ -TMB (0,26 g/L) (evitare il contatto con la pelle)  
REF DCE004-0

7. Stop Solution (1 flacone, 15 mL)

Acido Solforico 0,15 mol/L (evitare il contatto con la pelle)  
REF DCE005-0

8. 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 2-8°C, al riparo dalla luce.

Aprire la busta del Reattivo 5 (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.
- Materiali di origine animale usati per la preparazione di questo kit sono stati ottenuti da animali sani e le proteine bovine sono state ottenute da paesi non affetti da BSE, ma comunque questi materiali dovrebbero essere usati come potenzialmente contagiosi.
- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di Proclin 300<sup>R</sup> 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/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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°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°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 (C<sub>0</sub>...C<sub>4</sub>)

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

Per campioni con concentrazioni maggiori di 1000 pg/mL diluire il campione (1:2) con C<sub>0</sub>.

Una volta aperti, i Calibratori sono stabili a 2-8°C per 6 mesi.

Per Unità SI: pg/mL x 3,47 = pmol/L

#### 6.2. Preparazione del Coniugato Diluito

Preparare al momento dell'uso.

Diluire 10 µL di Conjugate (reattivo 4) con 1 mL di Incubation Buffer (reattivo 3). 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°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 e dei controlli

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.

I Controlli sono pronti all'uso.

#### 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 essicante 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 (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagente	Calibratori	Campione/ Controlli	Bianco
Campione/ Controlli		100 µL	
Calibratori C <sub>0</sub> -C <sub>4</sub>	100 µL		
Diluted conjugate	100 µL	100 µL	
Incubare 1 h a +37°C. Allontanare la miscela di reazione. Lavare i pozzetti 3 volte con 300 µL di wash solution diluita. <b>Nota importante:</b> 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. <b>Lavaggi automatici:</b> se si utilizza un lavatore automatico, effettuare 6 lavaggi.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubare 15 minuti a temperatura ambiente (22÷28°C), al riparo dalla luce.			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
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.			

## 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 cicardiano 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 tre differenti campioni di saliva.

La variabilità intra-assay è 10,7%.

#### 10.1.2. Inter-Assay

La variabilità tra kit differenti è stata determinata replicando (12x) la misura di tre differenti campioni di saliva 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 250 - 500 pg/mL di Testosterone, ha dato un valore medio ( $\pm$ SD) di 103,41%  $\pm$  8,92%.

La prova di diluizione effettuata su 3 campioni diluiti fino a 8 volte ha dato un valore medio ( $\pm$ SD) di 96,63%  $\pm$  7,94%.

### 10.3. Sensibilità

La concentrazione minima di Testosterone misurabile che può essere distinta dal Calibratore 0 è 3,28 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%
Diidrotestosterone	2,03%
Androstenedione	0,01%
Androsterone	0,05%
DHEA-S	0,00%
Cortisolo	0,01%
Cortisone	0,00%
17b Estradiolo	0,16%
Prednisone	0,00%
Estrone	0,01%

### 10.5. Correlazione

Il nuovo kit Testosterone saliva ELISA Diametra è stato comparato con il precedente kit Testosterone ELISA Diametra. Sono stati testati 37 campioni di saliva (18 femmine e 19 maschi).

La curva di regressione è:

$$Y = 0,77 * X - 12,29$$

$$r^2 = 0,884$$

## 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. Widsdom G. B., Clin.Chem. 22/8, 1243-1255 (1976)

**Ed. 12/2015**

**DCM021-11**

**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](mailto:info@diametra.com)



DCM021-11  
Ed. 12/2015

# TESTOSTERONE SALIVA ELISA

for routine analysis

Direct immunoenzymatic determination of Testosterone in saliva.

IVD



LOT

See external label

2°C 8°C



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<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and the TMB Substrate and develops a blue color that changes into yellow when the Stop Solution (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 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. Control (2 vials, 1 mL each)

Control A	REF DCE045/2103A-0
Control B	REF DCE045/2103B-0

Controls Concentration is indicated on the Certificate of Analysis

#### 3. Incubation Buffer (1 vial, 30 mL)

Phosphate buffer pH 7.5, BSA 1 g/L  
REF DCE001-0

#### 4. Conjugate (1 vial, 1 mL)

Testosterone conjugated with Horseradish peroxidase (HRP)  
REF DCE002/2102-0

#### 5. Coated Microplate (1 breakable microplate)

Anti Testosterone antibody adsorbed on microplate  
REF DCE002/2103-0

#### 6. TMB Substrate (1 vial, 15 mL)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-TMB 0.26 g/L (avoid any skin contact)  
REF DCE004-0

#### 7. Stop Solution (1 vial, 15 mL)

Sulphuric acid 0.15 mol/L (avoid any skin contact)  
REF DCE005-0

#### 8. 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 208°C in the dark.

Open the bag of reagent 5 (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.
- Material of animal origin used in the preparation of the kit has been obtained from animals certified as healthy and the bovine protein has been obtained from countries not infected by BSE, but these materials should be handled as potentially infectious.
- Some reagents contain small amounts of Proclin 300<sup>R</sup> 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/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 syntetic 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 (C<sub>0</sub>...C<sub>4</sub>)

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

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

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

For samples with concentration higher than 1000 pg/mL dilute the sample 1:2 with C<sub>0</sub>.

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 4) to 1.0 mL of Incubation Buffer (reagent 3). 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 and Controls

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.

The Controls are ready to use.

##### 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 (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample/Controls	Blank
Sample/Controls		100 µL	
Calibrator C <sub>0</sub> -C <sub>4</sub>	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. <b>Important note:</b> 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. <b>Automatic washer:</b> 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 (Em) for each point of the calibration curve (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>) and of each sample.

### 8.2. Calibration curve

Plot the mean value of absorbance (Em) of the Calibrators (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>) 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 three different saliva samples in one assay. The within assay variability is 10.7%.

#### 10.1.2. Inter Assay Variation

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

### 10.2. Accuracy

The recovery of 250 - 500 pg/mL of Testosterone added to two saliva samples gave an average value ( $\pm$ SD) of 103.41%  $\pm$  8.92% with reference to the original concentrations.

The dilution test performed on 3 samples diluted up to 8 times gave an average value ( $\pm$ SD) of 99.63%  $\pm$  7.94%.

### 10.3. Sensitivity

The lowest detectable concentration of Testosterone that can be distinguished from the Calibrator 0 is 3.28 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	2.03%
Androstenedione	0.01%
Androsterone	0.05%
DHEA-S	0.00%
Cortisol	0.01%
Cortisone	0.00%
17b Estradiol	0.16%
Prednisone	0.00%
Estrone	0.01%

### 10.5. Correlation

The new Diametra Testosterone saliva ELISA kit was compared to the old Diametra Testosterone saliva ELISA kit.

37 saliva samples (18 females, 19 males) were analysed

The linear regression curve was calculated:

$$Y = 0.77 \cdot X - 12.29$$

$$r^2 = 0.884$$

## 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. 12/2015

DCM021-11

**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](mailto:info@diametra.com)



DCM021-11  
Ed. 12/2015

# TESTOSTERONE SALIVA ELISA

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 ELISA está destinado al uso en laboratorio exclusivamente.

## 1. SIGNIFICADO CLÍNICO

La testosterona (17 -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 de rabano (HRP) frente al anticuerpo anti-testosterona absorbido en la microplaca (fase sólida).

Después de la incubación, la separación libre-unido se obtiene mediante un simple lavado de la fase sólida.

Por último, la enzima HRP 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 inversamente proporcional a la concentración de testosterona "libre" presente en la muestra.

La concentración de Testosterona en la muestra se calcula según una curva de calibración.

## 3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

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

#### 1. Calibradores (5 frascos, 1 mL cada uno)

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. Control (2 frascos, 1 mL cada uno)

Control A	REF DCE045/2103A-0
Control B	REF DCE045/2103B-0

La concentración de los Controles se indica en la Hoja de Control (Certificate of Analysis)

#### 3. Tampón de incubación (1 frasco, 30 mL)

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

#### 4. Conjugado (1 frasco, 1 mL)

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

#### 5. Microplaca recubierta (1 microplaca rompible)

Anticuerpo anti Testosterona absorbido en la microplaca  
REF DCE002/2103-0

#### 6. 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

#### 7. Solución de parada (1 frasco, 15 mL)

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

8. Solución de lavado conc.10X (1 frasco, 50 mL)  
Tampón fosfato 0,2M pH 7.4 **REF** DCE054-0

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

Agua destilada.

### 3.3. Material e instrumentación auxiliares

Dispensadores automáticos.

Lector de microplacas (450 nm, 620-630 nm).

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

*Salivette Sarstedt*

**REF** DKO063

**REF** 51.1534.500

### Nota

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

*Abrir la bolsa del reactivo 5 (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.*

### 4. ADVERTENCIAS

- Este kit de ensayo está previsto para usarse in vitro y por personal experto. No es para uso interno o externo en humanos o animales.
- Usar los equipos de protección individual previstos al trabajar con los reactivos suministrados.
- Siga las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) en el manejo de las muestras sanguíneas y sus derivados.
- Materiales de origen animal utilizadas para la elaboración de este kit se obtuvieron a partir de animales sanos y de las proteínas de bovino se obtuvieron de los países no afectados por la EEB, pero estos materiales se debe utilizar como potencialmente infecciosos.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Proclín 300<sup>R</sup> como conservante. Evite el contacto con la piel y las mucosas.
- El cromógeno TMB contiene un irritante que puede ser dañino si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para prevenir lesiones, evitar la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y con los ojos.
- La Solución de Parada está formada por una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo, y puede ser tóxico si se ingiere. Para prevenir posibles quemaduras químicas, evitar el contacto con la piel y con los ojos.
- Evite la exposición de los reactivos TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.
- Este método permite determinar concentraciones de Testosterona de 10 pg/mL a 1000 pg/mL.
- El suministro de esteroides naturales o sintéticos puede alterar los niveles salivales de Testosterona.

### 5. PRECAUCIONES

- Respetar rigurosamente la secuencia de los pasos indicados en este protocolo. Los resultados aquí presentados se han obtenido utilizando los reactivos específicos que figuran en estas instrucciones de uso.
- Todos los reactivos deben conservarse a una temperatura controlada de 2-8°C en sus recipientes originales. Todas las excepciones están claramente marcadas. Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad cuando se almacenan y manipulan de acuerdo con las instrucciones proporcionadas.
- Antes del uso, esperar hasta que todos los componentes del kit y las muestras se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) y mezclar cuidadosamente.
- No mezclar componentes de kits de lotes distintos. Se debe observar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja y de todas las ampollas. No usar componentes después de la fecha de caducidad.
- Si utiliza un equipo automático, es responsabilidad del usuario asegurar que la metodología aplicada haya sido debidamente validada.
- Un lavado incompleto o impreciso y la aspiración insuficiente del líquido de los micropozos ELISA pueden causar una precisión pobre y/o un elevado fondo. Para mejorar el rendimiento del kit en los sistemas automatizados, se recomienda aumentar el número de lavados.
- Para la reproducibilidad de los resultados, es importante que el tiempo de reacción sea igual para cada pocillo. El tiempo de dispensación de los pocillos no debe superar los 10 minutos; si se prolongara más allá de los 10 minutos, respétese el orden de dispensación. Si utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva de calibración en cada placa.
- Al añadir el Sustrato TMB se inicia una reacción cinética que termina al agregar la Solución de Parada. Tanto el Sustrato TMB como la Solución de Parada deben agregarse en la misma secuencia para evitar diferentes tiempos de reacción.
- Observar las directrices para la ejecución del control de calidad en los laboratorios clínicos al comprobar controles y/o pool de saliva.
- Observar la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- Los lectores de microplacas leen las DO verticalmente, por tanto no debe tocarse el fondo de los pocillos.

## 6. PROCEDIMIENTO

### 6.1. Preparación de los Calibradores (C<sub>0</sub>...C<sub>4</sub>)

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

Los Calibradores son listo para usar y tienen las siguientes concentraciones de Testosterona:

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

Para muestras con una concentración superior a 1000 pg/mL, diluir la muestra (1:2) con el Calibrador 0.

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

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

### 6.2. Preparación del Conjugado diluido

Preparar inmediatamente antes del uso.

Diluir 10 µL de conjugado (reactivo 4) con 1 mL de tampón de incubación (reactivo 3). 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).

### 6.3. Preparación de la solución de lavado

Antes del uso, diluir el contenido del frasco de la "Solución de lavado conc. 10X" con agua destilada hasta un volumen de 500 mL. Para preparar volúmenes menores, respetar la relación de dilución de 1:10. La solución de lavado diluida se mantiene estable a 2÷8 °C durante al menos 30 días. En la solución de lavado concentrada es posible observar la presencia de cristales. En ese caso, agitar a temperatura ambiente hasta que los cristales se disuelvan por completo. Para una mayor precisión, diluir todo el frasco de la solución de lavado concentrada en 500 mL teniendo cuidado para transferir también los cristales y, a continuación, agitar hasta que se disuelvan por completo.

### 6.4. Preparación de la muestra y los Controles

La determinación de Testosterona en este kit debe ser realizada con una muestra de saliva.

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 o el dispositivo "Salivette" (Sarstedt, Ref. 511534500). Los otros tipos de dispositivos de obtención disponibles en el mercado no se han comprobado.

Los Controles están listos para usar.

#### 6.4.1. 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:

- Si la obtención de saliva debe realizarse por la mañana, deberá realizarse antes de lavarse los dientes.
- Durante el día para las siguientes condiciones, antes de tomar una muestra de saliva, esperar

por lo menos una hora si ha comido, si ha tomado medicamentos por vía oral o si se ha cepillado los dientes.

- Es muy importante obtener una muestra limpia (no contaminada con comida, cosméticos, sangre, chicle u otros materiales extraños).

#### 6.4.2. Procesamiento de la saliva con el equipo *Saliva Collection Device Diametra*

- Hacer fluir la saliva a través de la cánula hasta el tubo de vidrio.
- Centrifugar la muestra durante 15 minutos a 3000 rpm
- Dejar a -20°C durante al menos 1 hora
- Centrifugar durante otros 15 minutos a 3000 rpm
- La muestra de saliva está lista para el ensayo.
- Conservar la muestra a 2÷8°C durante una semana o a -20°C para períodos más largos.

#### 6.4.3. Extracción y manejo de la muestra con el equipo *Salivette Sarstedt*

- Retirar la torunda contenida en el apósito tubo.
- Introducir la torunda en la boca y mojarla con saliva durante 1 minuto
- Devolver la torunda en el tubo original y cerrar.
- Centrifugar el tubo a 1000g (RCF) durante 2 minutos.
- Destapar el tubo y recuperar la saliva ( se debería obtener por lo menos 1mL de saliva)

### 6.5. Procedimiento

- Esperar hasta que todos los reactivos se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C).** Al final del ensayo inmediatamente poner todos los reactivos a 2-8°C para evitar largos periodos a temperatura ambiente.
- Las tiras de pocillos no utilizados se deben guardar de inmediato en la bolsa desechable que contiene desecantes y almacenarse a 2-8°C.
- Para evitar la contaminación microbiana y/o química no regrese porciones de reactivos no usados en los viales originales.
- Para aumentar la precisión de los resultados de la prueba es necesario trabajar en duplicado: preparar dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>), dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

Reactivo	Calibrador	Muestra	Blanco
Muestra		100 µL	
Calibrador C <sub>0</sub> -C <sub>4</sub>	100 µL		
Conjugado diluido	100 µL	100 µL	
Incubar 1 h a +37°C. Retirar la mezcla de reacción. Lave los pozos 3 veces con 0,3 mL de solución de lavado diluida.			
<b>Nota importante:</b> agite suavemente la placa durante 5 segundos en cada paso del lavado. Después del último lavado asegúrese haber eliminado completamente la solución de lavado de los pozos, invierta la placa y golpéela repetidas veces contra una servilleta de papel absorbente.			
<b>Lavados automático:</b> si está utilizando una lavadora automática, hacer 6 lavados.			
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 una segunda lectura de referencia a 620-630 nm o frente al blanco entre 5 minutos.			

## 7. 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 de calibración 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.

## 8. RESULTADOS

### 8.1. Absorbancia media

Calcular la absorbancia media (Em) de cada punto de la curva de calibración (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>) y de cada muestra.

### 8.2. Curva de calibración

Trazar en el gráfico de las absorbancias los valores calculados de las absorbancias medias (Em) de cada Calibrador (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>) en función de las concentraciones. Trazar la curva de ajuste óptimo para los puntos de calibración (p. ej.: Logística de cuatro parámetros).

### 8.3. Cálculo de los resultados

Interpolarse 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
<b>MUJERES</b>	normales	10 – 55
	Hirsutismo	25 – 85
	(después del tratamiento)	16 – 40
	PCO	20 – 50
<b>NIÑOS</b>		35 – 160
<b>HOMBRES</b>		50 - 210
	hipogonadismo	10 – 80

Es importante señalar que la determinación de un rango de valores esperados en un método dado para una población "normal" depende de muchos factores, tales como la especificidad y sensibilidad del método en uso, y la población en estudio. Por lo tanto, cada laboratorio debe considerar el intervalo especificado por el fabricante como una guía general y producir su propio rango de valores calculados en base al estadístico obtenido por el laboratorio, donde reside la población local.

## 10. PARÁMETROS CARACTERÍSTICOS

### 10.1. Precisión

#### 10.1.1. Intraensayo

La variabilidad dentro del mismo kit se ha determinado replicando (16x) la medición de tres muestras de saliva de control distintas.

La variabilidad intraensayo es 10,7%.

#### 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 13,2%.

### 10.2. Exactitud

La prueba de recuperación realizada en dos muestras de saliva enriquecidas con 250 – 500 pg/mL de testosterona ha dado un valor medio ( $\pm$ SD) de 103,41%  $\pm$  8,92%.

La prueba de dilución conducta en tres muestras diluidas 8 veces dió una media ( $\pm$ SD) de 96,63%  $\pm$  7,94%.

### 10.3. Sensibilidad

La concentración mínima de Testosterona medible que puede distinguirse del Calibrador 0 es 3,28 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	2,03%
Androstenediona	0,01%
Androsterona	0,05%
DHEA-S	0,00%
Cortisol	0,01%
Cortisona	0,00%
17b Estradiol	0,16%
Prednisona	0,00%
Estrona	0,01%

### 10.5. Correlación

El kit Testosterone saliva ELISA Diametra se ha comparado con el kit Diametra Testosterone saliva ELISA del método anterior. Se analizaron 37 muestras de saliva (18 mujeres y 19 hombres).

La curva de regresión es la siguiente:

$$Y = 0,77 * X - 12,29$$

$$r^2 = 0,884$$

## 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. 12/2015

DCM021-11

**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](mailto:info@diametra.com)

	DE ES FR GB IT PT	In vitro Diagnostikum Producto sanitario para diagnóstico In vitro Dispositif medical de diagnostic in vitro In vitro Diagnostic Medical Device Dispositivo medico-diagnostico in vitro Dispositivos medicos de diagnostico in vitro		DE ES FR GB IT PT	Hergestellt von Elaborado por Fabriqué par Manufacturer Produttore Produzido por
	DE ES FR GB IT PT	Achtung, Begleitdokumente Precaución, consulte los documentos adjuntos Attention, veuillez consulter les documents d'accompagnement Caution, consult accompanying documents Attenzione, consultare la documentazione allegata Atenção, consultar os documentos de acompanhamento	 yyyy-mm	DE ES FR GB IT PT	Herstellungs datum Fecha de fabricacion Date de fabrication Date of manufacture Data di produzione Data de produção
 yyyy-mm-dd	DE ES FR GB IT PT	Verwendbar bis Establa hasta (usar antes de último día del mes) Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) Use by (last day of the month) Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) Utilizar (antes ultimo dia do mês)		DE ES FR GB IT PT	Biogefährdung Riesco biológico Risque biologique Biological risk Rischio biologico Risco biológico
	DE ES FR GB IT PT	Gebrauchsanweisung beachten Consultar las instrucciones Consulter le mode d'emploi Consult instructions for use Consultare le istruzioni per l'uso Consultar instruções para uso	<b>LOT</b>	DE ES FR GB IT PT	Chargenbezeichnung Codigo de lote Numero de lot Batch code Codice del lotto Codigo do lote
 $\Sigma = xx$	DE ES FR GB IT PT	Ausreichend für "n" Tests Contenido suficiente para "n" tests Contenu suffisant pour "n" tests Contains sufficient for "n" tests Contenuto sufficiente per "n" saggi Contém o suficiente para "n" testes	<b>CONT</b>	DE ES FR GB IT PT	Inhalt Contenido del estuche Contenu du coffret Contents of kit Contenuto del kit Conteúdo do kit
 Max Min	DE ES FR GB IT PT	Temperaturbereich Límitación de temperatura Limites de température de conservation Temperature limitation Limiti di temperatura Temperaturas limites de conservação	<b>REF</b>	DE ES FR GB IT PT	Bestellnummer Número de catálogo Références du catalogue Catalogue number Numero di Catalogo Número do catálogo
	DE ES FR GB IT PT	Vor direkter Sonneneinstrahlung schützen Mantener alejado de la luz solar Tenir à l'écart de la lumière du soleil Keep away from sunlight Tenere lontano dalla luce solare Mantenha longe da luz solar			

**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



**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

**ERREUR CAUSES POSSIBLES / SUGGESTIONS****Aucune réaction colorimétrique de l'essai**

- non distribution du conjugué
- contamination du conjugué et/ou du substrat
- erreurs dans l'exécution du dosage (par ex., distribution accidentelle des réactifs dans le mauvais ordre ou en provenance des mauvais flacons, etc.)

**Réaction trop faible (DO trop basse)**

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop court, température d'incubation trop basse

**Réaction trop intense (DO trop élevée)**

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop long, température d'incubation trop élevée
- mauvaise qualité de l'eau utilisée pour la solution de lavage (bas degré de déionisation)
- lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

**Valeurs inexplicablement hors plage**

- contamination des pipettes, embouts ou récipients - lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

**CV% intra-essai élevé**

- les réactifs et/ou les bandes n'ont pas atteint la température ambiante avant usage
- le laveur de microplaques ne lave pas correctement (suggestion : nettoyer la tête du laveur)

**CV% inter-essai élevé**

- conditions d'incubation non constantes (temps ou température)
- contrôles et échantillons non distribués en même temps (avec les mêmes intervalles) (contrôler l'ordre de distribution)
- variabilité intrinsèque des opérateurs