

# Androstenedione Saliva

CE

Enzyme immunoassay for the quantitative determination of Androstendione in human saliva

Test immunoenzimatico per la determinazione quantitativa del Androstendione nella saliva umani

Inmunoensayo enzimático para la determinación cuantitativa de Androstendiona en saliva humana

## Only for in-vitro diagnostic use

|                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------|----|
| English .....                                                                    | 2  |
| Italiano .....                                                                   | 7  |
| Español .....                                                                    | 12 |
| Literature / Bibliografía / Bibliografía .....                                   | 18 |
| Symbols Key / Legenda / Símbolos .....                                           | 19 |
| Summary of Test Procedure / Schema della procedura / Resumen de la técnica ..... | 20 |

---

Product Number:      DSNOV27 (96 Determinations)

---

## ENGLISH

### 1. INTRODUCTION

---

Androstenedione (also known as  $\Delta^4$ -androstenedione) is a 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. 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 produce 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.

The high serum-saliva correlation for androstenedione suggests that individual differences in serum androstenedione levels may be accurately estimated using saliva as a non-invasive alternative specimen.

### 2. INTENDED USE

---

Competitive immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination of Androstenedione in human saliva.

### 3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

---

Microtiterplates are precoated 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 antibodies; in resealable aluminium foil.
  - **Stop Solution:** 1 bottle containing 15 mL sulphuric acid, < 5 % (w/v); (avoid any skin contact).
  - **Conjugate conc.:** 1 bottle containing 1 mL concentrated 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 50x conc:** 1 bottle containing 20 mL (NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L)
  - **Incubation buffer:** 1 bottle containing 30 mL phosphate buffer pH 7.5, BSA 1 g/L, stabilizer.
  - **Control A:** 1 bottle containing 1 mL of a lot-specific control solution. The concentration is indicated on the label.
  - **Control B:** 1 bottle containing 1 mL of a lot-specific control solution. The concentration is indicated on the label.
  - **Standards:** 5 bottles, 1 mL each
    - Standard 0: 0 pg/mL
    - Standard 1: 20 pg/mL
    - Standard 2: 100 pg/mL
    - Standard 3: 400 pg/mL
    - Standard 4: 1000 pg/mL
- For SI units: pg/mL x 3.487= pmol/L

#### 4.2. Materials supplied

- 1 Cover foil
- 1 Instruction for use (IFU)
- 1 Distribution and identification plan

#### 4.3. Materials and Equipment needed

- 37 °C Incubator
- ELISA Microtiterplate reader, equipped for the measurement of absorbance at 450 nm, 620 – 630 nm
- Centrifuge (3000 rpm) with rotor for glass tubes
- Manual or automatic equipment for rinsing Microtiterplates
- Pipettes to deliver volumes between 10 and 1000  $\mu$ L
- Roller shaker
- Distilled water
- Plastic straw
- Glass tubes for centrifugation
- Timer

#### 4.4. Precautions

- Some reagents contain Proclin 300® as preservative. Avoid 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.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of the reagents.
- This method allows the determination of Androstenedione from 5 – 1000 pg/mL.
- Treatment of the patient with cortisone, natural or synthetic steroids can impair Androstenedione determination.
- Avoid the exposure of TMB substrate solution to direct sunlight, metals, or oxidants. Do not freeze the solution.

#### 5. STABILITY AND STORAGE

---

The originally closed 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, standards, and controls to room temperature (22...28 °C) 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. Store at 2...8 °C. 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

Prepare immediately before use. Add 10 µL of conjugate to 1 mL of incubation buffer. Mix gently. The diluted conjugate is stable for 3 h at 22...28° C.

##### 6.3. Standards

Before use mix 5 min with a rotating mixer. The standards are ready to use and have the following concentration of Androstenedione:

|             |            |
|-------------|------------|
| Standard 0: | 0 pg/mL    |
| Standard 1: | 20 pg/mL   |
| Standard 2: | 100 pg/mL  |
| Standard 3: | 400 pg/mL  |
| Standard 4: | 1000 pg/mL |

For samples with Androstenedione concentration greater than 1000 pg/mL dilute the sample (1:2) with standard 0.

Once opened the standards are stable for another 6 months at 2...8 °C.

##### 6.4. 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.*

##### 6.5. Stop Solution

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

##### 6.6. Wash Solution

Dilute the contents of each vial of the buffered wash solution concentrate (50x) with distilled water to a final volume of 1000 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:50 dilution ratio. The diluted wash solution is stable for 30 days at 2...8 °C.

##### 6.7. Controls

Ready to use. The bottles contain 1 mL of a lot-specific control solution. The concentration is indicated on the label.

#### 7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

---

The determination of Androstenedione can be performed in saliva. It is recommended to collect saliva samples with a centrifuge glass tube and a plastic straw. Other commercially available sample collector devices have not been tested.

##### 7.1. Method and Limitations

Collect saliva samples at the times indicated.

If no specific instructions have been given, oral fluid (saliva) samples may be collected at any time. The following should be noted:

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

## 7.2. Saliva Processing Instructions

1. Let the saliva flow down through the straw into the centrifuge glass tube
2. Centrifuge at 3000 rpm for 15 min.
3. Store at -20 °C for at least 1 hour
4. Defrost samples
5. Centrifuge again for 15 min. at 3000 rpm
6. The saliva sample is now ready to be tested.
7. Store the sample at 2...8 °C for one week or at -20 °C for longer time.

## 8. ASSAY PROCEDURE

---

### 8.1. Test Preparation

Please read the test protocol carefully **before** performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the test protocol as described. Prior to commencing the assay, the distribution and identification plan for all specimens and standards should be carefully established on the result sheet supplied in the kit. 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 | (eg. D2+E2)  | for control A           |
| 2 wells | (eg. F2+G2)  | for control B           |

*It is necessary to determine standards, controls 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 50 µL standards, controls and samples into their respective wells.
2. Add 150 µL diluted 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 3 times with 300 µL of 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** against a reference wavelength of 620-630 nm or against the blank within 5 min. Record the absorbance values for each standard and patient sample in the distribution and identification plan.

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 pg/mL.

## 9.2. Reference values

As the values of salivary Androstenedione have a circadian pattern, we suggest collecting the samples at the same hour (8 a.m.). Each laboratory must establish its own normal ranges based on patient population.

The following value should be considered as a guideline:

|       |                |                 |
|-------|----------------|-----------------|
| Women | normal         | 20 – 160 pg/mL  |
|       | P.C.O.-Hirsute | 120 – 300 pg/mL |
| Men   |                | 20 – 150 pg/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 (16x) of two different saliva controls in one assay. The within assay variability is  $\leq 8.5\%$ .

#### Inter Assay Variation

Between run variation was determined by replicate measurements (10x) of two different saliva control with different lots of kit. The inter assay variability is  $\leq 11\%$ .

### 11.2. Cross Reactivity

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

|                                |        |
|--------------------------------|--------|
| Androstenedione                | 100%   |
| Testosterone                   | 1.2%   |
| Epitetosterone                 | 0.2%   |
| 5 $\alpha$ Dihydrotestosterone | 0.1%   |
| Dehydroepiandrosterone (DHEA)  | 0.1%   |
| Progesterone                   | 0.001% |
| Estrone                        | 0.001% |
| Cortisol                       | 0.001% |

### 11.3. Analytic Sensitivity

The lowest detectable concentration of Androstenedione that can be distinguished from the standard 0 is 5 pg/mL at the 95 % confidence limit.

### 11.4. Accuracy

The recovery of 50 – 200 – 500 pg/mL of Androstenedione added to sample gave an average value ( $\pm$ SD) of  $102.60\% \pm 13.23\%$  with reference to the original concentrations.

### 11.5. Correlation with serum sample

The NovaTec Androstenedione Saliva ELISA kit was compared to another commercially available Androstenedione saliva assay. 38 saliva samples were analysed according in both test systems. The linear regression curve was calculated:

$$y = 0.46x + 5.51$$

$$r^2 = 0.983$$

y = Androstenedione Saliva NovaTec ELISA kit

x = reference Salivary Androstenedione ELISA kit

## 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 strips of different production lots. The expiry date printed on box and vials labels must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- No reagents of other manufacturers should be used along with reagents of this test kit.
- 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.
- Sample(s), which are contaminated microbiologically, should not be used in the assay. Highly lipemic or haemolysed specimen(s) should similarly not be used.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If it lasts longer than ten minutes, 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 substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the stop solution. Therefore, the addition of the substrate and the stopping solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during reaction.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background. To improve the performance of the kit on automatic systems is recommended to increase the number of washes.
- The NovaTec ELISA is only designed for qualified personnel who are familiar with good laboratory practice.

### 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.

## 13. ORDERING INFORMATION

---

Prod. No.:

DSNOV27

Androstenedione Saliva (96 Determinations)

## ITALIANO

### 1. INTRODUZIONE

---

Androstenedione (o  $\Delta^4$ -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 sia 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.

L'elevata correlazione tra i livelli sierici e salivari consente di stimare accuratamente i livelli di androstenedione effettuando il test su saliva.

### 2. USO PREVISTO

---

Metodo competitivo immunoenzimatico colorimetrico per la determinazione quantitativa di Androstenedione nella saliva umana.

### 3. PRINCIPIO DEL TEST

---

I pozzetti della Piastra di Microtitolazione sono pre-rivestiti con anticorpi anti-Androstenedione (in fase solida). L'Androstenedione 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 libero-legato mediante semplice lavaggio della 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 del colore sviluppato è inversamente proporzionale alla concentrazione di Androstenedione presente 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 è calcolata in base ad 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 conc.:** 1 flacone contenente 1 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 (50x conc.):** 1 flacone contenente 20 mL (NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L)
- **Tampone d'incubazione:** 1 flacone contenente 30 mL tampone fosfato pH 7.5, BSA 1 g/L, stabilizzante.
- **Controllo A:** 1 flacone da 1 mL di una soluzione di controllo specifica per il lotto; pronto all'uso. La concentrazione è indicata sull'etichetta.
- **Controllo B:** 1 flacone da 1 mL di una soluzione di controllo specifica per il lotto; pronto all'uso. La concentrazione è indicata sull'etichetta.
- **Calibratori:** 5 flaconi, 1 mL ciascuno.  
Calibratore 0: 0 pg/mL  
Calibratore 1: 20 pg/mL  
Calibratore 2: 100 pg/mL  
Calibratore 3: 400 pg/mL  
Calibratore 4: 1000 pg/mL

SI UNITS: pg/mL x 3,487 = pmol/L

#### 4.2. Accessori forniti

- 1 pellicola adesiva
- 1 istruzione per l'uso (IFU)
- 1 Piano di distribuzione e identificazione

#### 4.3. Materiali e attrezzature necessari

- Incubatore a 37 °C
- Lettore di Piastre di Microtitolazione ELISA, attrezzato per la misurazione dell'assorbanza a 450 nm, 620-630 nm
- Centrifuga (3000 giri/min) con rotore per provette in vetro
- Lavatore automatico o manuale, di Piastre di Microtitolazione
- Pipette per erogare volumi compresi tra 10 e 1000  $\mu$ L
- Miscelatore a rotazione
- Acqua distillata
- Cannuccia di plastica
- Provette di vetro per la centrifugazione
- Timer

#### 4.4. 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.
- È necessaria la massima precisione nella ricostituzione e la dispensazione dei reagenti.
- Questo metodo consente di determinare le concentrazioni di Androstenedione da 5 a 1000 pg/mL.
- Il trattamento del paziente con cortisone, steroidi naturali o sintetici può compromettere la determinazione dell'Androstenedione.
- Evitare l'esposizione della soluzione di substrato TMB alla luce solare diretta, ai metalli o agli ossidanti. Non congelare la soluzione.

#### 5. MODALITÀ DI CONSERVAZIONE

---

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

#### 6. PREPARAZIONE DEI REAGENTI

---

*È molto importante portare tutti i reagenti, i campioni, i calibratori e i controlli 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. Conjugato

Preparare al momento dell'uso. Diluire 10 µL di Conjugato con 1 mL di Tampone d'incubazione. Mescolare delicatamente. Stabile 3 ore a temperatura ambiente (22...28 °C).

##### 6.3. Calibratori

Prima dell'uso, mescolare 5 minuti con un miscelatore a rulli. I calibratori sono pronti all'uso e hanno la seguente concentrazione di Androstenedione:

|             |      |       |
|-------------|------|-------|
| Standard 0: | 0    | pg/mL |
| Standard 1: | 20   | pg/mL |
| Standard 2: | 100  | pg/mL |
| Standard 3: | 400  | pg/mL |
| Standard 4: | 1000 | pg/mL |

Per i campioni con una concentrazione di Androstenedione superiore a 1000 pg/mL diluire il campione (1:2) con lo standard 0.

Una volta aperti, gli standard sono stabili per altri 6 mesi a 2...8 °C.

##### 6.4. 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.*

##### 6.5. 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.

##### 6.6. Soluzione di lavaggio

Prima dell'uso, diluire il contenuto della Soluzione di lavaggio concentrata (50x) con acqua distillata fino a un volume finale di 1000 mL. Per volumi inferiori, rispettare il rapporto di diluizione 1:50. La soluzione di lavaggio diluita è stabile a 2...8 °C per almeno 30 giorni.

##### 6.7. Controlli

I flaconi contengono 1 mL di una soluzione di controllo specifica per il lotto. La concentrazione è indicata sull'etichetta.

#### 7. PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

---

La determinazione dell'Androstenedione può essere eseguita nella saliva. Si consiglia di raccogliere i campioni di saliva con una provetta di per centrifuga e una cannuccia di plastica. Non sono stati testati altri apparecchiature di raccolta dei campioni disponibili in commercio.

## 7.1. Metodo e limitazioni

Raccogliere i campioni di saliva nei tempi indicati.

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

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

## 7.2. Istruzioni della Processazione delle salive

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

## 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 sul foglio dei risultati fornito nel kit. 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 il control A            |
| 2 pozzetti (ad esempio F2+G2) | per il controllo B          |

*Si raccomanda di determinare i calibratori, i controlli 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 50 µL di calibratori, controlli e campioni nei rispettivi pozzetti.
2. Aggiungere 150 µL di coniugato diluito 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 (E)** del campione a **450 nm** rispetto a una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm o rispetto al bianco entro 5 minuti. Registrare i valori di assorbanza per ogni calibrator e campione paziente nel piano di distribuzione e identificazione.

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

## 9. RISULTATI

### 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 pg/mL.

### 9.2. Reference values

Siccome i valori dell'Androstenedione Saliva hanno un ritmo circadiano pattern suggeriamo di raccogliere i campioni alla stessa ora (8 A.M.).

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

|        |                  |                 |
|--------|------------------|-----------------|
| Donne  | normali          | 20 – 160 pg/mL  |
|        | P.C.O.-Irsutismo | 120 – 300 pg/mL |
| Uomini |                  | 20 – 150 pg/mL  |

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

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

## 11. CARATTERISTICHE DEL TEST

### 11.1. Precisione

#### Variazione Intradossaggio

La variabilità all'interno dello stesso kit è stata determinata replicando (16x) la misura di due differenti controlli salivari. La variabilità intra-assay è  $\leq 8,5\%$ .

#### Variazione interdosaggio

La variabilità tra kit differenti è stata determinata replicando (10x) la misura di due differenti controlli salivari con kit appartenenti a lotti diversi. La variabilità inter-assay è  $\leq 11\%$ .

### 11.2. Cross reattività

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

|                                |        |
|--------------------------------|--------|
| Androstenedione                | 100%   |
| Testosterone                   | 1,2%   |
| Epitetosterone                 | 0,2%   |
| 5 $\alpha$ Dihidrotestosterone | 0,1%   |
| Dehydroepiandrosterone (DHEA)  | 0,1%   |
| Progesterone                   | 0,001% |
| Estrone                        | 0,001% |
| Cortisol                       | 0,001% |

### 11.3. Sensibilità analitica

La concentrazione minima rilevabile di Androstenedione che può essere distinta dallo standard 0 è di 5 pg/mL al limite di confidenza del 95 %.

#### 11.4. Accuratezza

La prova di recupero condotta su campioni arricchiti con 50 – 200 – 500 pg/mL di Androstenedione, ha dato un valore medio ( $\pm$ SD) di 102,60 %  $\pm$  13,23% rispetto alle concentrazioni originali.

#### 11.5. Correlazione con il campione di siero

Il kit NovaTec Androstenedione saliva ELISA è stato comparato con un kit disponibile in commercio. Sono stati testati 38 campioni di saliva sono stati analizzati secondo entrambi i sistemi di test. È stata calcolata la curva di regressione è:

$$y = 0,46x + 5,51$$

$$r^2 = 0,983$$

y = Androstenedione Saliva NovaTec ELISA kit

x = kit ELISA di riferimento per l'androstenedione salivare

### 12. PRECAUZIONI E AVVERTENZE

---

- 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 componenti dei kit di lotti diversi. Devono essere osservate le date di scadenza riportate sulle etichette della scatola e di tutte le fiale. Non utilizzare componenti oltre la data di scadenza.
- Non utilizzare reagenti di altri produttori insieme con i reagenti di questo kit.
- Utilizzare soltanto attrezzatura pulita.
- Non scambiare i tappi dei flaconi di reagenti per evitare la contaminazione incrociata
- Richiudere i flaconi immediatamente dopo l'uso per evitare la vaporizzazione e contaminazione microbica.
- Una volta aperti e dopo relativo stoccaggio verificare i reagenti per una loro eventuale contaminazione prima dell'uso.
- Per evitare contaminazioni crociate e risultati erroneamente alti pipettare i campioni e reagenti con molta precisione nei pozzetti.
- I campioni contaminati microbiologicamente non devono essere utilizzati nel test. I campioni altamente lipemici o emolizzati, allo stesso modo non devono essere utilizzati.
- Per la riproducibilità dei risultati, è importante che il tempo di reazione di ogni pozzetto sia lo stesso. Per evitare il time shifting durante la dispensazione degli reagenti, il tempo di dispensazione dei pozzetti non dovrebbe estendersi oltre i 10 minuti. Se si protrae oltre, si raccomanda di seguire lo stesso ordine di dispensazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva di calibrazione in ogni piastra.
- L'aggiunta del TMB Substrato da inizio ad una reazione cinetica, la quale termina con l'aggiunta della Soluzione Bloccante. L'aggiunta del TMB Substrato e della Soluzione Bloccante deve avvenire nella stessa sequenza per evitare tempi di reazione differenti.
- I lettori di micropiastre leggono l'assorbanza verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.
- La rimozione incompleta o imprecisa del liquido dai pozzetti potrebbe influenzare la precisione del dosaggio e/o aumentare lo sfondo. Per migliorare le prestazioni del kit sui sistemi automatici si raccomanda di aumentare il numero di lavaggi.
- Il kit NovaTec ELISA è previsto soltanto per essere impiegato da parte di personale qualificato che abbia familiarità con le buone pratiche di laboratorio.

#### 12.1. Smaltimento

In genere tutte i residui di sostanze e preparati chimici sono generalmente considerati rifiuti pericolosi. Lo smaltimento di questo tipo di rifiuti è regolato da leggi e normative nazionali e regionali. Si rivolga alle autorità locali o alle società di gestione dei rifiuti, che le daranno consigli su come smaltire i rifiuti pericolosi.

### 13. INFORMAZIONI PER GLI ORDINI

---

Numero del prodotto:

DSNOV27

Androstenedione Saliva (96 determinazioni)

## ESPAÑOL

### 1. INTRODUCCIÓN

---

La androstenediona (o  $\Delta$  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 por 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 alta correlación entre los niveles séricos y salivales permite estimar con precisión los niveles de androstenediona realizando el ensayo en saliva.

### 2. USO PREVISTO

---

Método inmunoenzimático competitivo y colorimétrico para la determinación cuantitativa de androstenediona en saliva humana.

### 3. PRINCIPIO DEL ENSAYO

---

Los pozos de la microplaca se encuentran recubiertos con anticuerpos anti-androstenediona (fase sólida). La androstenediona de la muestra compite por la unión a éstos anticuerpos con androstenediona marcada con peroxidasa de rábano picante. Una vez finalizada la incubación, se lleva a cabo una separación del complejo unido/libre mediante el lavado de la fase sólida. El complejo inmune formado por el antígeno marcado con enzima se visualiza mediante la adición de Tetrametilbencidina (TMB), la cual produce un producto de reacción azul. La intensidad de este producto es **inversamente** proporcional a la cantidad de androstenediona presente en la muestra. El ácido sulfúrico se agrega para detener la reacción. Esto produce un color amarillo de punto final. La absorción a 450 nm se lee con un lector de Placa de Microtitulación de ELISA. La concentración de androstenediona en la muestra se calcula a partir de una curva de calibración.

### 4. MATERIALES

---

#### 4.1. Reactivos suministrados

- **Placa de Microtitulación:** 12 tiras de 8 pozos separables. Los pozos están recubiertas con anticuerpos de 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 cualquier contacto con la piel).
- **Conjugado conc.:** 1 vial contiene 1 mL de androstenediona marcada con peroxidasa de rábano.
- **Solución de sustrato TMB:** 1 vial contiene 15 mL de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina ( $H_2O_2$ -TMB 0,26 g/L) (evitar cualquier contacto con la piel).
- **Solución de lavado conc. 50x:** 1 vial con 20 mL de NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L
- **Buffer de incubación:** 1 vial contiene 30 mL de buffer fosfato pH 7,5, BSA 1g/L, estabilizador.
- **Control A:** 1 vial que contiene 1 mL de un lote específica de solución de control. La concentración se indica en la etiqueta.
- **Control B:** 1 vial que contiene 1 mL de un lote específica de solución de control. La concentración se indica en la etiqueta.
- **Estándares:** 5 viales, de 1 mL cada una.

Estándar 0: 0 pg/mL

Estándar 1: 20 pg/mL

Estándar 2: 100 pg/mL

Estándar 3: 400 pg/mL

Estándar 4: 1000 pg/mL

Unidades del S.I: pg/mL x 3,487=pmol/L

#### 4.2. Materiales suministrados

- 1 Lámina sellante
- 1 Instrucciones de uso (IFU)
- 1 Plan de distribución e identificación

### 4.3. Materiales y equipos necesarios

- Incubador a 37 °C
- Lector de Placa de Microtitulación ELISA equipado para medir absorbancia a 450 nm, 620 – 630 nm
- Centrifuga (3000 rpm) con rotor para tubos de vidrio.
- Equipo manual o automático para el lavado de las Placas de Microtitulación
- Pipetas entre volúmenes de 10 y 1000 µL
- Agitador giratorio
- Agua destilada
- Varitas en plástico
- Tubos de vidrio para centrifugación
- Temporizador

### 4.4. Precauciones

- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Proclin 300® como preservativo. 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.
- Para una máxima precisión se requiere dispensar todos los reactivos.
- Este método detecta la determinación de androstenediona de 5 – 1000 pg/mL.
- Los pacientes tratados con cortisona, esteroides sintéticos o naturales, pueden interferir con la determinación.
- Evitar la exposición del TMB a luz directa del sol, metales o oxidantes. No congelar la solución.

## 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 patrones a temperatura ambiente (22...28 °C) 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. 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 usadas dentro della 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

Preparar inmediatamente antes del uso. Adicionar 10 µL del conjugado a 1 mL de buffer de incubación. Mezclar gentilmente. El conjugado diluido es estable por 3 h a 22...28 °C.

### 6.3. Estándares

Antes del uso mezclar por 5 min en el agitador giratorio. Los estándares están listos para ser usados y tienen las siguientes concentraciones de androstenediona:

|             |            |
|-------------|------------|
| Estándar 0: | 0 pg/mL    |
| Estándar 1: | 20 pg/mL   |
| Estándar 2: | 100 pg/mL  |
| Estándar 3: | 400 pg/mL  |
| Estándar 4: | 1000 pg/mL |

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

Después de abierto los estándares son estable por otros 6 meses de 2...8 °C.

### 6.4. Solución de sustrato TMB

El frasco contiene 15 mL de un sistema de tetrametilbencidina/peróxido de hidrógeno. El reactivo está listo para ser usado y debe ser almacenado a 2...8 °C en 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.*

### 6.5. Solución de parada

El frasco contiene 15 mL de solución de ácido sulfúrico (H314). Esta solución está lista para su uso.

### 6.6. Solución de lavado

Diluir la solución de lavado concentrada en un 1.000 mL con agua destilada usando un contenedor adecuado. Para volúmenes más pequeños, asegúrese de respetar la relación de 1:50. La solución de lavado diluida es estable durante 30 días si se almacena a 2...8 °C.

## 6.7. Controles

Listo para usar. Las botellas contienen 1 mL de una solución de control específica para el lote. La concentración se indica en la etiqueta.

## 7. RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

La determinación de Androstenediona puede ser determinada en saliva. Es recomendado coleccionar las muestras de saliva en tubos de vidrio para centrifuga y con varitas de plástico. Otros equipos de recolección de muestra disponible en el mercado no han sido probados.

### 7.1. Método y Limitaciones

La colección de muestras de saliva deben ser en el tiempo indicado.

Si no han sido proporcionadas instrucciones específicas para la recolección de la muestra, puede recolectarse en cualquier momento. Tener en cuenta las siguientes condiciones:

- Si la colección de la muestra es realizada en la mañana, debe hacerse antes de cepillar los dientes.
- Durante el día para la siguientes condiciones, antes de tomar una muestra de saliva, esperar por lo menos una hora si ha comido, si ha tomado medicamentos por vía oral o si se ha cepillado los dientes.
- Es muy importante que se reciba una muestra clara y de buena calidad, es decir, que no esté contaminada con comida, pintalabios, sangre, chicle u otros materiales extraños.

### 7.2. Instrucciones de procesamiento de la saliva

- Permitir que el fluido de la saliva se deslice en el tubo de centrifuga.
- Centrifugar a 3000 rpm por 15 min.
- Almacenar a -20 °C no menos de 1 hora.
- Descongelar la muestra
- Centrifugar a 3000 rpm por 15 min.
- La muestra de saliva esta lista para realizar la prueba.
- Almacenar la muestra de 2...8 °C por una semana o a -20° C por largos periodos de tiempo.

## 8. PROCEDIMIENTO

### 8.1. Preparación del test

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 el ensayo, se debe establecer cuidadosamente la distribución e identificación de las muestras y los estándares en la hoja de resultados suministrada con el kit. 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     |
| 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 control A  |
| 2 pozos (por ejemplo, F2+G2) | para el control B  |

*Se recomienda determinar los estándares, controles y muestras 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 50 µL de estándares, controles y muestras en sus respectivos pozos.
- Agregue 150 µL de conjugado diluido a cada pozo excepto al pozo destinado para el blanco A1.
- Cubra todos los pozos con el sellante suministrado en el kit.
- Incube durante 1 hora a 37° C.**
- Cuando se complete el tiempo de incubación, retire la lámina sellante, aspire el contenido de los pozos y lave cada pozo tres veces con 300 µL de lavado diluido. 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 golpéeela repetidas veces contra una servilleta de papel absorbente.

**Lavados automáticos:** 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. Lectura

Ajuste el lector de Placa de Microtitulación ELISA a **cero** usando el **pozo blanco A1**.

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

**Mida la absorbancia** de todos los pocillos a **450 nm** en relación con una longitud de onda de referencia de 620-630 nm o el blanco en un plazo de 5 minutos. Registre los valores de absorbancia de cada estándar y muestra de paciente en el plan de distribución e identificación.

Cuando sea necesario, calcule el **valor medio 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 (p.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 pg/mL.

### 9.2. Valores de referencia

Los siguientes valores para Androstenediona en saliva tienen un patrón circadiano, se sugiere que la muestra se recoja siempre a la misma hora (8 a.m.). Cada Laboratorio puede ajustar sus rangos de referencia basados en el comportamiento de su población.

Los siguientes valores deben considerarse como una guía:

|         |                    |                |
|---------|--------------------|----------------|
| Mujeres | Normal             | 20-160 pg/mL   |
|         | P:C:O.- Hirsutismo | 120 –300 pg/mL |
| Hombres |                    | 20-150 pg/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 evaluar controles normales, altos y bajos de androstenediona para supervisar el desempeño del ensayo. Estos controles deben ser tratados como muestras desconocidas y se deben determinar sus valores cada vez que se realice el ensayo. Se deben llevar gráficas de estos controles de calidad para hacerle seguimiento al desempeño de los reactivos. Se deben emplear los métodos estadísticos pertinentes para verificar las tendencias. Cada laboratorio debe establecer los límites aceptables de desempeño para el ensayo. Otros parámetros que se deben controlar son los interceptes al 80, 50 y 20% de la curva estándar para evaluar la reproducibilidad Inter corrida. Además, la absorción máxima debe ser consistente con la experiencia del laboratorio. Una desviación significativa del desempeño establecido puede indicar un cambio en las condiciones experimentales o la degradación de los reactivos. Deben usarse reactivos frescos para determinar la razón de las variaciones.

## 11. CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE DESEMPEÑO

### 11.1. Precisión

#### Variación intraensayo

La variación intracorrida fue determinada por mediciones repetidas (16x) de dos controles de saliva diferentes en un mismo ensayo. La variación intracorrida del ensayo es  $\leq 8,5 \%$ .

#### Variación interensayo

La variación intercorrida fue determinada por mediciones repetidas (10x) de dos controles de saliva con diferentes lotes. La variabilidad interensayo es  $\leq 11 \%$ .

### 11.2. Reactividad cruzada

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

|                                |        |
|--------------------------------|--------|
| Androstenediona                | 100%   |
| Testosterona                   | 1,2%   |
| Epitetosterona                 | 0,2%   |
| 5 $\alpha$ Dihidrotestosterona | 0,1%   |
| Dehydroepiandrosterona (DHEA)  | 0,1%   |
| Progesterona                   | 0,001% |
| Estrona                        | 0,001% |
| Cortisol                       | 0,001% |

### 11.3. Sensibilidad Analítica

La concentración detectable más baja de androstenediona que se puede distinguir del estándar 0 es 5 pg/mL con un límite de confianza del 95 %.

## 11.4. Precisión

La recuperación de 50 – 200 – 500 pg/mL de androstenediona añadidos a una muestra resultó en un valor medio ( $\pm$  DE) de 102,60 %  $\pm$  13,23 % con respecto a la concentración original.

## 11.5. Correlación con muestras de suero

El ensayo Androstenediona en saliva de NovaTec fue comparado con otro ensayo de Androstenediona disponible comercialmente para saliva. Se analizaron 38 muestras de suero de acuerdo a las instrucciones de ambos sistemas de prueba. Se calculó la curva de regresión lineal:

$$Y = 0,46x + 5,51$$

$$r^2 = 0,983$$

y = Androstenedione Saliva NovaTec ELISA kit

x = referencia androstenediona salival ELISA kit

## 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.
- Sólo para uso en diagnóstico in vitro 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 utilizar los reactivos después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta
- No se deben utilizar reactivos de otros fabricantes en combinación con los reactivos de este kit.
- 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.
- 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.
- Las muestras, que están contaminadas microbiológicamente, no deben utilizarse en el ensayo. Muestras muy lipemicas o hemolizadas tampoco deben ser usadas.
- Es importante que el tiempo de reacción en cada pozo se mantenga constante para obtener resultados reproducibles. El pipeteo de las muestras no debe tomar más de diez minutos para evitar la deriva del análisis. Se recomienda repetir la curva dosis-respuesta si se utiliza más de una placa.
- Los lectores de placa miden verticalmente. No toque el fondo de los pozos.
- 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.
- La prueba por NovaTec ELISA es únicamente para personal calificado que esté familiarizado con buenas prácticas de laboratorio.

### 12.1. CONSIDERACIONES PARA EL DESCARTE

Los residuos de productos y preparaciones químicas generalmente son considerados como residuos peligrosos. La eliminación de este tipo de residuos está regulada por leyes y regulaciones nacionales y regionales. Póngase en contacto con las autoridades locales o empresas de manejo de residuos para que lo asesoren sobre cómo eliminar los residuos peligrosos.

## 13. INFORMACIÓN PARA PEDIDOS

|                    |         |                                             |
|--------------------|---------|---------------------------------------------|
| Numero de Producto | DSN0V27 | Androstenedione Saliva (96 Determinaciones) |
|--------------------|---------|---------------------------------------------|



## **LITERATURE / BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAFIA**

1. Judd H. and Yen S. (1973) J.Clin.Endoc.& Metab 36, 475 (1973)
2. Abraham G. (1974) J. Clin.Endoc 39, 340 (1974)
3. 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.(1985)
4. Venturoli S. et al (1987) Fertility and Sterility 48 (1), 78.(1987)
5. Venturoli S. et al (1986) Hormone Res .24,269.(1986)
6. D. Riad et al Endocr. Reviews, 3(4) 304 367 (1982)

## SYMBOLS KEY / LEGENDA / SIMBOLOS

|                                                                                     |                                                                                                                   |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    | Manufactured by / Prodotto da / Fabricado por                                                                     |
| <b>IVD</b>                                                                          | In Vitro Diagnostic Medical Device / Diagnostico <i>in vitro</i> / Producto para diagnóstico in vitro             |
| <b>LOT</b>                                                                          | Lot Number / Lotto / Número de lote                                                                               |
|    | Expiration Date / Scadenza / Fecha de caducidad                                                                   |
|    | Storage Temperature / Temperatura di conservazione / Temperatura de almacenamiento                                |
|    | Keep away from sunlight / Tenere lontano dalla luce del sole / Mantener alejado de la luz solar                   |
| <b>CE</b>                                                                           | CE Mark / Marchio CE / Marca CE                                                                                   |
| <b>REF</b>                                                                          | Catalogue Number / Numero di codice / Número de Catálogo                                                          |
|    | Consult Instructions for Use / Consultare le istruzioni / Consulte las Instrucciones de Uso /                     |
| <b>MTP</b>                                                                          | Microtiterplate / Piastra di Microtitolazione / Placa de Microtitulación                                          |
| <b>CONJ</b> <b>CONC</b>                                                             | Conjugate conc./ Konjugat konz. / Conjugado conc.                                                                 |
| <b>INC</b> <b>BUF</b>                                                               | Incubation buffer/ Tampone d'incubazione/ Buffer de incubación                                                    |
| <b>CAL</b>                                                                          | Calibrator resp. Standard / Calibratore ossia Standard / Calibrador o bien Estándar                               |
| <b>CONTROL</b> <b>A</b>                                                             | Control A / Controllo A / Control A                                                                               |
| <b>CONTROL</b> <b>B</b>                                                             | Control B / Controllo B / Controllo B                                                                             |
| <b>SOLN</b> <b>STOP</b>                                                             | Stop solution/ Stopplösung / Soluzione bloccante / Solución de parada                                             |
| <b>SUB</b> <b>TMB</b>                                                               | TMB Substrate solution/ Soluzione substrato TMB / Solución substrato TMB                                          |
| <b>WASH</b> <b>BUF</b> <b>50x</b>                                                   | Washing solution 50x concentrated / Soluzione di lavaggio concentrazione x50 / solución de lavado concentrado x50 |
|  | Contains sufficient for "n" tests / Contenuto sufficiente per "n" saggi / Contenido suficiente para "n" tests     |

# SCHEME OF THE ASSAY

## Androstenedione Saliva

### Test Preparation

Prepare reagents and samples as described.  
Establish the distribution and identification plan for all specimens and controls on the result sheet supplied in the kit.  
Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

### Assay Procedure

|                                                                                                                                                                                                                                  | Substrate blank | Standard 0 - 4 | Controls | Sample |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|----------------|----------|--------|
| Standard 0 - 4                                                                                                                                                                                                                   | -               | 50 µL          | -        | -      |
| Controls                                                                                                                                                                                                                         | -               | -              | 50 µ L   | -      |
| Sample                                                                                                                                                                                                                           | -               | -              | -        | 50 µL  |
| Conjugate                                                                                                                                                                                                                        | -               | 150 µL         | 150 µL   | 150 µL |
| Cover wells with foil supplied in the kit<br><b>Incubate for 1 h at 37°C</b><br>Wash each well three times with 300 µl diluted wash solution<br><b>In case you use an automatic washer, it is advised to do 5 washing steps.</b> |                 |                |          |        |
| TMB Substrate                                                                                                                                                                                                                    | 100 µL          | 100 µL         | 100 µL   | 100 µL |
| <b>Incubate for exactly 15 min at room temperature (22...28°C) in the dark</b>                                                                                                                                                   |                 |                |          |        |
| Stop Solution                                                                                                                                                                                                                    | 100 µL          | 100 µL         | 100 µL   | 100 µL |
| Shake the microplate gently<br>Photometric measurement at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against blank within 5 minutes.                                                                                 |                 |                |          |        |



### NovaTec Immundiagnostica GmbH, part of Gold Standard Diagnostics Europe

Waldstraße 23 A6

63128 Dietzenbach, Germany

Tel.: +49 6074 23698-0

Fax: +49 6074 23698-900

E-Mail: [info@goldstandarddiagnostics.eu](mailto:info@goldstandarddiagnostics.eu)

Website: [www.NovaTec-ID.com](http://www.NovaTec-ID.com)

DSNOV27-Androstenedione S-en,it,es\_20221206\_gr.\_Lot\_5094A