

Androstenedione

CE

Enzyme immunoassay for the quantitative determination of Androstenedione in human serum or plasma

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Androstenedion in humanem Serum oder Plasma

Dosage immunoenzymatique pour la détermination quantitative d'Androstènedione dans le sérum ou le plasma humain

Test immunoenzimatico per la determinazione quantitativa del Androstenedione nel siero o plasma umani

Immunoensayo enzimático para la determinación cuantitativa de Androstenediona en suero o plasma humano

Only for in-vitro diagnostic use

English	2
Deutsch	7
Français	13
Italiano	19
Español	25
Bibliography / Literatur / Bibliographié / Bibliografia / Bibliografia	34
Packaging materials/Verpackungsmaterialien/Matériels d'emballage/Materiali d'imballaggio/Materiales de embalaje.....	34
Symbols Key / Symbolschlüssel / Explication des symboles / Legenda / Símbolos	35
Summary of Test Procedure / Kurzanleitung Testdurchführung / Résumé de la procedure de test / Schema della procedura / Resumen de la técnica	36

ENGLISH

1. INTRODUCTION

Androstenedione (also known as 4-androstenedione) is a 19-carbon steroid hormone produced in the adrenal glands and the gonads as an intermediate step in the biochemical pathway that produces the androgen testosterone and the estrogens estrone and estradiol. It is the common precursor of male and female sex hormones. Some androstenedione is also secreted into the plasma, and may be converted in peripheral tissues to testosterone and estrogens.

Androstenedione has relatively weak androgenic activity, estimated at ~20% of testosterone. However, serum androstenedione levels often exceed testosterone in both normal and disease states. Secretion and production rates also exceed those of testosterone in women in whom significant extra-adrenal conversion of androstenedione to testosterone occurs.

In premenopausal women the adrenal glands and ovaries each produces about half of the total androstenedione (about 3 mg/day). After menopause androstenedione production is about halved, primarily due to the reduction of steroid secreted by the ovary. Nevertheless, androstenedione is the principal steroid produced by the postmenopausal ovary.

Measurement of serum androstenedione provides a useful marker of androgen biosynthesis. Elevated androstenedione levels have been demonstrated in virilizing congenital adrenal hyperplasia. Serum androstenedione levels are also increased in polycystic ovary syndrome, and in case of hirsutism in women. Elevated serum androstenedione levels may also occur in adrenal and ovarian virilizing tumors.

2. INTENDED USE

Competitive immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination of Androstenedione in human serum or plasma.

3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

Microtiterplates are coated with anti-Androstenedione antibodies (solid-phase). Androstenedione in the sample competes with added horseradish peroxidase labelled Androstenedione (enzyme-labelled antigen) for antibody binding. After incubation a bound/free separation is performed by solid-phase washing. The immune complex formed by enzyme-labelled antigen is visualized by adding Tetramethylbenzidine (TMB) substrate which gives a blue reaction product. The intensity of this product is **inversely** proportional to the amount of Androstenedione in the sample. Sulphuric acid is added to stop the reaction. This produces a yellow endpoint colour. Absorption at 450 nm is read using an ELISA Microtiterplate reader. Androstenedione concentration in the sample is calculated through a calibration curve.

4. MATERIALS

4.1. Reagents supplied

- **Microtiterplate:** 12 breakapart 8-well snap-off strips coated with anti-Androstenedione in resealable aluminium foil.
- **Stop Solution:** 1 bottle containing 15 mL sulphuric acid, < 5 % (w/v); (avoid any skin contact).
- **Conjugate:** 1 bottle containing 21 mL of horseradish peroxidase labelled Androstenedione.
- **TMB-Substrate Solution:** 1 bottle containing 15 mL 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (H_2O_2 -TMB 0.26 g/L) (avoid any skin contact).
- **Wash Solution 10x conc.:** 1 bottle containing 50 mL of a 10x concentrated solution (NaCl 160 g/L, Tween-20 10 g/L, 0.2 M phosphate buffer, pH 7.4)
- **Control:** 1 bottle containing 1 mL of a control solution, ready for use. The concentration is indicated on the label of the vial.
- **Standards:** 6 bottles, 1 mL each
 - Standard 0: 0 ng/mL
 - Standard 1: 0.1 ng/mL
 - Standard 2: 0.4 ng/mL
 - Standard 3: 1.2 ng/mL
 - Standard 4: 4.0 ng/mL
 - Standard 5: 10.0 ng/mL

4.2. Materials supplied

- 1 Cover foil
- 1 Instructions for use (IFU)

4.3. Materials and Equipment needed

- 37 °C Incubator
- ELISA Microtiterplate reader, equipped for the measurement of absorbance at 450 nm, 620 – 630 nm
- Manual or automatic equipment for rinsing Microtiterplates
- Pipettes
- rotation mixer
- Distilled water
- Disposable tubes
- Timer

5. STABILITY AND STORAGE

The reagents are stable up to the expiry date stated on the label when stored at 2...8 °C in the dark.

6. REAGENT PREPARATION

It is very important to bring all reagents, samples, control and standards to room temperature (22...28 °C) for at least 30 minutes before starting the test run! At the end of the assay, store immediately the reagents at 2...8°C; avoid long exposure to room temperature.

6.1. Microtiterplate

The ready to use break apart snap-off strips are coated with anti-Androstenedione antibodies. Open the bag only when it is at room temperature. *Immediately after removal of strips, the remaining strips should be resealed in the aluminium foil along with the desiccant supplied and stored at 2...8°C; stability until expiry date.*

6.2. Conjugate

Androstenedione-HRP Conjugate is a ready to use solution.

6.3. Standards

The standards are ready to use and have the following concentration:

Standard 0:	0 ng/mL
Standard 1:	0.1 ng/mL
Standard 2:	0.4 ng/mL
Standard 3:	1.2 ng/mL
Standard 4:	4.0 ng/mL
Standard 5:	10.0 ng/mL

Before using, leave the standards on a rotating mixer for at least 5 min. After first opening stable for another 6 months at 2...8 °C.

6.4. Control

Before use mix 5 min. with a rotating mixer. The bottle contains 1 mL of a lot-specific control solution, ready to use. The concentration is indicated on the label.

6.5. TMB Substrate Solution

The bottle contains 15 mL of a tetramethylbenzidine/hydrogen peroxide system. The reagent is ready to use and has to be stored at 2...8 °C in the dark. *The solution should be colourless or could have a slight blue tinge. If the substrate turns into blue, it may have become contaminated and should be thrown away.*

6.6. Stop Solution

The bottle contains 15 mL sulphuric acid solution (H314). This ready to use solution has to be stored at 2...8 °C.

6.7. Wash Solution

Dilute the concentrated wash solution concentrate 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. It is possible to observe the presence of crystals in the concentrated wash solution; in this case mix at room temperature until the crystals are completely dissolved; 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.

7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

The determination of Androstenedione can be performed in human plasma as well as in serum. Store the sample at -20 °C if the determination is not performed on the same day as sample collection. If samples are stored frozen, mix thawed samples well before testing. *Avoid repeated freezing and thawing.*
Dilute samples > 10 ng/mL 1:2 with standard 0.

7.1. Precaution

- Some reagents contain small amounts of Proclin 300® 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.
- Do not use heavily haemolysed or highly lipemic samples.
- Maximum precision is required for dispensation of the reagents.
- This method allows the determination of Androstenedione from 0.1 – 10.0 ng/mL.
- Avoid the exposure of TMB substrate to direct sunlight, metal or oxidants. Do not freeze the solution.
- Treatment of the patient with cortisone, natural or synthetic steroids can impair Androstenedione determination.

8. ASSAY PROCEDURE

8.1. Test Preparation

Please read the test instructions for use carefully **before** performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the instructions for use as described. Prior to commencing the assay, the distribution and identification plan for all specimens and standards should be carefully established. Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve. Please allocate at least:

1 well	(e.g. A1)	for the substrate blank
2 wells	(e.g. B1+C1)	for standard 0
2 wells	(e.g. D1+E1)	for standard 1
2 wells	(e.g. F1+G1)	for standard 2
2 wells	(e.g. H1+A2)	for standard 3
2 wells	(e.g. B2+C2)	for standard 4
2 wells	(e.g. D2+E2)	for standard 5
2 wells	(e.g. F2+G2)	for control

It is recommended to determine standards, control and patient samples in duplicate.

Perform all assay steps in the order given and without any appreciable delays between the steps.

A clean, disposable tip should be used for dispensing each standard and each patient sample.

1. Dispense 25 µL standards, control and samples into their respective wells.
2. Add 200 µL Conjugate to each well. Leave well A1 for substrate blank.
3. Cover wells with the foil supplied in the kit.
4. **Incubate for 1 hour at 37 °C.**
5. When incubation has been completed, remove the foil, aspirate the content of the wells and wash each well three times with 300 µL diluted wash solution. Avoid overflows from the reaction wells.

Important note: During each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel.

Automatic washer: In case you use automatic equipment, wash the wells at least 5 times.

Note: Washing is critical! Insufficient washing results in poor precision and falsely elevated absorbance values.

6. Dispense 100 µL TMB Substrate Solution into all wells.
7. **Incubate for exactly 15 min at room temperature (22...28°C) in the dark.**
8. Dispense 100 µL Stop Solution into all wells in the same order and at the same rate as for the TMB Substrate Solution. Shake the Microtiterplate gently.
Any blue colour developed during the incubation turns into yellow.
9. Measure the absorbance of the specimen at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against blank within 5 minutes.

8.2. Measurement

Adjust the ELISA Microtiterplate Reader **to zero** using the **substrate blank in well A1**.

If - due to technical reasons - the ELISA Microtiterplate reader cannot be adjusted to zero using the substrate blank in well A1, subtract the absorbance value of well A1 from all other absorbance values measured in order to obtain reliable results!

Measure the absorbance of all wells at **450 nm** and record the absorbance values for each standard and patient sample.

Bichromatic measurement using a reference wavelength of 620-630 nm is recommended.

Where applicable calculate the **mean absorbance values** of all duplicates.

9. RESULTS

9.1. Calculation of Results

Calculate the mean absorbance for each point of the standard curve and each sample. Plot the mean value of absorbance of the standards against concentration. Draw the best-fit curve through the plotted points (e.g., Four Parameter Logistic). Interpolate the values of the samples on the standard curve to obtain the corresponding values of the concentrations expressed in ng/mL.

9.2. Reference Values

The following values for serum or plasma Androstenedione should be considered as a guideline:

Men		0.60 – 2.7 ng/mL
Women	follicular phase	0.75 – 3.1 ng/mL
	luteinic phase	0.94 – 3.2 ng/mL

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. QUALITY CONTROL

Each laboratory should assay controls at normal, high and low levels range of Androstenedione 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 standard 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.

11. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1. Precision

Intra Assay Variation

Within run variation was determined by replicate determination (20x) of three different control sera in one assay. The within assay variability is $\leq 10.0\%$.

Inter Assay Variation

Between run variation was determined by replicate measurements (10x) of three different control sera in different lots. The between assay variability is $\leq 9.5\%$.

11.2. Specificity

The cross reaction of the antibody calculated at 50% according to Abraham is:

Androstenedione	100 %
5 α -dihydrotestosterone	0.05 %
DHEA	0.05 %
Epitestosterone	0.04 %
DHEA-S	0.027 %
Cortisol	0.008 %
Progesterone	0.007 %
Estrone	0.007 %
Testosterone	< 0.001 %
17B-Estradiol	< 0.001 %
Estriol	< 0.001 %
Aldosterone	< 0.001 %

11.3. Sensitivity

The lowest detectable concentration of Androstenedione that can be distinguished from the zero standard is 0.01 ng/mL at the 95 % confidence limit.

11.4. Accuracy

The recovery of 0.4 – 0.8 – 1.6 – 3.2 ng/mL Androstenedione added to a sample gave an average value ($\pm$ SD) of 100.91 % $\pm$ 5.61 % with reference to the original concentrations. The dilution test performed on three sera diluted 2 – 4 – 8 – 16 times gave an average value ($\pm$ SD) of 107.18 % $\pm$ 3.03.

11.5. Correlation with RIA

The Androstenedione ELISA was compared to a commercially available chemiluminescent method. 60 serum samples were analysed accordingly in both test systems.

The linear regression curve was calculated:

$$Y = 0,92 \cdot X - 0,02$$

$$r = 0,84$$

12. PRECAUTIONS AND WARNINGS

- The test procedure, the information, the precautions and warnings in the instructions for use have to be strictly followed. The use of the test kits with analyzers and similar equipment has to be validated. Any change in design, composition and test procedure as well as for any use in combination with other products not approved by the manufacturer is not authorized; the user himself is responsible for such changes. The manufacturer is not liable for false results and incidents for these reasons. The manufacturer is not liable for any results by visual analysis of the patient samples.
- Only for in-vitro diagnostic use by professional persons. Not for internal or external use in humans or animals.
- All components of human origin used for the production of these reagents have been tested for anti-HIV antibodies, anti-HCV antibodies and HBsAg and have been found to be non-reactive. Nevertheless, all materials should still be regarded and handled as potentially infectious.
- Do not interchange reagents or Microtiterplates of different production lots.
- No reagents of other manufacturers should be used along with reagents of this test kit.
- Do not use reagents after expiry date stated on the label.
- Use only clean pipette tips, dispensers, and lab ware.
- Do not interchange screw caps of reagent vials to avoid cross-contamination.
- Close reagent vials tightly immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- After first opening and subsequent storage check conjugate and control vials for microbial contamination prior to further use.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense conjugate without splashing accurately to the bottom of wells.
- The incomplete or inaccurate removal of liquid 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.
- For reproducible results it is important that the time of reaction in each well is held constant. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than ten 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.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood reagents.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.
- The ELISA is only designed for qualified personnel following the standards of good laboratory practice (GLP).

12.1. Disposal Considerations

Residues of chemicals and preparations are generally considered as hazardous waste. The disposal of this kind of waste is regulated through national and regional laws and regulations. Contact your local authorities or waste management companies which will give advice on how to dispose hazardous waste.

For information about the packaging materials refer to PACKAGING MATERIALS.

13. ORDERING INFORMATION

REF	DNOV008	Androstenedione	(96 Determinations)
-----	---------	-----------------	---------------------

DEUTSCH

1. EINLEITUNG

Androstendion (auch bekannt als 4-Androstendion) ist ein C19 Steroidhormon, das in den Nebennieren und den Gonaden produziert wird als ein intermediärer Schritt in der biochemischen Synthese, die das Androgen Testosteron sowie die Estrogene Estrone und Estradiol synthetisiert. Es ist eine allgemeine Vorstufe der männlichen und weiblichen Sexualhormone. Ein Teil des Androstendions wird auch in das Plasma sekretiert und kann in peripheren Geweben zu Testosteron und Estrogenen umgewandelt werden.

Androstendion hat eine geringe androgene Aktivität (ca. 20% der Aktivität von Testosteron). Nichts destotrotz übersteigen die Serumkonzentrationen von Androstendion oftmals die von Testosteron sowohl in gesunden als auch im Krankheitsstatus.

Auch bei Frauen, bei denen signifikante extra-adrenale Konversionen von Androstendion zu Testosteron stattfinden, übersteigt die Sekretions- und Produktionsrate die von Testosteron. In pre-menopausalen Frauen produzieren die Nebennieren und die Eierstöcke jeweils die Hälfte des gesamten Androstendions (ca. 3 mg/Tag). Nach der Menopause ist die Androstendionproduktion etwa halbiert, hauptsächlich durch die Steroidsekretion der Eierstöcke. Dennoch ist Androstendion das Hauptsteroid, das von den post-menopausalen Eierstöcken produziert wird.

Die Bestimmung von Androstendion im Serum ist ein nützlicher Marker für die Androgenbiosynthese. Erhöhte Androstendionwerte wurden bei virilisierender kongenitaler Nebennierenrindenhypertrophie nachgewiesen. Serum-Androstendion-Spiegel sind ebenfalls erhöht beim polycystischen Ovarsyndrom und in Fällen von Hirsutismus bei Frauen. Erhöhte Serum-Androstendion-Spiegel können auch in Verbindung mit adrenalen und ovariellen virilisierenden Tumoren auftreten.

2. VERWENDUNGSZWECK

Kompetitive immunoenzymatische kolorimetrische Methode für die quantitative Bestimmung von Androstendion in humanem Serum oder Plasma.

3. TESTPRINZIP

Die Mikrotiterplatte ist mit Antikörpern gegen Androstendion beschichtet. Androstendion in der Probe konkurriert mit dem zugegebenen, Peroxidase-markierten Androstendion (Enzym-markiertes Antigen) um die Bindung an den Antikörpern auf der Mikrotiterplatte. Ungebundene Substanzen werden bei dem anschließenden Waschschritt entfernt. Die von dem Enzym-markierten Antigen gebildeten Immunkomplexe werden durch die Zugabe von Tetramethylbenzidin (TMB) Substrat, welches ein blaues Reaktionsprodukt bildet, sichtbar gemacht. Die Intensität dieses Produktes ist invers proportional zur Androstendionkonzentration in der Probe. Die Zugabe von Schwefelsäure (Stopplösung) beendet die Enzymreaktion und färbt das Reaktionsprodukt gelb. Die Absorption wird bei 450/620 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer gemessen. Die Androstendionkonzentration in der Probe wird anhand einer Kalibrierungskurve berechnet.

4. MATERIAL

4.1. Mitgelieferte Reagenzien

- **Mikrotiterplatte:** 12 teilbare 8er-Streifen, beschichtet mit Antikörpern gegen Androstendion; in Aluminiumbeutel.
- **Stopplösung:** 1 Flasche mit 15 mL Schwefelsäure, < 5 % (w/v); (Hautkontakt vermeiden).
- **Konjugat:** 1 Flasche mit 21 mL HRP markiertem Androstendion.
- **TMB-Substratlösung:** 1 Flasche mit 15 mL 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (H_2O_2 -TMB 0.26 g/L) (Hautkontakt vermeiden).
- **Kontrolle:** 1 Flasche mit 1 mL Kontrolllösung. Die Konzentration ist auf dem Flaschenetikett angegeben.
- **Waschlösung 10x konz.:** 1 Flasche mit 50 mL 10x konzentrierter Waschlösung (NaCl 160 g/l, Tween-20 10 g/l, 0.2 M Phosphatpuffer, pH 7.4)
- **Standards:** 6 Flaschen mit je 1 mL Standardlösung:

Standard 0:	0 ng/mL
Standard 1:	0.1 ng/mL
Standard 2:	0.4 ng/mL
Standard 3:	1.2 ng/mL
Standard 4:	4.0 ng/mL
Standard 5:	10.0 ng/mL

4.2. Mitgeliefertes Zubehör

- 1 selbstklebende Abdeckfolie
- 1 Gebrauchsanweisung

4.3. Erforderliche Materialien und Geräte

- 37°C Inkubator
- Mikrotiterplatten-Photometer mit Filtern 450 nm, 620 - 630 nm
- Manuelle oder automatische Wascheinrichtung für Mikrotiterplatten
- Mikropipetten mit Einmalspitzen
- Rotationsmischer
- Aqua dest.
- Einmalröhrchen
- Timer

5. STABILITÄT UND LAGERUNG

Die original verschlossenen Reagenzien sind bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfalldatum haltbar, wenn sie bei 2...8 °C im Dunkeln gelagert werden.

6. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Alle Reagenzien, Proben, Kontrolle und Standards sind vor ihrer Verwendung für mindestens 30 Minuten auf Raumtemperatur (22...28 °C) zu bringen! Nach Ende der Messung sind die Reagenzien unverzüglich wieder bei 2...8° C zu lagern. Längeres Aufbewahren bei Raumtemperatur ist zu vermeiden.

6.1. Mikrotiterplatte

Die abbrechbaren Streifen sind mit Antikörpern gegen Androstendion beschichtet. Den Aluminiumbeutel nur öffnen, wenn er Raumtemperatur hat. *Nichtverbrauchte Vertiefungen im Aluminiumbeutel zusammen mit dem Trockenmittel sofort wieder verschließen und bei 2...8 °C lagern.*

6.2. Konjugat

Das Konjugat ist gebrauchsfertig.

6.3. Standards

Die Standards sind gebrauchsfertig und haben die folgenden Konzentrationen:

Standard 0:	0 ng/mL
Standard 1:	0,1 ng/mL
Standard 2:	0,4 ng/mL
Standard 3:	1,2 ng/mL
Standard 4:	4,0 ng/mL
Standard 5:	10,0 ng/mL

Vor der Benutzung sollten die Standards mindestens 5 min auf einem Rotationsmischer gemischt werden. Nach dem ersten Öffnen sind sie für weitere 6 Monate bei 2...8 °C haltbar.

6.4. Kontrolle

Vor Gebrauch 5 Min. mit einem Rotationsmischer mischen. Die Flasche enthält 1 mL einer chargenspezifischen, gebrauchsfertigen Kontrolllösung. Die Konzentration ist auf dem Etikett angegeben.

6.5. TMB-Substratlösung

Das Fläschchen enthält 15 mL eines Tetramethylbenzidin/Wasserstoffperoxidgemisches. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8°C vor Licht geschützt aufzubewahren. *Die Lösung ist farblos, kann aber auch leicht hellblau sein. Sollte die TMB-Substratlösung dunkelblau sein, ist sie kontaminiert und kann nicht im Test verwendet werden.*

6.6. Stopplösung

Das Fläschchen enthält 15 mL Schwefelsäure (H314). Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8 °C zu lagern.

6.7. Waschlösung

Die konzentrierte Waschlösung mit destilliertem Wasser auf 500 mL verdünnen. Bei kleineren Volumen ist das 1:10 Verhältnis zu beachten. Die verdünnte Waschlösung ist bei 2...8°C 30 Tage haltbar. In der konzentrierten Lösung können sich Kristalle bilden. In diesem Fall sollte die Lösung so lange bei Raumtemperatur gemischt werden, bis alle Kristalle gelöst sind. Für eine optimale Genauigkeit sollte die gesamte Menge der konzentrierten Lösung verdünnt werden, wobei darauf zu achten ist, dass die Kristalle vollständig überführt werden. Anschließend mischen, bis die Kristalle vollständig aufgelöst sind.

7. ENTNAHME UND VORBEREITUNG DER PROBEN

Die Bestimmung von Androstendion kann mit humanem Serum oder Plasma durchgeführt werden. Wenn die Bestimmung nicht am Tag der Probenentnahme erfolgen kann, muss die Probe bei -20°C gelagert werden. Gefrorene Proben müssen nach dem Auftauen gut gemischt werden. *Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden.* Proben mit einer Androstendionkonzentration > 10 ng/mL sollten mit Standard 0 1:2 verdünnt werden.

7.1. Vorsichtsmaßnahmen

- Einige Reagenzien enthalten geringe Mengen an Proclin 300® als Konservierungsmittel. Der Kontakt mit Haut und Schleimhäuten ist zu vermeiden.
- Das TMB-Substrat enthält einen Reizstoff, der schädlich sein kann beim Inhalieren, Verschlucken oder Hautkontakt. Zur Vermeidung von Verletzungen sollte die Inhalation, das Verschlucken sowie Haut- und Augenkontakt vermieden werden.
- Die Stopplösung besteht aus einer verdünnten Schwefelsäurelösung. Schwefelsäure ist giftig und ätzend und kann bei Verschlucken giftig sein. Um mögliche Verätzungen zu vermeiden, Kontakt mit Haut und Augen vermeiden.
- Keine stark hämolytischen oder lipämischen Proben verwenden.
- Das Pipettieren der Reagenzien erfordert maximale Präzision.
- Diese Methode erlaubt die Bestimmung von Androstendion von 0.1 – 10.0 ng/mL.
- TMB-Substrat keinem direkten Sonnenlicht, Metall oder Oxidantien aussetzen. Das Substrat nicht einfrieren.
- Die Behandlung mit Kortison, natürlichen oder synthetischen Steroiden kann die Androstendionbestimmung stören.

8. TESTDURCHFÜHRUNG

8.1. Testvorbereitung

Gebrauchsanweisung **vor** Durchführung des Tests sorgfältig lesen. Für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse ist es notwendig, die Gebrauchsanweisung genau zu befolgen. Die folgende Testdurchführung ist für die manuelle Methode validiert. Vor Testbeginn die Verteilung bzw. Position der Patientenproben und Standards auf den Mikrotiterstreifen genau festlegen. Die benötigte Anzahl von Mikrotiterstreifen (Kavitäten) in den Streifenhalter einsetzen. Das Pipettieren der Proben sollte maximal 10 Minuten dauern, um einen Drift innerhalb des Testes zu vermeiden. Wenn mehr als eine Mikrotiterplatte gemessen wird, wird empfohlen für jede Platte eine Standardkurve zu erstellen.

1 Vertiefung	(z.B. A1)	Blank
2 Vertiefungen	(z.B. B1+C1)	für Standard 0
2 Vertiefungen	(z.B. D1+E1)	für Standard 1
2 Vertiefungen	(z.B. F1+G1)	für Standard 2
2 Vertiefungen	(z.B. H1+A2)	für Standard 3
2 Vertiefungen	(z.B. B2+C2)	für Standard 4
2 Vertiefungen	(z.B. D2+E2)	für Standard 5
2 Vertiefungen	(z.B. F2+G2)	Kontrolle

Es wird empfohlen, Standards, Kontroll- und Patientenproben in Doppelbestimmung zu analysieren.

Den Test in der angegebenen Reihenfolge und ohne Verzögerung durchführen.

Für jeden Pipettierschritt der Kontrollen und Proben saubere Einmalspitzen verwenden.

1. Pipettiere 25 µL Standards, Kontrolle und Proben in die entsprechenden Vertiefungen.
2. Gebe 200 µL Konjugat in jede Vertiefung. Vertiefung A1 ist für den Substratleerwert vorgesehen.
3. Die Streifen mit der mitgelieferten Abdeckfolie bedecken.
4. **Inkubiere für 1 h bei 37 °C.**
5. Nach der Inkubation die Abdeckfolie entfernen, den Inhalt der Vertiefungen absaugen und jede Vertiefung dreimal mit 300 µL verdünnter Waschlösung waschen. Überfließen von Flüssigkeit aus den Vertiefungen vermeiden.

Wichtiger Hinweis: Bei jedem Waschschrift die Platte 5 Sekunden lang vorsichtig schütteln und überschüssige Lösung durch Klopfen der umgedrehten Platte auf ein saugfähiges Papiertuch entfernen.

Automatisches Waschen: Bei maschineller Abarbeitung jede Vertiefung mindestens fünfmal waschen.

Beachte: Der Waschvorgang ist wichtig, da unzureichendes Waschen zu schlechter Präzision und falsch erhöhten Messergebnissen führt!

6. 100 µL TMB-Substratlösung in alle Vertiefungen pipettieren.
7. **Inkubiere für genau 15 min bei Raumtemperatur (22...28°C) im Dunkeln.**
8. In alle Vertiefungen 100 µL Stopplösung in der gleichen Reihenfolge und mit den gleichen Zeitintervallen wie bei der TMB-Substratlösung Zugabe pipettieren. Die Mikrotiterplatte leicht schütteln.
Während der Inkubation gebildete blaue Farbe schlägt in gelb um.
9. Die Extinktion der Lösung in jeder Vertiefung bei 450 nm gegen eine Referenzlängenwelle von 620-630 nm oder gegen Blank innerhalb von 5 Minuten messen.

8.2. Messung

Mit Hilfe des Substratleerwertes (Blank) in **A1** den **Nullabgleich** des Mikrotiterplatten-Photometers (ELISA-Readers) vornehmen.

Falls diese Eichung aus technischen Gründen nicht möglich ist, muss nach der Messung der Extinktionswert der Position A1 von allen anderen Extinktionswerten abgezogen werden, um einwandfreie Ergebnisse zu erzielen!

Extinktion aller Kavitäten bei **450 nm** messen und die Messwerte der Kontrollen und Proben notieren.

Eine **bichromatische** Messung mit der Referenzwellenlänge 620-630 nm wird empfohlen.

Falls Doppel- oder Mehrfachbestimmungen durchgeführt wurden, den **Mittelwert der Extinktionswerte** berechnen.

9. ERGEBNISSE

9.1. Berechnung der Ergebnisse

Berechne den Mittelwert der Absorption jedes Punktes der Standardkurve und jeder Probe. Trage die Mittelwerte der Absorption gegen die Konzentration der Standards auf. Zeichne die am besten passende Kurve durch die Punkte (z.B. 4 Parameter Fit).

Interpoliere die Werte der Proben anhand der Standardkurve, um die zugehörige Konzentration in ng/mL zu erhalten.

9.2. Referenzwerte

Die folgenden Werte für Serum und Plasma Androstendion sollten als Richtwert angesehen werden:

Männer		0,60 – 2,7 ng/mL
Frauen	Follicularphase	0,75 – 3,1 ng/mL
	luteinische Phase	0,94 – 3,2 ng/mL

Es ist zu beachten, dass die Bestimmung von Referenzwerten für eine „normale“ Population mit einer bestimmten Methode von verschiedenen Faktoren abhängt wie z.B. Sensitivität und Spezifität der verwendeten Methode und Art und Zusammensetzung der untersuchten Population. Daher sollte jedes Labor die vom Hersteller angegebenen Werte nur als generellen Hinweis ansehen und seine eigenen zu erwartenden Werte anhand der einheimischen Bevölkerung ermitteln.

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Jedes Labor sollte Kontrollen im normalen, hohen und niedrigen Bereich für Androstendion messen, um die Leistungsfähigkeit des Testes zu überprüfen. Diese Kontrollen sollten wie unbekannte Proben behandelt und bei jedem Testlauf mitbestimmt werden. Qualitätskontrollaufzeichnungen sollten geführt werden, um die Performance der gelieferten Reagenzien zu überwachen. Um Trends erkennen zu können, sollten angemessene statistische Methoden etabliert werden. Jedes Labor sollte Annahmekriterien für die Testperformance aufstellen. Andere Parameter, die überwacht werden sollten, schließen den 80, 50 und 20% Abschnitt der Standardkurve für die Interassay Reproduzierbarkeit ein. Zusätzlich sollte die maximale Absorption mit früheren Messungen konsistent sein. Signifikante Abweichungen von der etablierten Leistungsfähigkeit können ein Indikator sein für unbemerkte Veränderungen der experimentellen Bedingungen oder Instabilität von Kitreagenzien. Um die Ursache der Abweichung zu ermitteln, sollten frische Reagenzien verwendet werden.

11. TESTMERKMALE

11.1. Präzision

Intraassay-Varianz

Die Variation innerhalb eines Testlaufs wurde ermittelt durch die wiederholte Bestimmung (20x) von drei verschiedenen Kontrollseren in einem Test. Die Intraassay-Varianz beträgt $\leq 10.0\%$.

Interassay-Varianz

Die Variation zwischen verschiedenen Testläufen (10x) wurde ermittelt durch die wiederholte Bestimmung von drei verschiedenen Kontrollseren in zwei verschiedenen Lots. Die Interassay-Varianz beträgt $\leq 9.5\%$.

11.2. Spezifität

Die Kreuzreaktion der Antikörper bei 50% berechnet nach Abraham ist:

Androstendion	100 %
5 α -Dihydrotestosteron	0,05 %
DHEA	0,05 %
Epitestosteron	0,04 %
DHEA-S	0,027 %
Cortisol	0,008 %
Progesteron	0,007 %
Estron	0,007 %
Testosteron	< 0,001 %
17B-Estradiol	< 0,001 %
Estriol	< 0,001 %
Aldosteron	< 0,001 %

11.3. Sensitivität

Die niedrigste nachweisbare Konzentration an Androstendion, die vom Standard 0 unterschieden werden kann ist 0,01 ng/mL bei einem 95 % Konfidenzintervall.

11.4. Genauigkeit

0,4 – 0,8 – 1,6 – 3,2 ng/mL Androstendion wurden zu einer Probe zugegeben. Die Wiederfindung lag bei durchschnittlich ($\pm$ SD) bei 100,91 % $\pm$ 5,61 % in Bezug auf die Originalkonzentrationen.

Der an drei Seren durchgeführte Verdünnungstest (2 – 4 – 8 – 16-fache Verdünnung) ergab einen durchschnittlichen Wert ($\pm$ SD) von 107,18% $\pm$ 3,03%.

11.5. Korrelation mit RIA

Der Androstenedione ELISA wurde mit einem kommerziell erhältlichen Chemolumineszenz-Testkit verglichen. 60 Serumproben wurden in beiden Testsystemen gemessen.

Die lineare Regressionskurve wurde berechnet:

$$Y = 0,92 \cdot X - 0,02$$

$$r = 0,84$$

12. SICHERHEITSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

- Die Testdurchführung, die Information, die Sicherheitsmaßnahmen und Warnhinweise in der Gebrauchsanweisung strikt zu befolgen. Bei Anwendung des Testkits auf Diagnostika-Geräten ist die Testmethode zu validieren. Jede Änderung am Aussehen, der Zusammensetzung und der Testdurchführung sowie jede Verwendung in Kombination mit anderen Produkten, die der Hersteller nicht autorisiert hat, ist nicht zulässig; der Anwender ist für solche Änderungen selbst verantwortlich. Der Hersteller haftet für falsche Ergebnisse und Vorkommnisse aus solchen Gründen nicht. Auch für falsche Ergebnisse aufgrund von visueller Auswertung wird keine Haftung übernommen.
- Nur für in-vitro-Diagnostik durch Fachpersonal, welches die Arbeitstechniken einwandfrei beherrscht.
- Alle verwendeten Bestandteile menschlichen Ursprungs sind auf Anti-HIV-AK, Anti-HCV-AK und HBsAG nicht-reaktiv getestet. Dennoch sind alle Materialien als potentiell infektiös anzusehen und entsprechend zu behandeln.
- Reagenzien unterschiedlicher Chargen nicht untereinander austauschen.
- Keine Reagenzien anderer Hersteller zusammen mit den Reagenzien dieses Testkits verwenden.
- Nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden.
- Nur saubere Pipettenspitzen, Dispenser und Labormaterialien verwenden.
- Die Deckel der Fläschchen nicht vertauschen, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.
- Verschlusskappen der einzelnen Reagenzien nicht untereinander vertauschen.
- Flaschen sofort nach Gebrauch fest verschließen, um Verdunstung und mikrobielle Kontamination zu vermeiden.
- Nach dem ersten Öffnen Konjugat- und Standardfläschchen vor weiterem Gebrauch auf mikrobielle Kontamination prüfen.
- Zur Vermeidung von Kreuzkontamination und falsch erhöhten Resultaten Patientenproben und Konjugat sorgfältig in die Kavitäten pipettieren.
- Der ELISA ist nur für die Anwendung durch Fachpersonal vorgesehen, welches die Arbeitstechniken einwandfrei beherrscht.
- Das unvollständige Entfernen von Flüssigkeiten aus den Vertiefungen der Mikrotiterplatte kann die Präzision beeinflussen und/ oder den Hintergrund verstärken.
Um die Präzision zu verbessern, wird empfohlen, die Anzahl der Waschschrte bei maschineller Abarbeitung zu erhöhen.
- Es ist für die Reproduzierbarkeit des Testes wichtig, dass die Reaktionszeit in jeder Vertiefung konstant gehalten wird. Das Pipettieren der Proben sollte 10 min nicht übersteigen, um einen Drift zu vermeiden. Falls mehr als 10 Minuten benötigt werden, sollte bei jedem Schritt die gleiche Reihenfolge beim Pipettieren eingehalten werden. Wenn mehr als eine Platte gemessen wird, wird empfohlen auf jeder Platte die Standardkurve mitzuführen.

- Die Zugabe der Substratlösung startet die kinetische Reaktion, die durch die Zugabe der Stopplösung beendet wird. Es ist daher wichtig, dass die Zugabe der beiden Lösungen in der gleichen Reihenfolge erfolgt, um zeitliche Differenzen zu vermeiden.
- Mikrotiterplattenphotometer messen vertikal. Daher sollte der Boden der Platte nicht berührt werden.
- Der ELISA ist nur für qualifiziertes Personal bestimmt, das den Standards der Guten Laborpraxis (GLP) folgt.

12.1. Entsorgungshinweise

Rückstände von Chemikalien und Zubereitungen werden im Allgemeinen als gefährliche Abfälle betrachtet. Die Entsorgung dieser Art von Abfällen wird durch nationale und regionale Gesetze und Vorschriften geregelt. Wenden Sie sich an Ihre örtlichen Behörden oder an Abfallentsorgungsunternehmen, die Sie über die Entsorgung von Sondermüll beraten.

Informationen zu den Verpackungsmaterialien finden Sie unter VERPACKUNGSMATERIALIEN.

13. BESTELLINFORMATION

REF

DNOV008

Androstenedione

(96 Bestimmungen)

FRANÇAIS

1. INTRODUCTION

L'Androstenedione (également connue sous le nom de 4- androsténédione) est une hormone stéroïde à 19 carbones produite dans les glandes surrénales et dans les gonades comme étape intermédiaire de la voie biochimique qui produit l'androgène qu'est la testostérone et les œstrogènes que sont la folliculine et l'estradiol. Il s'agit du précurseur commun aux hormones sexuelles masculines et féminines. Une certaine quantité d'androstenedione est également sécrétée dans le plasma, et peut être convertie dans les tissus périphériques en testostérone et en œstrogènes. L'androstenedione a une activité androgène relativement faible, que l'on estime compter pour ~20% de la testostérone. Les taux sériques d'androstenedione excèdent cependant souvent ceux de la testostérone, à l'état normal comme en présence d'une pathologie. Les taux de sécrétion et de production dépassent également ceux de la testostérone chez les femmes pour lesquelles il se produit une conversion extra-surrénale significative d'androstenedione en testostérone. Chez les femmes non encore ménopausées, les glandes surrénales et les ovaires produisent chacun environ la moitié de la quantité totale d'androstenedione (à peu près 3 mg/jour). Après la ménopause, la production d'androstenedione est réduite de moitié environ, principalement en raison de la diminution des stéroïdes sécrétés par les ovaires. Néanmoins, l'androstenedione est le principal stéroïde produit par les ovaires ménopausés. L'essai de l'androstenedione sérique constitue un marqueur utile de la biosynthèse des androgènes. Il a été démontré l'existence de taux élevés d'androstenedione en présence d'une hyperplasie surrénalienne congénitale virilisante. Les taux sériques d'androstenedione sont également accrus s'il existe un syndrome des ovaires polykystiques, et en cas d'hirsutisme chez la femme. Il peut également y avoir des taux sériques élevés d'androstenedione avec des tumeurs ovariennes virilisantes.

2. INDICATION D'UTILISATION

Méthode immunoenzymatique colorimétrique par compétition pour la détermination quantitative d'Androstenedione dans le sérum ou le plasma humain.

3. PRINCIPE DU DOSAGE

L'androstenedione (antigène) présent dans l'échantillon rentre en compétition avec l'androstenedione antigénique marqué à la peroxydase de raifort (HRP, Conjugué) par rapport à l'anticorps anti androstenedione adsorbé sur Plaques de Microtitrage (phase solide). Après de l'incubation, la séparation libre-lié est obtenue par simple lavage de la phase solide. Après, l'enzyme HRP présent dans la fraction liée catalyse la réaction entre le substrat (H_2O_2) et le substrat TMB, en développant une coloration bleue qui vire au jaune après ajout de la solution d'arrêt (H_2SO_4). L'intensité de la couleur développée est inversement proportionnelle à la concentration d'androstenedione dans l'échantillon. La concentration d'androstenedione dans l'échantillon est calculée sur la base d'une courbe d'étalonnage. Un lecteur de Plaques de Microtitrage ELISA permet la lecture de l'absorption à 450 nm. La concentration d'androstenedione dans l'échantillon est calculée par une courbe d'étalonnage.

4. MATERIELS

4.1. Réactifs fournis

- **Plaque de Microtitrage:** 12 bandes détachables enduites d'Anti-Androstenedione de 8 puits, en sachet d'aluminium refermable.
- **Solution Stop :** 1 flacon contenant 15 mL d'acide sulfurique, < 5 % (w/v) ; (éviter tout contact avec la peau).
- **Conjugué:** 1 flacon contenant 21 mL d'Androstenedione marqué à la peroxydase de raifort.
- **Solution de TMB :** 1 flacon contenant 15 mL de 3,3',5,5'-Tétraméthylbenzidine (H_2O_2 -TMB 0,26g/L) (éviter tout contact avec la peau).
- **Solution de lavage (concentré x 10) :** 1 flacon contenant 50 mL (NaCl 160 g/L, Tween-20 10 g/L, Tampon phosphaté 0,2 M pH 7,4)
- **Contrôle :** 1 flacon contenant 1 mL d'un lot spécifique d'une solution de contrôle prête à l'emploi. La concentration est indiquée sur l'étiquette.
- **Etalons :** 6 flacons, 1 mL chacun
 - Etalon 0: 0 ng/mL
 - Etalon 1: 0,1 ng/mL
 - Etalon 2: 0,4 ng/mL
 - Etalon 3: 1,2 ng/mL
 - Etalon 4: 4,0 ng/mL
 - Etalon 5: 10,0 ng/mL

4.2. Matériels fournis

- 1 couvercle autocollant
- 1 notice d'utilisation

4.3. Matériels et équipements requis

- Lecteur de Plaques de Microtitrage ELISA, pour mesure l'absorbance à 450 nm, 620-630 nm
- Incubateur 37 °C
- Equipement manuel ou automatique pour le rinçage des Plaques de Microtitrage
- Pipettes
- Vortex
- Eau distillée
- Tubes jetables
- Chronomètre

5. STABILITE ET CONSERVATION

Les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette s'ils sont conservés à 2...8 °C dans l'obscurité.

6. PREPARATION DES REACTIFS

Il est très important que tous les réactifs, échantillons, contrôle et étalons soient portés à température ambiante (22...28 °C) pour au moins 30 minutes avant de commencer le dosage ! À la fin de l'essai conservent les réactifs immédiatement à 2...8 °C ; évitez la longue exposition à température ambiante.

6.1. Plaque de Microtitrage

Les bandes détachables sont enduites d'anticorps d'anti Androstènedione et sont prêtes à l'emploi. Conserver entre 2...8 °C. N'ouvrir l'emballage que si la pièce est à température ambiante. *Après avoir prélevé les bandes nécessaires, refermer immédiatement les autres dans le sachet d'aluminium avec le déshydratant fourni et conservées à 2...8 °C; elles sont stables jusqu'à la date de péremption.*

6.2. Conjugué

La solution est prête à l'emploi.

6.3. Etalons

Les étalons sont prêts à l'emploi et ont les concentrations suivantes :

Etalon 0:	0 ng/mL
Etalon 1:	0,1 ng/mL
Etalon 2:	0,4 ng/mL
Etalon 3:	1,2 ng/mL
Etalon 4:	4,0 ng/mL
Etalon 5:	10,0 ng/mL

Mélanger 5 minutes avant utilisation avec un vortex. Les étalons sont prêts à l'emploi. Après la première utilisation, stable pendant encore 6 mois s'ils sont conservés à 2...8 °C.

6.4. Contrôle

Avant utilisation, mélanger 5 min. avec un mélangeur rotatif. Le flacon contient 1 mL d'une solution de contrôle spécifique au lot, prête à l'emploi. La concentration est indiquée sur l'étiquette.

6.5. Solution de TMB

Le flacon contient 15 mL d'un mélange de peroxyde d'hydrogène et de tétraméthylbenzidine. Le réactif est prêt à l'emploi et doit être conservé à 2...8 °C dans l'obscurité. *La solution doit être incolore ou avoir une légère teinte bleue. Si le substrat devient bleu, il a pu être contaminé et doit être remplacé.*

6.6. Solution Stop

Le flacon contient 15 mL d'une solution d'acide sulfurique (H314). Cette solution prête à l'emploi doit être conservée à 2...8 °C.

6.7. Solution de Lavage

Diluer le contenu de la solution de lavage concentrée 10x avec de l'eau distillée jusqu'à un volume final de 500 mL avant utilisation. Pour les petits volumes respecter le rapport de dilution de 1 :10. La solution de lavage diluée est stable pendant 30 jours entre 2...8 °C. Il est possible d'observer la présence de cristaux dans la solution de lavage concentrée, dans ce cas, mélanger à température ambiante jusqu'à la dissolution complète des cristaux, pour une meilleure efficacité diluer tout le flacon de solution de lavage jusqu'à 500 mL en surveillant le transfert de cristaux avec le lavage de la bouteille, puis mélanger jusqu'à la dissolution complète des cristaux.

7. PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

La détermination de Androstènedione peut être effectuée sur du plasma ou du sérum humain. Conserver les échantillons à -20°C si la détermination n'est pas effectuée le jour du prélèvement. Si les échantillons sont conservés congelés, bien mélanger les échantillons décongelés avant le dosage. *Eviter les cycles répétés de congélation et de décongélation.* Diluer les échantillons > 10 ng/mL 1:2 avec l'étalon 0.

7.1. Précaution d'usage

- Certains réactifs contiennent de petites quantités de Proclin 300® comme conservateur. Eviter tout contact avec peau et les muqueuses.
- Le TMB est irritant, ce qui peut être nocif s'il est inhalé, ingéré ou absorbé à travers la peau. Eviter toute inhalation, ingestion ou contact avec la peau et les yeux pour prévenir de ces risques.
- La solution stop consiste en une solution d'acide sulfurique diluée. L'acide sulfurique est toxique et corrosif et peut être toxique en cas d'ingestion. Pour prévenir d'éventuelles brûlures chimiques, éviter tout contact avec la peau et les yeux.
- Ne pas utiliser des échantillons microbiologiquement contaminés ou des échantillons hautement lipémiques ou hémolysés.
- Observer la plus grande précision dans la reconstitution et la distribution des réactifs.
- Cette méthode permet de déterminer des concentrations d'Androstènedione de 0,1 ng/mL à 10 ng/mL.
- Éviter l'exposition du réactif TMB/H₂O₂ à la lumière directe du soleil, aux métaux et aux substances oxydantes. Ne pas congeler la solution.
- L'administration de stéroïdes naturels ou synthétiques peut altérer les niveaux d'Androstènedione dans le sang.

8. PROCEDE DU DOSAGE

8.1. Préparation du dosage

Lire attentivement la notice d'utilisation **avant de** réaliser le dosage. La fiabilité des résultats dépend du suivi strict d'utilisation comme décrit. Avant de commencer le dosage, déterminer le plan de distribution et d'identification des échantillons et des contrôles. Sélectionner le nombre de bandes ou de puits nécessaires et les placer sur le support. Le pipetage des échantillons ne doit pas prendre plus de 10 minutes afin d'éviter toutes dérives du dosage. Si cela dure plus de 10 minutes, suivre le même ordre d'utilisation. Si plusieurs plaques sont utilisées, il est recommandé de répéter la courbe dose/réponse. Réserver au moins :

1 puits	(ex. A1)	Pour le blanc
2 puits	(ex. B1+C1)	Pour l'étalon 0
2 puits	(ex. D1+E1)	Pour l'étalon 1
2 puits	(ex. F1+G1)	Pour l'étalon 2
2 puits	(ex. H1+A2)	Pour l'étalon 3
2 puits	(ex. B2+C2)	Pour l'étalon 4
2 puits	(ex. D2+E2)	Pour l'étalon 5
2 puits	(ex. F2+G2)	Pour le contrôle

Il est recommandé de déterminer les contrôles et les échantillons du patient en doublets.

Réaliser toutes les étapes du dosage dans l'ordre donné et sans interruption entre les étapes.

Un cône de pipette propre et jetable doit être utilisé pour distribuer chaque contrôle et échantillon.

1. Pipeter 25 µL d'étalons, de contrôles et d'échantillons dans leurs puits respectifs.
2. Ajouter 200 µL de conjugué dans chaque puits. Garder le puits A1 pour le blanc.
3. Couvrir les puits avec le couvercle fourni dans le kit.
4. **Incuber pendant 1 heure à 37 °C.**
5. À la fin de l'incubation, enlever le couvercle, aspirer le contenu des puits et laver chaque puits trois fois avec 300 µL de solution de lavage diluée. Eviter les débordements de puits de réaction.

Remarque importante : Pendant chaque pas de lessive, secouez doucement la plaque depuis 5 secondes et enlevez la solution d'excès en tapant la plaque inversée sur un essuie-mains en papier absorbant.

Équipement automatisé : Si vous utilisez l'équipement automatisé, lavez les puits au moins 5 fois.

Note : L'étape de lavage est très importante ! Un lavage insuffisant peut conduire à une précision faible et des valeurs d'absorbance faussement élevées.

6. Pipeter 100 µL de solution de TMB dans tous les puits.
7. **Incuber pendant exactement 15 min à température ambiante (22...28 °C) à l'obscurité.**
8. Pipeter 100 µL de solution stop dans tous les puits dans le même ordre à la même vitesse que pour la solution de TMB. Secouer doucement la Plaque de Microtitrage.
La couleur bleue développée pendant l'incubation vire au jaune.
9. Mesurer l'absorbance (E) des échantillons à 450 nm contre une longueur d'onde de référence de 620-630 nm ou contre le blanc pendant 5 minutes.

8.2. Mesure

Faire le **zéro** du lecteur de Plaque de Microtitrage ELISA à l'aide du blanc dans le puits A1.

Si - pour des raisons techniques - le lecteur de Plaques de Microtitrage ELISA ne peut pas être ajusté à zéro en utilisant le blanc dans le puits A1, soustraire la valeur d'absorbance du puits A1 de toutes les autres valeurs d'absorbance mesurées afin d'obtenir des résultats fiables !

Mesurer l'absorbance de tous les puits à 450 nm et enregistrer les valeurs d'absorbance pour chaque contrôle et échantillon de patient.

Il est recommandé d'effectuer la mesure **dichromatique** utilisant 620-630 nm comme longueur d'onde de référence.

Calculer **les valeurs moyennes d'absorbance pour tous les doublets, si nécessaires.**

9. RESULTATS

9.1. Calcul des résultats

Calculer l'absorbance moyenne pour chaque point du courbe étalon et de chaque échantillon. Tracer la valeur d'absorbance moyenne des étalons par rapport à la concentration. Dessiner le meilleur ajustement de la courbe sur les points tracés (par exemple 4 paramètres logistiques).

Interpoler les valeurs des échantillons sur le courbe étalon pour obtenir les valeurs de concentrations correspondantes en ng/mL.

9.2. Valeurs de Référence

Les concentrations d'Androstènedione dans le sérum ou le plasma sont comprises dans les intervalles suivants :

Hommes		0,60 – 2,7 ng/mL
Femmes	phase folliculaire	0,75 – 3,1 ng/mL
	Phase lutéinique	0,94 – 3,2 ng/mL

Prenez garde au fait que la détermination d'une gamme de valeurs attendues pour une population "normale" d'une méthode donnée dépend de plusieurs facteurs, comme la spécificité et la sensibilité de la méthode utilisée et le genre de population étudiée. Par conséquent chaque laboratoire doit considérer que la gamme donnée comme une indication générale par le fabricant et produit sa propre gamme de valeurs attendues basée sur la population où est situé le laboratoire.

10. CONTROLE QUALITE

Chaque laboratoire doit doser des contrôles à des niveaux normaux, élevés et bas d'androstènedione pour contrôler la performance du test. Ces contrôles doivent être traités comme des inconnues et les valeurs doivent être déterminées dans chaque procédure de test effectuée. Des cartes de contrôle de qualité doivent être maintenues pour suivre la performance des réactifs fournis. Des méthodes statistiques pertinentes doivent être utilisées pour déterminer les tendances. Le laboratoire individuel doit fixer des limites acceptables de performance des tests. Les autres paramètres à surveiller sont les intercepts de 80, 50 et 20 % de la courbe standard pour la reproductibilité d'une série à l'autre. En outre, l'absorbance maximale doit être conforme à l'expérience passée. Une déviation significative par rapport aux performances établies peut indiquer un changement inaperçu des conditions expérimentales ou une dégradation des réactifs du kit. Des réactifs frais doivent être utilisés pour déterminer la raison des variations.

11. PERFORMANCE DU DOSAGE

11.1. Précision

Variation Intra Dosage

La variation intra dosage a été déterminée par un réplicat (x 20) sur trois sérums différents dans un dosage. La variation intra dosage est $\leq 10.0 \%$.

Variation Inter Dosage

La variation inter dosage a été déterminée par un réplicat (x 10) sur trois sérums de contrôle différents en différents lots. La variation inter dosage est $\leq 9.5 \%$.

11.2. Spécificité

La réaction croisée des anticorps calculée à 50% selon Abraham :

Androstènedione	100 %
5 α -dihydrotestosterone	0,05 %
DHEA	0,05 %
Epitestosterone	0,04 %
DHEA-S	0,027 %
Cortisol	0,008 %
Progesterone	0,007 %
Estrone	0,007 %
Testosterone	< 0,001 %
17 beta-Estradiol	< 0,001 %
Estriol	< 0,001 %
Aldosterone	< 0,001 %

11.3. Sensibilité

La plus petite concentration détectable d'Androstènedione par l'étalon 0 est 0,01 ng/mL avec un niveau de confiance 95%.

11.4. Exactitude

L'épreuve de récupération conduite sur un échantillon enrichi avec 0,4 - 0,8 - 1,6 - 3,2 ng/mL d'Androstenedione a donné une valeur moyenne ($\pm$ SD) de $100,91\% \pm 5,61 \%$. L'épreuve de dilution (2 - 4 - 8 - 16 fois) conduite sur trois échantillons a donné une valeur de récupération moyenne ($\pm$ SD) de $107,18 \% \pm 3,03\%$.

11.5. Corrélation avec le dosage RIA

Le Androstenedione ELISA a été comparée à un procédé de chimioluminescence disponible dans le commerce. 60 échantillons de sérum ont été analysés selon les deux systèmes d'essais.

La courbe de régression est :

$$Y = 0,92 \cdot X - 0,02$$

$$r = 0,84$$

12. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

- La procédure de dosage, l'information, les précautions et mises en garde du mode d'emploi doivent être suivies de façon stricte. L'utilisation de ces kits avec des automates ou dispositifs similaires doit être validée. Aucun changement de la conception, composition et procédure de dosage, ainsi que l'utilisation avec d'autres produits non approuvés par le fabricant, ne sont autorisés ; seul l'utilisateur est responsable de tels changements. Le fabricant n'est pas responsable des faux résultats et des incidents dus à ces modifications. Le fabricant n'est pas responsable des résultats fournis par analyse visuelle des échantillons des patients.
- Uniquement pour diagnostic in vitro par des professionnels. Ne pas utiliser pour un usage interne ou externe chez l'homme ou l'animal.
- Suivre les Bonnes Pratiques de Laboratoires (BPL) pour la manipulation de produits sanguins.
- Tous les composants d'origine humaine utilisés pour la fabrication de ces réactifs ont été analysés et ont été testés non réactifs aux antigènes HBs, en anticorps anti-VIH et en anticorps anti-VHC. Néanmoins, tous les produits doivent être considérés et traités comme étant potentiellement infectieux.
- Ne pas échanger les réactifs ou les bandes provenant de différents lots de production.
- Ne pas utiliser de réactifs provenant d'autres fabricants avec les réactifs de ce kit.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
- Utiliser seulement des cônes de pipette, des distributeurs et du matériel de laboratoire propres.
- Ne pas échanger les bouchons des flacons, pour éviter la contamination croisée
- Fermer les flacons de réactifs immédiatement après l'utilisation pour éviter l'évaporation et la contamination microbienne.

- Avant une nouvelle utilisation, vérifier les flacons de conjugué et de contrôle, déjà utilisés, pour exclure une contamination microbienne.
- Pour éviter la contamination croisée et des résultats faussement élevés, introduire les échantillons de patients et le conjugué exactement au fond des puits en évitant les éclaboussures.
- Quand l'utilisation a automatisé l'équipement, l'utilisateur a la responsabilité de s'assurer que le kit a été convenablement évalué.
- Si le liquide n'est pas complètement extrait des puits, cela peut influencer la précision du dosage et/ou augmenter le bruit de fond. Pour améliorer la performance du kit sur les systèmes automatiques ELISA, on recommande d'augmenter le nombre de se lave.
- L'addition de la solution de substrat initie la réaction cinétique qui se termine par l'ajout de solution stop. Par conséquent, l'addition de solution de substrat et de solution stop doit être faite durant la manipulation pour éliminer tous risques de dépassement de la durée de réaction.
- Suivre la notice pour les contrôles qualité dans les laboratoires médicaux en dosant les contrôles et/ou les sérums.
- Les lecteurs de microplaques mesurent verticalement. Ne pas toucher le fond des puits.
- La méthode ELISA est destinée à un personnel qualifié qui est familiarisé avec les Bonnes Pratiques de Laboratoire.

12.1. Elimination des déchets

Les résidus des produits chimiques et des préparations sont considérés en général comme des déchets dangereux. L'élimination de ce type de déchet est réglementée par des lois et réglementations nationales et régionales. Contacter les autorités compétentes ou les sociétés de gestion des déchets pour obtenir des renseignements sur l'élimination des déchets dangereux.

Pour plus d'informations sur les matériaux d'emballage, reportez-vous à la section MATÉRIELS D'EMBALLAGE.

13. INFORMATION POUR LES COMMANDES

REF

DNOV008

Androstènedione

(96 Dosages)

ITALIANO

1. INTRODUCTION

Androstenedione (o noto anche come 4-androstenedione) è un ormone steroideo prodotto nelle ghiandole adrenali e nelle gonadi come intermedio della via biochimica della sintesi di testosterone, estrone ed estradiolo. È il precursore comune degli ormoni sessuali maschili e femminili. L'androstenedione secreto nel plasma può essere convertito dai tessuti periferici in testosterone ed in estrogeni.

L'Androstenedione ha attività androgena relativamente debole, circa il 20% del testosterone. Tuttavia, i livelli di androstenedione del siero eccedono spesso i livelli di testosterone sia nel sano che nel malato. I tassi di produzione e di secrezione inoltre eccedono quelli del testosterone, anche in donne nelle quali vi è una conversione supplementare dell'androstenedione in testosterone.

In donne in premenopausa, le ghiandole adrenali e le ovaie sintetizzano circa la metà dell'androstenedione totale (circa 3 mg/giorno). In menopausa la sintesi di androstenedione è circa dimezzata, poiché vi è una riduzione della sintesi da parte delle ovaie. Tuttavia, l'androstenedione è lo steroide principale prodotto dall'ovaia in post-menopausa.

La misura dell'androstenedione sierico fornisce un indice della biosintesi degli androgeni. Livelli elevati di androstenedione sono stati individuati nell'iperplasia adrenale congenita. I livelli di androstenedione del siero inoltre sono aumentati in caso di sindrome policistica dell'ovaia e in caso di irsutismo in donne. Livelli elevati di androstenedione del siero possono essere presenti in tumori adrenali ed ovarici.

2. USO PREVISTO

Metodo competitivo immunoenzimatico colorimetrico per la determinazione quantitativa della concentrazione dell'Androstenedione nel siero o plasma umano.

3. PRINCIPIO DEL TEST

I pozzetti della Piastra di Microtitolazione sono rivestiti con anticorpi anti-Androstenedione (in fase solida). L'Androstenedione presente nel campione compete con l'Androstenedione marcato con perossidasi di rafano aggiunto (antigene marcato con enzima) per il legame dell'anticorpo. Dopo l'incubazione, viene eseguita una separazione tra legato e libero mediante lavaggio in fase solida. Il complesso immunitario formato dall'antigene marcato con l'enzima viene visualizzato aggiungendo il substrato Tetrametilbenzidina (TMB), che dà un prodotto di reazione blu. L'intensità di questo prodotto è inversamente proporzionale alla quantità di Androstenedione nel campione. Per arrestare la reazione, si aggiunge l'acido solforico. Questo produce un prodotto finale di colore giallo. L'assorbimento a 450 nm viene letto con un lettore di Piastre di Microtitolazione ELISA. La concentrazione di androstenedione nel campione viene calcolata attraverso una curva di calibrazione.

4. MATERIALI

4.1. Reagenti forniti

- **Piastra di Microtitolazione:** 12 strisce divisibili in 8 pozzetti, con adesi anticorpi anti-Androstenedione; dentro una busta d'alluminio richiudibile.
- **Soluzione Bloccante:** 1 flacone contenente 15 mL di acido solforico, < 5 % (w/v); (evitare qualsiasi contatto con la pelle).
- **Coniugato:** 1 flacone contenente 21 mL di Androstenedione coniugato con perossidasi di rafano.
- **Soluzione Substrato TMB:** 1 flacone contenente 15 mL di 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (H_2O_2 -TMB 0,26 g/L), (evitare qualsiasi contatto con la pelle).
- **Tampone di Lavaggio (10x conc.):** 1 flacone contenente 50 mL di un tampone fosfato (NaCl 160 g/L, Tween-20 10 g/L), concentrato 10 volte (0,2 M) per il lavaggio dei pozzetti; pH 7,4.
- **Controllo:** 1 flacone da 1 mL di una soluzione di controllo specifica per il lotto; pronto all'uso. La concentrazione è indicata sull'etichetta.
- **Calibratori:** 6 flaconi, 1 mL ciascuno
 - Calibratore 0: 0 ng/mL
 - Calibratore 1: 0,1 ng/mL
 - Calibratore 2: 0,4 ng/mL
 - Calibratore 3: 1,2 ng/mL
 - Calibratore 4: 4,0 ng/mL
 - Calibratore 5: 10,0 ng/mL

4.2. Materials supplied

- 1 pellicola adesiva
- 1 istruzioni per l'uso (IFU)

4.3. Materials and Equipment needed

- Lettore di Piasre di Microtitolazione ELISA, attrezzato per la misurazione dell'assorbanza a 450 nm, 620-630 nm
- Incubatore a 37 °C
- Lavatore automatico o manuale, di Piasre di Microtitolazione
- Pipette
- Agitatore a rulli
- Acqua distillata
- Provette monouso
- Timer

5. MODALITÀ DI CONSERVAZIONE

I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta se conservati a 2...8 °C al buio.

6. REAGENT PREPARATION

È molto importante portare tutti i reagenti, i campioni, i calibratori e il controllo a temperatura ambiente (22...28 °C) per almeno 30 minuti prima di iniziare il test! Al termine del test, conservare immediatamente i reagenti a 2...8 °C; evitare una lunga esposizione a temperatura ambiente.

6.1. Piastra di Microtitolazione

Le strisce divisibili, pronte all'uso, sono rivestite con anticorpi anti-Androstenedione. Conservare a 2...8 °C. Aprire la busta solo quando è a temperatura ambiente. *Immediatamente dopo la rimozione delle strisce necessari, le strisce rimanenti devono essere risigillate nella busta di alluminio insieme con il sacchetto di gel di silice fornito e conservate a 2...8 °C; stabilità fino alla data di scadenza.*

6.2. Conjugate

Il coniugato androstenedione-HRP è una soluzione pronta all'uso.

6.3. Standards

I calibratori sono pronti all'uso e hanno le seguenti concentrazioni:

Calibratore 0:	0 ng/mL
Calibratore 1:	0,1 ng/mL
Calibratore 2:	0,4 ng/mL
Calibratore 3:	1,2 ng/mL
Calibratore 4:	4,0 ng/mL
Calibratore 5:	10,0 ng/mL

Prima dell'uso, mescolare 5 minuti con un miscelatore a rulli. Una volta aperti, gli standard sono stabili per altri 6 mesi a 2...8 °C.

6.4. Controllo

Prima dell'uso mescolare 5 minuti con un miscelatore a rulli. Il flacone contiene 1 mL di soluzione di controllo specifica per il lotto, pronta all'uso. La concentrazione è indicata sull'etichetta.

6.5. Soluzione substrato TMB

Il flacone contiene 15 mL di un sistema tetrametilbenzidina/perossido di idrogeno. La soluzione sta pronta all'uso e deve essere conservata a 2...8 °C al riparo dalla luce. *La soluzione deve essere incolore o può avere una leggera sfumatura blu. Se il substrato diventa blu, potrebbe essere stato contaminato e deve essere gettato via.*

6.6. Soluzione bloccante

Il flacone contiene 15 ml di soluzione di acido solforico (H314). Questa soluzione pronta all'uso deve essere conservata a 2...8 °C.

6.7. Soluzione di lavaggio

Prima dell'uso, diluire la soluzione di lavaggio concentrata 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 soluzione di lavaggio 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.

7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

La determinazione dell'Androstenedione può essere effettuata su plasma o su siero umano. Se il dosaggio non viene effettuato lo stesso giorno del prelievo conservare il campione a -20°C. Evitare cicli di congelamento e scongelamento del campione. Diluire i campioni con concentrazioni superiori a 10 ng/mL (1:2) con il Calibratore 0.

7.1. Precauzioni

- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di Proclin 300® come conservante. Evitare il contatto con la pelle e le mucose.
- Il substrato TMB contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito attraverso la pelle. Per evitare lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con la pelle e gli occhi.
- La Soluzione bloccante 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.
- Non utilizzare campioni altamente emolizzati o lipemici.
- Per la dispensazione dei reagenti è richiesta la massima precisione.
- Questo metodo consente di determinare concentrazioni di Androstenedione da 0,1 a 10,0 ng/mL.
- Evitare l'esposizione del substrato TMB alla luce solare diretta, ai metalli o agli ossidanti. Non congelare la soluzione.
- Il trattamento del paziente con, steroidi naturali o sintetici può alterare i livelli ematici di Androstenedione.

8. PROCEDIMENTO

8.1. Preparazione del test

Leggere bene le istruzioni per l'uso prima di iniziare il test. L'affidabilità dei risultati dipende dalla stretta osservanza delle istruzioni per l'uso di prova come descritto. Prima di iniziare il test, il piano di distribuzione e identificazione di tutti i campioni e gli standard deve essere accuratamente stabilito. Selezionare il numero richiesto di strisce o pozzetti per microtitolazione e inserirli nel supporto. Il pipettaggio dei campioni non deve durare più di dieci minuti, per evitare la deriva del test. Se dura più di dieci minuti, segua lo stesso ordine di dispensazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva di risposta alla dose. Assegnare almeno:

- | | |
|-------------------------------|-----------------------------|
| 1 pozzetto (ad esempio A1) | per il bianco del substrato |
| 2 pozzetti (ad esempio B1+C1) | per lo standard 0 |
| 2 pozzetti (ad esempio D1+E1) | per lo standard 1 |
| 2 pozzetti (ad esempio F1+G1) | per lo standard 2 |
| 2 pozzetti (ad esempio H1+A2) | per lo standard 3 |
| 2 pozzetti (ad esempio B2+C2) | per lo standard 4 |
| 2 pozzetti (ad esempio D2+E2) | per lo standard 5 |
| 2 pozzetti (ad esempio F2+G2) | per il control |

Si raccomanda di determinare i calibratori, il control e i campioni dei pazienti in duplicato.

Eseguire tutte le fasi del test nell'ordine indicato e senza ritardi apprezzabili tra le fasi.

Per la dispensazione di ogni standard e di ogni campione paziente, si deve utilizzare un puntale pulito e monouso.

1. Pipettare 25 µL di calibratori, controllo e campioni nei rispettivi pozzetti.
2. Aggiungere 200 µL di coniugato in ogni pozzetto. Lasciare il pozzetto A1 per il Bianco del substrato.
3. Coprire i pozzetti con la pellicola fornita nel kit.
4. **Incubare per 1 ora a 37 °C.**
5. Al termine dell'incubazione, rimuovere la pellicola, aspirare il contenuto dei pozzetti e lavare ogni pozzetto 3 volte con 300 µL di soluzione di lavaggio diluita. Evitare di traboccare dai pozzetti di reazione.

Nota importante: Durante ogni fase di lavaggio, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e rimuovere la soluzione in eccesso battendo la piastra capovolta su un tovagliolo di carta assorbente.

Lavaggio automatico: Nel caso in cui si utilizzi un'apparecchiatura automatica, lavare i pozzetti almeno 5 volte.

Nota: il lavaggio è fondamentale! Un lavaggio insufficiente comporta una scarsa precisione e valori di assorbanza falsamente elevati.

6. Dispensare 100 µL di soluzione di substrato TMB in tutti i pozzetti.
7. **Incubare per 15 minuti esatti a temperatura ambiente (22...28 °C) al buio.**
8. Pipettare 100 µL di Soluzione Bloccante in tutti i pozzetti nello stesso ordine e alla stessa velocità della Soluzione di substrato TMB. Agitare delicatamente la Piastra di Microtitolazione.
Qualsiasi colore blu sviluppato durante l'incubazione si trasforma in giallo.
9. 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.

8.2. Misurazione

Regolare il lettore di Piastre di Microtitolazione ELISA a zero usando il **substrato-Bianco (Blank) nel pozzetto A1**.

Se - per motivi tecnici - non è possibile regolare il di Piastre di Microtitolazione ELISA a zero utilizzando il Bianco-substrato nel pozzetto A1, il valore de assorbanza de questo deve essere sottratto dai valori dell'assorbanza da tutti i valori delle altre assorbanze per ottenere risultati affidabili!

Misurare l'assorbanza di tutti i pozzetti a **450 nm** e registrare i valori di assorbanza per ogni standard e campione paziente.

Si raccomanda la misurazione bicromatica utilizzando una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm.

Dove sono state misurate in doppio, calcolare la **media delle assorbanze**.

9. RESULTATI

9.1. Calcolo dei risultati

Calcolare l'assorbanza media per ogni punto della curva standard e per ogni campione. Tracciare il valore medio dell'assorbanza degli standard rispetto alla concentrazione. Disegnare la curva migliore attraverso i punti tracciati. (es. Logistica a quattro parametri).

Interpolare i valori dei campioni sulla curva standard per ottenere i valori corrispondenti delle concentrazioni espresse in ng/mL.

9.2. Valori di riferimento

Le concentrazioni sieriche o plasmatiche di Androstenedione sono comprese nei seguenti intervalli:

Uomini		0,60 – 2,7 ng/mL
Donne	fase follicolare	0,75 – 3,1 ng/mL
	fase luteinica	0,94 – 3,2 ng/mL

Si prega di prestare attenzione al fatto che la determinazione di un intervallo di valori attesi per una popolazione "normale" in un determinato metodo dipende da molti fattori, come la specificità e la sensibilità del metodo utilizzato e il tipo di popolazione in esame. Pertanto, ogni laboratorio dovrebbe considerare l'intervallo fornito dal produttore come un'indicazione generale e produrre il proprio intervallo di valori attesi in base alla popolazione autoctona in cui il laboratorio lavora.

10. CONTROLLO QUALITÀ

Ogni laboratorio dovrebbe analizzare i campioni nella gamma dei livelli elevati, normali e bassi di androstenedione 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 dell'80, 50 e 20% della curva di calibrazione per valutare la riproducibilità. Inoltre, l'assorbanza massima deve 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.

11. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1. Precisione

Variazione Intradossaggio

La variabilità all'interno dello stesso kit è stata determinata replicando (20x) la misura di tre differenti sieri di controllo. La variabilità intra-assay è $\leq 10,0\%$.

Variazione interdosaggio

La variabilità tra kit differenti è stata determinata replicando (10x) la misura di tre differenti sieri di controllo con kit appartenenti a lotti diversi. La variabilità inter-assay è $\leq 9,5\%$.

11.2. Cross reattività

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

Androstenedione	100 %
5 α -dihydrotestosterone	0,05 %
DHEA	0,05 %
Epitestosterone	0,04 %
DHEA-S	0,027 %
Cortisol	0,008 %
Progesterone	0,007 %
Estrone	0,007 %
Testosterone	< 0,001 %
17B-Estradiol	< 0,001 %
Estriol	< 0,001 %
Aldosterone	< 0,001 %

11.3. Sensibilità analitica

La concentrazione minima di Androstenedione misurabile che può essere distinta dal Calibratore 0 è 0,01 ng/mL con un limite di confidenza del 95%.

11.4. Accuratezza

La prova di recupero condotta su campioni arricchiti con 0,4 - 0,8 - 1,6 - 3,2 ng/mL di Androstenedione, ha dato un valore medio ($\pm$ SD) di $100,91\% \pm 5,61\%$. La prova di diluizione condotta su tre campioni diluiti 2 - 4 - 8 - 16 volte ha dato un valore medio ($\pm$ SD) di $107,18\% \pm 3,03\%$.

11.5. Correlazione con la RIA

Il kit Androstenedione ELISA è stato comparato con un metodo chemiluminescente disponibile in commercio. Sono stati testati 60 campioni di siero.

La curva di regressione lineare è:

$$Y = 0,92 \cdot X - 0,02$$

$$r = 0,84$$

12. PRECAUTIONS AND WARNINGS

- La procedura analitica, le informazioni, le precauzioni e le avvertenze contenute nelle istruzioni per l'uso devono essere seguite scrupolosamente. L'uso dei kit con analizzatori e attrezzature similari deve essere previamente convalidato. Qualunque cambiamento nello scopo, nel progetto, nella composizione o struttura e nella procedura analitica, così come qualunque uso dei kit in associazione ad altri prodotti non approvati dal produttore non è autorizzato; l'utilizzatore stesso è responsabile di questi eventuali cambiamenti. Il produttore non è responsabile per falsi risultati e incidenti che possano essere causati da queste ragioni. Il produttore non è responsabile per qualunque risultato ottenuto attraverso esame visivo dei campioni dei pazienti.
- 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.
- Tutti i componenti di origine umana sono stati trovati non reattivi con Anti-HIV-Ab, Anti-HCV-Ab e HBsAg. Nonostante ciò, e tutti i materiali devono comunque essere considerati potenzialmente contagiosi e infettivi.
- Non scambiare reagenti o strisce di lotti di produzione diversi.
- Non utilizzare reagenti di altri produttori insieme ai reagenti di questo kit di analisi.
- Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza indicata sull'etichetta.
- Utilizzi solo puntali per pipette, dispenser e articoli da laboratorio puliti.
- Non scambiare i tappi a vite delle fiale di reagenti per evitare la contaminazione incrociata.
- Chiudere bene le fiale di reagenti subito dopo l'uso per evitare l'evaporazione e la contaminazione microbica.
- Dopo la prima apertura e la successiva conservazione, controllare le fiale di coniugato e di controllo per verificare la presenza di contaminazione microbica prima di un ulteriore utilizzo.
- Per evitare la contaminazione incrociata e risultati falsamente elevati, pipettare i campioni del paziente ed erogare il coniugato senza schizzare accuratamente sul fondo dei pozzetti.
- La rimozione incompleta o imprecisa del liquido dai pozzetti potrebbe influenzare la precisione del test e/o aumentare lo sfondo. Per migliorare le prestazioni del kit sui sistemi automatici si raccomanda di aumentare il numero di lavaggi.
- Per ottenere risultati riproducibili, è importante che il tempo di reazione in ogni pozzetto sia mantenuto costante. Il pipettaggio dei campioni non deve protrarsi oltre i dieci minuti, per evitare la deriva del dosaggio. Se sono necessari più di dieci minuti, seguire lo stesso ordine di dispensazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva di risposta alla dose in ogni piastra.
- L'aggiunta del TMB Substrato avvia una reazione cinetica, che viene terminata dall'aggiunta della soluzione bloccante. Pertanto, il substrato TMB e la Soluzione bloccante devono essere aggiunti nella stessa sequenza per eliminare qualsiasi deviazione temporale durante la reazione.
- Seguire le Buone Pratiche di Laboratorio (GLP) per la manipolazione dei reagenti ematici.
- I lettori di piastre misurano in verticale. Non deve toccare il fondo dei pozzetti.
- L'ELISA è progettato solo per il personale qualificato che segue le norme di buona pratica di laboratorio (Good Laboratory Practice, GLP).

12.1. Smaltimento

I residui di prodotti chimici e preparati sono generalmente considerati come rifiuti pericolosi. Lo smaltimento di questo tipo di rifiuti è regolato da leggi e regolamenti nazionali e regionali. Contattare le autorità locali o le società di gestione dei rifiuti che daranno consigli su come smaltire i rifiuti pericolosi.

Per informazioni sui materiali d'imballaggio fare riferimento a MATERIALI D'IMBALLAGGIO.

13. INFORMAZIONI PER GLI ORDINI

REF	DNOV008	Androstenedione	(96 Determinations)
------------	---------	-----------------	---------------------

ESPAÑOL

1. INTRODUCCIÓN

La androstenediona (o 4-androstenediona) es una hormona esteroidea, producida en las glándulas suprarrenales y en las gónadas como producto intermedio en la vía bioquímica de la síntesis de testosterona, estrona y estradiol. Es el precursor común de las hormonas sexuales masculinas y femeninas. La androstenediona secretada en el plasma puede convertirse en los tejidos periféricos en testosterona y en estrógenos. La androstenediona tiene una actividad androgénica relativamente débil, aproximadamente el 20% de la testosterona. Sin embargo, los niveles de androstenediona en suero a menudo exceden los niveles de testosterona tanto en estado sano como enfermo. Las tasas de producción y de secreción también superan a las de la testosterona, incluso en mujeres en las que hay una conversión adicional de la androstenediona a testosterona. En mujeres premenopáusicas, las glándulas suprarrenales y los ovarios sintetizan aproximadamente la mitad de la androstenediona total (aproximadamente 3 mg/día). En la menopausia, la síntesis de androstenediona es de aproximadamente la mitad, ya que hay una reducción de la síntesis por parte de los ovarios. Además, la androstenediona es el esteroide principal producido por los ovarios en la postmenopausia. La medición de la androstenediona sérica proporciona un índice de la biosíntesis de los andrógenos. Se han detectado niveles elevados de androstenediona en la hiperplasia suprarrenal congénita. Los niveles de androstenediona en suero además aumentan en caso de síndrome de ovario poliquístico y en caso de hirsutismo en mujeres. Pueden encontrarse niveles elevados de androstenediona en suero en tumores suprarrenales y ováricos.

2. USO

Método competitivo inmunoenzimático colorimétrico para la determinación cuantitativa de la concentración de androstenediona en suero o plasma humano.

3. FUNDAMENTO DE LA PRUEBA

La androstenediona (antígeno) de la muestra compete con la androstenediona antigénica marcada con peroxidasa de rabano (HRP, Conjugado) por la unión al anticuerpo anti-androstenediona adsorbido en la Placa de Microtitulación (fase sólida). Después de la incubación, la separación de las fracciones libre y unida se obtiene mediante un simple lavado de la fase sólida. Por último, al reaccionar con el sustrato (H_2O_2) y el sustrato tetrametilbencidina (TMB), la enzima HRP presente en la fracción unida desarrolla una coloración azul que se torna amarilla tras añadir la solución de interrupción (H_2SO_4). La intensidad del color desarrollado es inversamente proporcional a la concentración de androstenediona en la muestra. La concentración de androstenediona en la muestra se calcula según una curva de calibración.

4. MATERIALES

4.1. Reactivos suministrados

- **Placa de Microtitulación:** 12 tiras de 8 pozos separables. Los pozos están recubiertos con anticuerpo anti-androstenediona; empacados en una bolsa de papel de aluminio resellable.
- **Solución de parada:** 1 vial con 15 mL de ácido sulfúrico < 5 % (w/v); (evitar el contacto con la piel).
- **Conjugado:** 1 vial contiene 21 mL de Androstenediona conjugada con peroxidasa de rabano (HRP).
- **Solución de sustrato TMB:** 1 vial contiene 15 mL de 3, 3', 5, 5' tetrametilbencidina (H_2O_2 – TMB 0.26 g/L) (evitar el contacto con la piel.)
- **Solución de lavado conc. 10x:** 1 vial con 50 mL de una solución concentrada 10x (NaCl 160 g/L; Tween-20 10 g/L; Tampón fosfato 0,2 M, pH 7,4).
- **Control:** 1 vial contiene 1 mL de un lote específico de solución de control. La concentración del control se indica en la etiqueta de la botella.
- **Estándares:** 6 viales de 1 mL cada uno

Estándar 0	0 ng/mL
Estándar 1	0,1 ng/mL
Estándar 2	0,4 ng/mL
Estándar 3	1,2 ng/mL
Estándar 4	4,0 ng/mL
Estándar 5	10,0 ng/mL

4.2. Materiales suministrados

- 1 lámina autoadhesiva
- 1 instrucciones de uso

4.3. Materiales y equipos necesarios

- Incubador a 37°C
- Lector de Placas de Microtitulación ELISA equipado para medir absorbancia a 450 nm, 620 – 630 nm
- Equipo manual o automático para el lavado de las Placas de Microtitulación
- Pipetas
- agitador giratorio
- Agua destilada
- Tubos desechables
- Temporizador

5. ESTABILIDAD Y ALMACENAMIENTO

Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta cuando se almacenan a 2...8 °C en oscuridad.

6. PREPARACION DE LOS REACTIVOS

¡Es muy importante que tenga todos los reactivos, muestras y estándares a temperatura ambiente (22...28 °C) durante al menos 30 minutos antes de iniciar la ejecución de la prueba! ¡Al final del ensayo inmediatamente poner todos los reactivos a 2...8 °C para evitar largos periodos a temperatura ambiente!

6.1. Placa de Microtitulación

Las tiras vienen listas para ser usadas y se rompen para separar los pozos. Están recubiertas con anticuerpos anti-Androstenediona. Se deben conservar a oscuras a una temperatura de entre 2...8° C. Abra la bolsa sólo cuando ésta se encuentre a temperatura ambiente. *Inmediatamente después de retirar las tiras que va a utilizar, asegúrese de guardar las tiras que no van a ser usados dentro de la bolsa de aluminio resellable junto con el desecante suministrado y almacenarla a una temperatura entre 2...8 °C; las tiras son estables hasta la fecha de caducidad.*

6.2. Conjugado

El conjugado Androstenediona-HRP listo para usar.

6.3. Estándares

Los estándares están listos para ser usados y tienen las siguientes concentraciones:

Estándar 0:	0 ng/mL
Estándar 1:	0,1 ng/mL
Estándar 2:	0,4 ng/mL
Estándar 3:	1,2 ng/mL
Estándar 4:	4,0 ng/mL
Estándar 5:	10,0 ng/mL

Antes del uso, dejar al menos 5 minutos en el agitador giratorio. Después de abierto es estable por 6 meses de 2...8 °C.

6.4. Control

Antes de su uso, mezclar 5 min. con un agitador giratorio. El frasco contiene 1 mL de una solución de control específica para cada lote, lista para usar. La concentración se indica en la etiqueta.

6.5. Solución de sustrato TMB

El frasco contiene 15 mL de un sistema de tetrametilbencidina/peróxido de hidrógeno. El reactivo está listo para su uso y debe conservarse a 2...8 °C en la oscuridad. *La solución debe estar incolora o puede tener un ligero tinte azul. Si el sustrato se torna azul, esto indica que puede haberse contaminado y por lo tanto debe desecharse.*

6.6. Solución de parada

El frasco contiene 15 mL de solución de ácido sulfúrico (H314). Esta solución lista para usar debe conservarse a 2...8 °C.

6.7. Solución de lavado

Antes del uso, diluir el contenido de cada ampolla de 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 a 500 mL, teniendo cuidado para transferir también los cristales y, a continuación, agitar hasta que se disuelvan por completo.

7. RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

La determinación de androstenediona puede realizarse en plasma o suero humano. Si la prueba no se realiza el mismo día de la extracción, conservar la muestra a -20°C. *Se recomienda no congelar y descongelar repetidamente las muestras.* Diluir las muestras con concentraciones superiores a 10 ng/mL (1:2) con estándar 0.

7.1. Precauciones

- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Proclin 300® como conservante. Evite el contacto con la piel y las mucosas.
- El sustrato de TMB contiene un irritante, que puede ser nocivo si es inhalado, ingerido o absorbido por la piel. Para evitar lesiones, evite la inhalación, ingestión o contacto con la piel y 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.
- No use muestras con contaminación microbiana, altamente lipémicas o hemolizadas.
- Observar la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- Este método permite determinar concentraciones de androstenediona de 0,1 ng/mL a 10,0 ng/mL.
- Evite la exposición de los reactivos TMB/H₂O₂ a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.
- El suministro de esteroides naturales o sintéticos puede alterar los niveles hemáticos de androstenediona.

8. PROCEDIMIENTO

8.1. Preparación para la prueba

Por favor, lea detenidamente el protocolo de la prueba **antes** de realizar el ensayo. La confiabilidad de los resultados depende del seguimiento estricto del protocolo de la prueba tal cual se describe en el inserto. Antes de comenzar, especificar exactamente la repartición y posición de las muestras y de los estándares/controles. Seleccione el número necesario de tiras de microtitulación o pozos e insértelos en el soporte. El pipeteo de muestras no debe tomar más de diez minutos para evitar la deriva del análisis. Si utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva dosis-respuesta. Por favor, destinar al menos:

1 pozo	(por ejemplo, A1)	para el blanco sustrato
2 pozos	(por ejemplo, B1+C1)	para el estándar 0
2 pozos	(por ejemplo, D1+E1)	para el estándar 1
2 pozos	(por ejemplo, F1+G1)	para el estándar 2
2 pozos	(por ejemplo, H1+A2)	para el estándar 3
2 pozos	(por ejemplo, B2+C2)	para el estándar 4
2 pozos	(por ejemplo, D2+E2)	para el estándar 5
2 pozos	(por ejemplo, F2+G2)	para el control

Se recomienda determinar los estándares, el control y muestras de pacientes por duplicado.

Realice todos los pasos del ensayo en el orden indicado y sin retrasos apreciables entre los pasos.

Debe usar una punta desechable limpia para la dosificación de cada estándar y cada muestra.

- Agregue 25 µL de estándares, controles y muestras en sus respectivos pozos.
- Agregue 200 µL de conjugado a cada pocillo. Deje el pozo A1 libre para el blanco del sustrato.
- Cubra los pozos con la lámina autoadhesiva incluida en el paquete.
- Incube por 1 hora a 37 °C.**
- Cuando se complete el tiempo de incubación, retire la lámina autoadhesiva, aspire el contenido de los pozos y los pozos 3 veces con 300 µL de solución de lavado diluida. Evite desbordamientos entre los pozos de reacción.

Nota importante: 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 golpéea repetidas veces contra una servilleta de papel absorbente.

Lavados automático: Si está utilizando una lavadora automática, hacer 5 lavados.

Nota: ¡El lavado es crítico! Un lavado insuficiente resulta en una mala precisión y valores de absorbancia falsamente elevados.

- Agregue 100 µL de solución de sustrato TMB en todos los pozos.
- Incube durante exactamente 15 minutos a temperatura ambiente (22...28 °C) en oscuridad.**
- Agregue 100 µL de solución de parada en todos los pozos en el mismo orden y a la misma velocidad que agregó la solución de sustrato TMB. Mezcle la Placa de Microtitulación suavemente.

Cualquier color azul desarrollado durante la incubación se convertirá en amarillo.

- Leer la absorbancia a 450 nm frente una segunda lectura de referencia a 620-630 nm o frente al blanco entre 5 minutos.

8.2. Misurazione

Ajuste el lector de Placas de Microtitulación ELISA a **cero** usando el **substrato blanco en el pozo A1**.

Si - por razones técnicas - el lector de Placas de Microtitulación ELISA no se puede ajustar a cero con el blanco del substrato en el pozo A1, restar el valor de absorbancia del pocillo A1 de todos los valores de absorbancia otras medidas con el fin de obtener resultados fiables!.

Mida la absorbancia de todos los pozos a **450 nm** y registre los valores de absorbancia para cada estándar y muestra.

Se recomienda la medición **bicromática** utilizando una longitud de onda de referencia de 620-630 nm.

Cuando sea necesario, calcule el **valor media de la absorbancia** de los duplicados.

9. RESULTADOS

9.1. Cálculo de los resultados

Calcule la absorbancia media para cada punto de la curva estándar y cada muestra. Grafique el valor medio de absorbancia de los estándares versus la concentración. Dibuje la curva que mejor se ajuste a los puntos trazados (ej. Logística de cuatro parámetros). Interpole los valores de las muestras en la curva estándar para obtener los valores correspondientes para las concentraciones expresadas en ng/mL.

9.2. Valores de referencia

El siguiente valor de androstenediona en suero o plasma debe ser considerado como una guía:

Hombres:	0,60 – 2,7 ng/mL
Mujeres Fase Folicular	0,75 – 3,1 ng/mL
Fase Lútea	0,94 – 3,2 ng/mL

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. CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe probar controles en los rangos normal, alto y bajo de androstenediona para monitorear el desempeño del ensayo. Esos controles deben ser tratados como desconocidos y los se deben determinar los valores en cada procedimiento de prueba realizado. Las gráficas de control de calidad se deben mantener siguiendo el desempeño de los reactivos suministrados. Métodos estadísticos adecuados deben ser empleados para determinar las tendencias. El laboratorio individual debe establecer los límites de desempeño aceptables para el ensayo. Otros parámetros que deben ser monitoreados incluyen los interceptos del 80, 50 y 20 % de la curva estándar para la reproducibilidad corrida a corrida. En adición, la absorbancia máxima debe ser consistente con la experiencia pasada. Desviación significativa del desempeño establecido puede indicar un cambio inadvertido en las condiciones experimentales o degradación de los reactivos del kit. Reactivos frescos deben ser usados para determinar la razón de las variaciones.

11. CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE DESEMPEÑO

11.1. Precision

Variación intraensayo

La variación intracorrida fue determinada por mediciones repetidas (20x) de tres sueros control diferentes en un mismo ensayo. La variación intracorrida del ensayo es ≤ 10.0 %.

Variación interensayo

La variación intercorrida fue determinada por mediciones repetidas (10x) de tres sueros control con diferentes lotes. La variabilidad interensayo es ≤ 9.5 %.

11.2. Reactividad cruzada

La reactividad cruzada del anticuerpo fue calculada al 50 % de acuerdo a Abraham:

Androstenediona	100 %
5 α -Dihidrotestosterona	0,05 %
DHEA	0,05 %
Epitestosterona	0,04 %
DHEA-S	0,027 %
Cortisol	0,008 %
Progesterona	0,007 %
Estrona	0,007 %
Testosterona	< 0,001 %
17 β -Estradiol	< 0,001 %
Estriol	< 0,001 %
Aldosterona	< 0,001 %

11.3. Sensibilidad

La concentración detectable más baja de androstenediona que se puede distinguir del estándar 0 es 0,01 ng/mL con un límite de confianza del 95 %.

11.4. Exactitud

La recuperación de 0.4 – 0.8 – 2.6 – 3.2 ng/mL de androstenediona añadida a una muestra resultó en un valor medio ($\pm$ DE) de 100,91 % $\pm$ 5,61 % con respecto a la concentración original. La prueba de dilución realizada con tres sueros diluidos 2 - 4 - 8 - 16 veces dio un valor medio ($\pm$ SD) de 107,18 % $\pm$ 3,03 %.

11.5. Correlación con RIA

El kit Androstenediona ELISA fue comparado con otro eneyda commercial en quimioluminiscencia. Con ambos sistemas de prueba, se analizaron 60 muestras de suero.

Se calculó la curva de regresión lineal:

$$Y = 0,92 \cdot X - 0,02$$

$$r = 0,84$$

12. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

- El procedimiento de prueba, la información, precauciones y advertencias contenidas en las instrucciones de uso deben ser seguidas estrictamente. El uso de los kits con analizadores y equipos similares debe ser validado. No está autorizado realizar ningún cambio en el diseño, composición y procedimiento del ensayo, así como ningún uso en combinación con otros productos no aprobados por el fabricante; el usuario es responsable de tales cambios. El fabricante no se hace responsable por resultados falsos o por cualquier incidente causado por esta razón. El fabricante no se responsabiliza por los resultados obtenidos mediante el análisis visual de las muestras de los pacientes.
- Si utiliza un equipo automático, es responsabilidad del usuario asegurar que la metodología aplicada haya sido debidamente validada.
- Sólo para uso en diagnóstico in vitro y por personal experto. No es para uso interno o externo en humanos o animales.
- Todos los componentes de origen humano utilizados para la producción de estos reactivos han sido examinados para determinar la presencia de anticuerpos anti-VIH, anticuerpos anti-HCV y anticuerpos anti-HBsAg y se ha determinado que no son reactivos. Sin embargo, todo el material debe ser considerado y tratado como potencialmente infeccioso.
- No intercambiar reactivos o tiras de diferentes lotes de producción.
- No se deben utilizar reactivos de otros fabricantes en combinación con los reactivos de este kit.
- No utilizar los reactivos después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- Use sólo puntas para micropipeta, dispensadores y material de laboratorio limpio.
- No intercambie las tapas de los viales. Esto evita la contaminación cruzada.
- Cierre los viales de los reactivos con fuerza inmediatamente después de usarlos para evitar la evaporación y contaminación microbiana.
- Después de abrir el kit por primera vez y almacenarlo, verifique que los viales del conjugado y los estándares no presenten contaminación microbiana antes continuar usándolo.
- Para prevenir la contaminación cruzada y la obtención de resultados falsamente elevados, pipetee las muestras de los pacientes y dispense el conjugado con precisión hacia el fondo de los pozos evitando que se produzcan salpicaduras.
- 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 de ELISA, 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 prolonga 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.
- Además de la solución de sustrato TMB inicia una reacción cinética, que es terminada por la adición de la solución de parada. Por lo tanto, el sustrato TMB y la solución de parada debe ser añadido en la misma secuencia para eliminar cualquier desviación de tiempo durante la reacción.
- El ELISA está únicamente para personal cualificado que cumpla con las normas de Buenas Prácticas de Laboratorio.
- Los lectores de microplacas leen las DO verticalmente, por tanto, no debe tocarse el fondo de los pocillos.

12.1. Consideraciones de Eliminación

Residuos de químicos y preparaciones generalmente se consideran como desechos peligrosos. La eliminación de esta clase de desechos está regulada mediante leyes y regulaciones nacionales y regionales. Contactar a sus autoridades locales o compañías de manejo de desechos que den asesoría en como disponer los residuos peligrosos.

Para obtener información sobre los materiales de embalaje, consulte MATERIALES DE EMBALAJE.

13. INFORMACIÓN PARA PEDIDOS

REF	DNOV008	Androstenedione	(96 Determinaciones)
------------	---------	-----------------	----------------------

BIBLIOGRAPHY / LITERATUR / BIBLIOGRAPHIÉ / BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAFIA

Judd H. and Yen S. (1973) J.Clin.Endoc.& Metab 36, 475

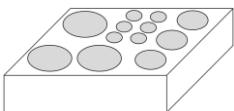
Abraham G. (1974) J. Clin.Endoc 39, 340.

Hillier S.G. and de Zwart F. (1985) Intraovarian Steroids Metabolism and Puberty: roles of Androgens in Adolescence Female, 79th Year book Medical Publishers Inc: Chicago.

Venturoli S. et al (1987) Fertility and Sterility 48 (1), 78.

Venturoli S. et al (1986) Hormone Res .24,269.

PACKAGING MATERIALS/VERPACKUNGSMATERIALIEN/MATÉRIELS D'EMBALLAGE/MATERIALI D'IMBALLAGGIO/MATERIALES DE EMBALAJE

 PAP 21	 PAP 21	 PAP 22	MTP  ALU / LDPE 90
--	--	--	--

SYMBOLS KEY / SYMBOLSCHLÜSSEL / EXPLICATION DES SYMBOLES / LEGENDA / SÍMBOLOS

	Manufactured by / Hergestellt von / Fabriqué par / Prodotto da / Fabricado por
IVD	In Vitro Diagnostic Medical Device / In Vitro Diagnosticum / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Diagnostico in vitro / Producto para diagnóstico In vitro
LOT	Lot Number / Chargenbezeichnung / Numéro de lot / Lotto / Número de lote
	Expiration Date / Verfallsdatum / Date de péremption / Scadenza / Fecha de caducidad
	Storage Temperature / Lagertemperatur / Température de conservation / Temperatura di conservazione / Temperatura de almacenamiento
	Keep away from sunlight / Vor direkter Sonneneinstrahlung schützen / Tenir à l'écart de la lumière du soleil / Tenere lontano dalla luce solare / Mantener alejado de la luz solar
CE	CE Mark / CE-Zeichen / Marquage CE / Marchio CE / Marca CE
UDI	Unique Device Identifier / Eindeutige Produktidentifizierung / identification unique des dispositifs / identificazione unica del dispositivo / identificación única del producto
REF	Catalogue Number / Katalog Nummer / Référence du catalogue / Numero di codice / Número de Catálogo
	Consult Instructions for Use / Gebrauchsanweisung beachten / Consulter le mode d'emploi / Consultare le istruzioni per l'uso / Consultar las Instrucciones de Uso
MTP	Microtiterplate / Mikrotiterplatte / Plaque de Microtitrage / Piastra di Microtitolazione / Placa de Microtitulación
CONJ	Conjugate / Konjugat / Conjugué / Coniugato / Conjugado
CONTROL	Control / Kontrolle / Contrôle / Controllo / Control
CAL	Calibrator resp. Standard / Kalibrator bzw. Standard / Calibrateur resp Etalon / Calibratore ossia Standard / Calibrador o bien Estándar
SOLN STOP	Stop Solution / Stopplösung / Solution d'arrêt / Soluzione bloccante / Solución de Parada
SUB TMB	TMB Substrate Solution/ TMB-Substratlösung/ Substrat TMB/ soluzione substrato TMB/ solución substrato TMB
WASH BUF 10x	Wash Solution 10x conc. / Waschlösung 10x konz. / Solution de lavage concentré x 10 / soluzione di lavaggio concentrazione x10 / solución de lavado concentrado x10
	Contains sufficient for "n" tests / Ausreichend für "n" Tests / Contenu suffisant pour "n" tests / Contenuto sufficiente per "n" saggi / Contenido suficiente para "n" tests

SUMMARY OF TEST PROCEDURE / KURZANLEITUNG TESTDURCHFÜHRUNG /
RÉSUMÉ DE LA PROCEDURE DE TEST / SCHEMA DELLA PROCEDURA /
RESUMEN DE LA TÉCNICA

SCHEME OF THE ASSAY

Androstenedione

Test Preparation

Prepare reagents and samples as described.
Establish the distribution and identification plan for all specimens and.
Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Assay Procedure

	Substrate blank	Standard 0 - 5	Control	Sample
Standard 0 – 5	-	25 µL	-	-
Control	-	-	25 µL	-
Sample	-	-	-	25 µL
Conjugate	-	200 µl µL	200 µL	200 µL
Cover wells with foil supplied in the kit Incubate for 1 h 37 °C Wash each well three times with 300 µl diluted wash solution In case you use automatic equipment, wash the wells at least 5 times.				
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate for exactly 15 min at room temperature in the dark				
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Shake microplate gently Photometric measurement at 450 nm, 620 – 630 nm				



Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH

Waldstrasse 23 A6

63128 Dietzenbach, Germany

Tel.: +49 6074 23698-0

Fax: +49 6074 23698-900

E-Mail: info.frankfurt@eu.goldstandarddiagnostics.com

Website: clinical.goldstandarddiagnostics.com

DNOV008_ASD_IFU_rev01_fromLot_5964BN