

Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



User's Manual

Androstenedione free in Saliva ELISA

*Enzyme Immunoassay for the quantitative determination of
Androstenedione in saliva.*



DESLV4780



96

**Please use only the valid version of the package insert provided with the kit.
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Arbeitsanleitung.
Si prega di usare la versione valida dell'inserto del pacco a disposizione con il kit.**

Table of Contents / Inhaltsverzeichnis / Tabella die Contenuti

1	INTENDED USE	3
2	PRINCIPLE	3
3	REAGENT, MATERIAL AND INSTRUMENTATION	3
4	WARNINGS	4
5	PRECAUTIONS	4
6	PROCEDURE	5
7	QUALITY CONTROL	6
8	RESULTS	7
9	REFERENCE VALUE	7
10	PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS	7
11	WASTE MANAGEMENT	8
12	BIBLIOGRAPHY	8
13	TROUBLESHOOTING	9
1	VERWENDUNGSZWECK	10
2	TESTPRINZIP	10
3	REAGENZIEEN, MATERIALIEN UND GERÄTEAUSSTATTUNG	10
4	WARNHINWEISE	11
5	VORSICHTSMASSNAHMEN	12
6	TESTDURCHFÜHRUNG	13
7	QUALITÄTSKONTROLLE	15
8	ERGEBNISSE	16
9	REFERENZWERT	16
10	TESTCHARAKTERISTIKA	17
11	ENTSORGUNG	18
12	LITERATUR	18
13	FEHLERBEHEBUNG (TROUBLESHOOTING)	18
	SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS	19

1 INTENDED USE

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

Androstenedione Saliva kit is intended for laboratory use only

1.1 Clinical Significance

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 produces about half of the total androstenedione (about 3 mg/day). After menopause the production of androstenedione decreases by 50%. This is mainly due to the reduction of the 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 PRINCIPLE

Androstenedione (antigen) in the sample competes with the antigenic Androstenedione conjugated with horseradish peroxidase (HRP) for binding onto the limited number of antibodies anti- androstenedione coated on the microplate (solid phase).

After incubation, the bound/free separation is performed by a simple solid-phase washing.

Then, the enzyme HRP in the bound-fraction reacts with the Substrate (H_2O_2) and the TMB Substrate and develops a blue color that changes into yellow when the Stop Solution is added.

The colour intensity is inversely proportional to the Androstenedione concentration of in the sample.

Androstenedione concentration in the sample is calculated through a standard curve.

3 REAGENT, MATERIAL AND INSTRUMENTATION

3.1 Reagent and material supplied in the kit

1. **Androstenedione Standards** S0 – S4 (5 vials, 1 mL each)
2. **Incubation Buffer** (1 vial, 30 mL)
Phosphate buffer pH 7.5 BSA 1 g/L,
3. **Enzyme Conjugate** (1 vial, 1.0 mL)
Androstenedione conjugated with horseradish peroxidase (HRP)
4. **Microtiterwells** (1 microplate breakable)
Anti-androstenedione antibody adsorbed on microplate
5. **Substrate Solution** (1 vial, 15 mL)
 H_2O_2 -TMB 0.26 g/L (avoid any skin contact)
6. **Stop Solution** (1 vial, 15 mL)
Acidic solution 0.3 M (avoid any skin contact)
7. **50X Conc. Wash Solution** (1 vial, 20 mL)
NaCl 45 g/L; Tween20 55 g/L

3.2 Reagents necessary not supplied

Distilled water

3.3 Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser

Microplate reader (450 nm)

Saliva Collection Device

Note

Store all reagents at 2 °C - 8 °C in the dark.

Open the bag of reagent 4 (Coated Microplate) only when it is at room temperature and close immediately after use; once opened, the microplate is stable until the expiry date of kit. Do not remove the adhesive sheets on the unused strips.

4 WARNINGS

- This kit is intended for in vitro use by professional persons only. Not for internal or external use in humans or animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products
- Some reagents contain small amounts of Proclin 300® as preservatives. Avoid the contact with skin or mucosa.
- The TMB Substrate contains an irritant, which may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous and corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H₂O₂ to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.
- This method allows the determination of Androstenedione from 5 pg/mL to 1000 pg/mL.
- The clinical significance of Androstenedione determination can be invalidated if the patient was treated with cortisone or natural or synthetic steroids.

5 PRECAUTIONS

- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol. The performance data represented here were obtained using specific reagents listed in this Instruction For Use.
- All reagents should be stored refrigerated at 2 °C - 8 °C in their original container. Any exceptions are clearly indicated. The reagents are stable until the expiry date when stored and handled as indicated.
- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22 °C - 28 °C) and mix well prior to use.
- Do not interchange kit components from different lots. The expiry date printed on box and vials labels must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- If you use automated equipment the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately tested.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate
- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of the reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipaemic or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

6 PROCEDURE

6.1 Preparation of the Standard

(S0, S1, S2, S3, S4)

Before use, mix for 5 minutes with rotating mixer

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

	S0	S1	S2	S3	S4
pg/mL	0	20	100	400	1000

For samples with Androstenedione concentration greater than 1000 pg/mL dilute the sample (1:2) with S0

Once opened, the standards are stable 6 months at 2 °C – 8 °C.

For SI UNITS: pg/mL x 3.487 = pmol/L

6.2 Preparation of Diluted Conjugate

Prepare immediately before use.

Add 10 µL of Conjugate (reagent 3) to 1.0 mL of Incubation Buffer (reagent 2). Mix gently.

Stable for 3 hours at 22 °C - 28 °C.

6.3 Preparation of 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 °C – 8 °C.

6.4 Specimen

Samples containing sodium azide should not be used in the assay. The saliva samples should be completely colorless. Even the slightest red color shows blood contamination. Such blood contamination will give falsely elevated concentration values. In case of visible blood contamination the patient should discard the sample, rinse the sampling device with tap water, also rinse the mouth with (preferably) cold water, wait for 10 minutes and take a new sample. Do not chew anything during the sampling period. Any pressure on the teeth may result in falsely elevated measurements due to an elevated content of gingival liquid in the saliva sample.

6.5 Specimen Collection

For the correct collection of saliva we are recommending to only use appropriate devices made from ultra-pure polypropylene. Do not use any PE devices or Salivettes for sampling; this in most cases will result in significant interferences. Glass tubes can be used as well, but in this case special attention is necessary for excluding any interference caused by the stopper. Please contact Demeditec Diagnostics for more details.

As food might contain significant amounts of steroid hormones samples preferably should be taken while fasting. If fasting should be a problem at least any food of animal origin (meat or dairy products) should be avoided prior to finalizing the collection. In the morning breakfast should be done only after finalizing the collection procedure. During the day the collection period should be timed just before an anticipated meal. As the steroid hormone secretion in saliva as well in serum shows an obvious dynamic secretion pattern throughout the day it is important to always collect 5 samples during a 2 hour period; this means every 30 minutes one sample. If possible the volume of each single sample should be a minimum of 0.5 ml (better 1 ml). Saliva flow may be stimulated by drinking water. This is allowed and even recommended before and during the collection period. Drinking of water is not allowed during the last 5 minutes before taking the single samples. The typical timing for a morning collection period would be as follows. Wake-up at 6:00 AM, drinking water and brushing teeth, 1st sample at 6:15 AM, followed by samples at 6:45 AM, 7:15 AM, 7:45 AM, and 8:15 AM, followed by breakfast at 8:25 AM. The typical timing for an afternoon collection period would be like: 1st sample at 5:00 PM, followed by samples at 5:30 PM, 6:00 PM, 6:30 PM, 7:00 PM, followed by dinner at 7:10 PM. Modest variation in the collection timing will not be critical, and the collection time-frame can be extended up to 3 hours.

6.6 Specimen Storage and Preparation

Saliva samples in general are stable at ambient temperature for several days. Therefore mailing of such samples by ordinary mail without cooling will not create a problem. Storage at 4°C can be done for a period of up to one week. Whenever possible samples preferable should be kept at a temperature of -20°C. Even repeated thawing and freezing is no problem. Each sample has to be frozen, thawed, and centrifuged at least once anyhow in order to separate the mucins by centrifugation. Upon arrival of the samples in the lab the samples have to stay in the deep freeze at least overnight. Next morning the frozen samples are warmed up to room temperature and mixed carefully. Then the samples have to be centrifuged for 5 to 10 minutes. Now the clear colorless supernatant is easy to pipette. If the sample should show even a slight reddish tinge it should be discarded. Otherwise the concentration value most probably will be falsely elevated. Due to the episodic variations of the steroid secretion we highly recommend the strategy of multiple sampling. If such a set of multiple samples has to be tested the lab (after at least one freezing, thawing, and centrifugation cycle) has to mix the aliquots of the 5 single samples in a separate sampling device and perform the testing from this mixture.

6.7 Procedure

Allow all reagents to reach room temperature (22 °C - 28 °C).

Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2 °C - 8 °C.

To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials

As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the standard curve (S0-S4), two for each sample, one for Blank.

Reagent	Standard	Samples	Blank
Standard S0-S4	50 µL		
Samples		50 µL	
Diluted Conjugate	150 µL	150 µL	
Incubate at +37 °C for 1 hour Remove the contents from each well; wash the wells 3 times with 300 µL of diluted Wash Solution.			
Substrate Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate at room temperature 22 °C - 28 °C for 15 minutes in the dark.			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Shake the microplate gently. Read the absorbance (E) at 450 nm against Blank within 5 minutes.			

7 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.

8 RESULTS

8.1 Mean Absorbance

Calculate the mean of the absorbance (Em) for each point of the standard curve and of each sample.

8.2 Standard Curve

Plot the mean value of absorbance of the standards (Em) (S0 - S4) against concentration. Draw the best-fit curve through the plotted points. (e.g.: Four Parameter Logistic).

8.3 Calculation of Results

Interpolate the values of the samples on the standard curve to obtain the corresponding values of the concentrations expressed in pg/mL.

9 REFERENCE VALUE

As the values of salivary Androstenedione have a circadian pattern we suggest collecting the samples at the same hour (8 A.M.):

The following values can be used as preliminary guideline until each laboratory established its own normal range.

		pg/mL
WOMEN	Normal	20 – 160
	P.C.O.- Hirsute	120 – 300
MEN		20 - 150

Please pay attention to the fact that the determination of a range of expected values for a “normal” population in a given method is dependent on many factors, such as specificity and sensitivity of the method used and type of population under investigation. Therefore each laboratory should consider the range given by the manufacturer as a general indication and produce their own range of expected values based on the indigenous population where the laboratory works.

10 PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

10.1 Precision

10.1.1 Intra Assay Variation

Within run variation was determined by replicate measurements (16x) of two different saliva control in one assay. The within assay variability is $\leq 8.5\%$.

10.1.2 Inter Assay Variation

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

10.2 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.

10.3 Sensitivity

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

10.4 Specificity

The cross reaction of the antibody calculated at 50% according to Abraham are shown in the table:

Androstenedione Saliva	100 %
Testosterone	1.2 %
Epitestosterone	0.2 %
5 α -dihydrotestosterone	0.1 %
DHEA	0.1 %
Progesterone	1x10 ⁻³ %
Estrone	1x10 ⁻³ %
Cortisol	1x10 ⁻³ %

10.5 Correlation

The Androstenedione saliva ELISA kit (DESLV4780) 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 Elisa kit (DESLV4780)

x = Salivary Androstenedione Salimetrics Elisa kit

11 WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

12 BIBLIOGRAPHY

1. Judd H. and Yen S. J. Clin. Endoc.& Metab.,36 475 (1973)
2. Abraham G. J. Clin.Endoc. &M.39, 340 (1974)
3. Hillier S.G. 79th Year book Medical Publishers Inc: Chicago. (1985)
4. Venturoli S. et al Fertility and Sterility, 48(1), 78 (1987)
5. Venturoli S. et al Hormone Res., 24, 269 (1986)
6. D. Riad et al Endocr. Reviews, 3 (4) 304 367 (1982)

13 TROUBLESHOOTING

POSSIBLE ERROR CAUSES / SUGGESTIONS

No colorimetric reaction

- no conjugate pipetted reaction after addition
- contamination of conjugates and/or of substrate
- errors in performing the assay procedure (e.g. accidental pipetting of reagents in a wrong sequence or from the wrong vial, etc.)

Too low reaction (too low ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too short, incubation temperature too low

Too high reaction (too high ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too long, incubation temperature too high
- water quality for wash buffer insufficient (low grade of deionization)
- insufficient washing (conjugates not properly removed)

Unexplainable outliers

- contamination of pipettes, tips or containers
- insufficient washing (conjugates not properly removed)

Too high within run (CV%)

- reagents and/or strips not pre-warmed to room temperature prior to use
- plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)

Too high between-run (CV%)

- incubation conditions not constant (time, temperature)
- controls and samples not dispensed at the same time (with the same intervals) (check pipetting order)
- person-related variation

1 VERWENDUNGSZWECK

Kompetitives immunenzymatisches kolorimetrisches Verfahren zur quantitativen Bestimmung der Androstendion-Konzentration im Speichel.

Der Androstenedione Saliva ELISA ist nur für den Laborgebrauch.

1.1 Klinische Bedeutung

Androstendion (oder $\Delta 4$ -Androstendion) ist ein Steroidhormon, das in den Nebennieren und den Keimdrüsen als Zwischenprodukt bei der Biosynthese des Androgens Testosteron und der Östrogene Östron und Östradiol gebildet wird. Es ist ein Vorläufer der männlichen und weiblichen Geschlechtshormone. Ein Teil des Androstendions wird ins Plasma sezerniert und kann in peripheren Geweben in Testosteron und Östrogene umgewandelt werden.

Androstendion besitzt eine relativ schwache androgene Aktivität, die auf etwa 20 % von der des Testosterons geschätzt wird. Die Sekretions- und Produktionsrate übersteigt auch die von Testosteron bei Frauen, bei denen eine deutliche Umwandlung außerhalb der Nebennieren von Androstendion in Testosteron erfolgt.

Bei Frauen vor der Menopause bilden die Nebennieren und Eierstöcke jeweils etwa die Hälfte der Gesamtmenge an Androstendion (ungefähr 3 mg/Tag). Nach der Menopause nimmt die Androstendionproduktion ungefähr um 50 % ab. Dies ist vor allem auf den Rückgang der Steroidsekretion durch die Eierstöcke zurückzuführen. Trotzdem ist Androstendion das wichtigste Steroid, das die Eierstöcke nach der Menopause produzieren.

Wegen der hohen Korrelation der Konzentrationen von Androstendion im Serum und im Speichel können individuelle Unterschiede im Androstendion-Serumspiegel genau eingeschätzt werden, wenn Speichel als nicht-invasive Art der Probenentnahme verwendet wird.

2 TESTPRINZIP

Das Androstendion (Antigen) in der Probe konkurriert mit an Meerrettich-Peroxidase (HRP) gebundenem Androstendion-Antigen um die Anlagerung an eine begrenzte Anzahl von Anti-Androstendion-Antikörpern auf der Mikrotiterplatte (feste Phase).

Nach der Inkubation werden gebundenes und freies Antigen durch einfach durchzuführendes Waschen der festen Phase getrennt.

Dann reagiert das Enzym HRP in der gebundenen Fraktion mit dem Substrat (H_2O_2) und dem TMB-Substrat und entwickelt eine blaue Färbung, die sich nach gelb verändert, wenn die Stopplösung (H_2SO_4) hinzugefügt wird.

Die Intensität der Färbung ist umgekehrt proportional zur Androstendion-Konzentration in der Probe.

Die Androstendionkonzentration in der Probe wird mit einer Standardkurve berechnet.

3 REAGENZIEN, MATERIALIEN UND GERÄTEAUSSTATTUNG

3.1 Im Kit enthaltene Reagenzien und Materialien

1. **Androstenedione Standards** (Androstendion-Standards) S0 – S4 (5 Fläschchen, je 1 mL)
2. **Incubation Buffer** (Inkubationspuffer) (1 Flasche, 30 mL);
Phosphatpuffer pH 7,5, BSA 1 g/L,
3. **Enzyme Conjugate** (Konjugat) (1 Fläschchen, 1,0 mL);
Androstendion-HRP-Konjugat
4. **Microtiterwells** (Beschichtete Mikrotiterplatte) (brechbar);
Anti-Androstendion-IgG an die Mikrotiterplatte gebunden
5. **Substrate Solution** (Substratlösung) (1 Fläschchen, 15 mL);
 H_2O_2 -TMB 0,26 g/L (Hautkontakt vermeiden)
6. **Stop Solution** (Stopplösung) (1 Fläschchen, 15 mL);
Saure Lösung 0,3 M (Hautkontakt vermeiden)
7. 50X Conc. **Wash Solution** (Waschlösung, Konzentrat) (1 Fläschchen, 20 mL)
NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L

3.2 Nicht im Kit enthaltene erforderliche Reagenzien

Destilliertes Wasser

3.3 Erforderliche Hilfsmittel und Geräteausstattung

Pipettierautomat

Mikrotiterplatten-Lesegerät (450 nm)

Speichelsammelvorrichtung

Wichtige Hinweise

Alle Kit-Reagenzien bei 2 °C - 8 °C im Dunkeln lagern.

Den Beutel mit Reagenz 4 (Beschichtete Mikrotiterplatte) erst öffnen, wenn er Raumtemperatur angenommen hat, und sofort nach Gebrauch wieder verschließen.

Geöffnet ist die Mikrotiterplatte bis zum Ablauf des Verfalldatums des Kits haltbar. Klebestreifen auf unbenutzten Streifen nicht entfernen.

4 WARNHINWEISE

- Dieses Testkit ist nur für In-vitro-Diagnostik zur Anwendung durch Fachpersonal bestimmt. Nicht zur inneren oder äußeren Anwendung bei Mensch oder Tier geeignet.
- Beim Arbeiten mit den enthaltenen Reagenzien geeignete persönliche Schutzausrüstung verwenden.
- Beim Arbeiten mit Blutprodukten die GLP- („Good laboratory practice“) Richtlinien befolgen.
- Manche Reagenzien enthalten kleine Mengen an Proclin 300® als Konservierungsmittel. Kontakt mit der Haut oder Schleimhaut vermeiden.
- Das TMB-Substrat enthält eine reizende Substanz, die beim Einatmen, Verschlucken oder der Aufnahme über die Haut gesundheitsschädlich sein kann. Um eine Schädigung zu verhindern, Einatmen, Verschlucken oder Kontakt mit der Haut oder den Augen vermeiden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure. Schwefelsäure ist giftig und ätzend und kann bei Einnahme toxisch sein. Um Verätzungen zu verhindern, Kontakt mit der Haut oder den Augen vermeiden.
- Reagenz TMB/H₂O₂ keinem direkten Sonnenlicht, Metallen oder Oxidationsmitteln aussetzen. Die Lösung nicht einfrieren.
- Mit diesem Verfahren können Androstendion-Konzentrationen von 5 pg/mL bis 1000 pg/mL bestimmt werden.
- Die Androstendion-Bestimmung hat möglicherweise keine klinische Aussagekraft, wenn der Patient mit Kortison oder natürlichen bzw. synthetischen Steroiden behandelt wurde.

5 VORSICHTSMASSNAHMEN

- Die Reihenfolge der Pipettierschritte muss genau wie in dieser Anleitung angegeben eingehalten werden. Die hier dargestellten Daten zur Performance wurden unter Verwendung der in dieser Gebrauchsanweisung genannten spezifischen Reagenzien ermittelt.
- Alle Reagenzien im Originalbehälter kühl bei 2 °C - 8 °C lagern. Ausnahmen werden deutlich gekennzeichnet. Bei sachgemäßer Lagerung und Verwendung sind die Reagenzien bis zum Verfalldatum haltbar.
- Vor der Verwendung müssen alle Testkit-Komponenten und Proben Raumtemperatur (22 °C - 28 °C) annehmen und gut gemischt werden.
- Die Testkit-Komponenten zwischen unterschiedlichen Chargen nicht austauschen. Das auf dem Karton und den Fläschchen aufgedruckte Verfalldatum muss eingehalten werden. Die Testkit-Komponenten nach Ablauf ihres Verfalldatums nicht mehr verwenden.
- Wenn Sie automatische Geräte verwenden, unterliegt es Ihrer Verantwortung zu überprüfen, ob die Tests mit dem Kit ordnungsgemäß durchgeführt wurden.
- Unvollständige oder ungenaue Entfernung der Flüssigkeit aus den Vertiefungen kann die Testpräzision beeinträchtigen und/oder den Hintergrund verstärken.
- Die Reaktionszeit muss für alle Vertiefungen konstant gehalten werden, damit die Ergebnisse reproduzierbar sind. Das Pipettieren der Proben sollte nicht länger als 10 Minuten dauern, um Testabweichungen zu vermeiden. Falls mehr als 10 Minuten benötigt werden, muss die Reihenfolge des Pipettierens eingehalten werden. Bei Verwendung von mehreren Platten wird empfohlen, die Dosis-Wirkungs-Kurve für jede Platte zu wiederholen.
- Durch die Zugabe der TMB-Substratlösung wird eine kinetische Reaktion gestartet, die durch das Hinzufügen der Stopplösung beendet wird. Deshalb müssen die TMB-Substrat- und die Stopplösung jeweils in derselben Reihenfolge pipettiert werden, um Zeitabweichungen während der Reaktion zu vermeiden.
- Die Richtlinien zur Qualitätskontrolle im medizinischen Labor müssen befolgt werden, indem Kontrollen und/oder vereinigte Serumproben mit untersucht werden.
- Beim Lösen und Pipettieren der Reagenzien ist größte Genauigkeit erforderlich.
- Mikrobiell kontaminierte, stark lipämische oder hämolysierte Proben nicht im Test verwenden.
- Mikrotiterplatten-Lesegeräte lesen vertikal ab. Nicht die Unterseite der Vertiefungen berühren.

6 TESTDURCHFÜHRUNG

6.1 Vorbereitung der Standards

(S0, S1, S2, S3, S4)

Vor der Verwendung 5 min mit einem rotierenden Schüttelgerät mischen.

Die Standards sind gebrauchsfertig und haben die folgenden Androstendion-Konzentrationen:

	S0	S1	S2	S3	S4
pg/mL	0	20	100	400	1000

Proben mit zu erwartenden Konzentrationen > 1000 pg/mL sollten mit S0 weiter verdünnt werden (1:2)

Nach dem Öffnen sind die Standards bei 2 °C – 8 °C sechs Monate haltbar.

Umrechnung in SI-Einheiten: pg/mL x 3,487 = pmol/L

6.2 Herstellung des verdünnten Konjugats

Erst direkt vor der Verwendung herstellen.

10 µL Konjugat (Reagenz 3) zu 1,0 mL Inkubationspuffer (Reagenz 2) hinzufügen. Vorsichtig mischen.

3 Stunden bei 22 °C – 28 °C haltbar.

6.3 Herstellung der Waschlösung

Der Inhalt jeder Flasche der gepufferten konzentrierten Waschlösung (50x) muss vor der Verwendung mit destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 1000 ml aufgefüllt werden.

Bei kleineren Volumina entsprechend im Verhältnis 1:50 verdünnen.

Die verdünnte Waschlösung ist 30 Tage bei 2 °C – 8 °C haltbar.

6.4 PROBENVORBEREITUNG

Proben, die Natriumazid enthalten, sollten nicht verwendet werden. Die Proben sollten vollkommen farblos sein. Selbst die geringste Rotfärbung weist eine unzulässige Kontamination mit Blut hin. Jegliche Rotfärbung wird bei dieser Bestimmungsmethode zu einem erhöhten Messwert führen. Bereits die geringste rötliche Färbung sollte Anlass dafür sein, dass die Probe verworfen wird. In diesem Fall sollte das Gefäß kurz mit Wasser ausgespült werden. Auch den Mund kurz mit möglichst kaltem Wasser ausspülen, 10 Minuten warten und dann eine neue Probe entnehmen. Während der Sammelperiode darf nichts gekaut werden. Jeder erhöhte Druck auf die Zähne kann zu unerwünschten Einschwemmungen von (unsichtbaren) Blutbestandteilen und damit erhöhten Messwerten führen.

6.5 Probenentnahme

Für die korrekte Speichelsammlung empfehlen wir geeignete Sammelgefäße aus ultra reinem Polypropylen zu verwenden. Salivetten oder andere PE enthaltende Behältnisse sind zum Sammeln von Speichelproben für diesen Test ungeeignet. Glasgefäße sind ebenfalls geeignet; hier muss allerdings darauf geachtet werden, dass der verwendete Stopfen keine Interferenzen zeigt, was bei den häufig verwendeten PE-Stopfen aber zu erwarten ist.

Da die Sekretion der Steroidhormone eine ausgeprägte episodische Dynamik zeigt, ist es erforderlich eine Sammelstrategie anzuwenden, die Zufallsergebnisse vermeidet. Wir empfehlen daher, stets mehrfach Proben zu sammeln. Und zwar sollte man sich dazu einen Zeitraum von 2 Stunden im Laufe eines Tages aussuchen, in dem dann 5 Proben im Abstand von jeweils 30 Minuten genommen werden können. Vor und während dieser Sammelperiode darf keine Nahrung (fest oder flüssig) aufgenommen werden. Wenn ein Fasten vor der Sammelperiode zu schwierig sein sollte, darf in begrenzten Mengen voll vegetarische Nahrung gegessen werden. Milch- und Fleischprodukte sind aber in jedem Fall zu vermeiden. Das Trinken von Wasser ist jederzeit erlaubt und sogar empfohlen, um den Speichelfluss anzuregen. Das Wassertrinken ist in den letzten 5 Minuten vor dem eigentlichen Speichelsammeln zu unterlassen. Die Sammelperiode sollte möglichst in einer 2-Stunden-Periode vor einer geplanten Mahlzeit gelegt werden.

Eine typische Sammelperiode am Morgen sieht ungefähr wie folgt aus: Aufstehen um 6:00 Uhr, Wasser trinken und Zähne putzen, die erste Speichelprobe wird dann um 6:15 Uhr gesammelt. Die nachfolgenden Proben werden gesammelt um 6:45 Uhr, 7:15 Uhr, 7:45 Uhr, und 8:15 Uhr. Danach kann dann ganz normal gefrühstückt werden. Die angegebenen Zeiten sind möglichst auf +/- 10 Minuten einzuhalten. Beim Verwerfen einer rötlich gefärbten Probe (und der nachfolgenden neuen Probennahme) darf vom vorgegebenen Zeitrahmen auch noch weiter abgewichen werden. Die Sammelperiode kann im Bedarfsfall aber auch ausgedehnt werden bis auf 3 Stunden. Eine typische Sammelperiode am späten Nachmittag sieht dann wie folgt aus: 17:00, 17:30 Uhr, 18:00 Uhr; 18:30: 19:00 Uhr. Danach kann dann das Abendessen eingenommen werden.

6.6 Probenaufbewahrung

Die Proben können falls erforderlich mehrere Tage bei Raumtemperatur aufbewahrt werden. Daher kann man diese Proben auch problemlos und ohne Kühlung per Post versenden. Eine Aufbewahrung bei 4°C ist aber vorzuziehen und kann bis zu einer Woche lang vorgenommen werden. Wenn immer möglich sollte man aber die Proben sicherheitshalber bei -20°C aufbewahren, wobei mehrfache Gefrier- und Auftauzyklen unbedenklich sind. In jedem Falle muss jede Speichelprobe ohnehin zumindest einmal einen Gefrier- und Auftauzyklus durchlaufen, um die Mucine durch Zentrifugation entfernen zu können. Daher sollten die Speichelproben nach der Ankunft im Labor erst einmal eingefroren werden. Zur eigentlichen Messung der Hormonkonzentration werden dann alle Speichelproben wieder aufgetaut und 5 bis 10 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand sollte nun klar und farblos sein. Schon bei der leichtesten Rotfärbung sollte die Probe verworfen und eine neue Probe angefordert werden. Auch nur leicht rötlich gefärbte Proben zeigen immer zu hohe Konzentrationswerte. Wegen der episodischen Sekretionsmuster sollten in der Routine immer Mehrfachproben eingesetzt werden (siehe oben). Die 5 zu einer Abnahmeserie gehörenden Proben werden wie oben beschrieben vorbereitet. Sodann werden Aliquots aus jeder Einzelprobe in einem separaten Probengefäß gemischt. Aus dieser Mischung wird dann die eigentliche Messung vorgenommen.

6.7 Test-Verfahrensweise

Alle Reagenzien müssen Raumtemperatur annehmen (22 °C - 28 °C).

Nicht verwendete beschichtete Mikrotiter-Streifen müssen wieder zusammen mit dem beigefügten Trockenmittel in den Folienbeutel zurückgelegt werden, der Beutel muss fest verschlossen und bei 2 °C - 8 °C gelagert werden.

Damit keine mikrobielle oder chemische Kontamination auftreten kann, nicht verwendete Chemikalien nicht wieder in das Originalfläschchen zurückfüllen.

Da der Test zur Erhöhung der Genauigkeit der Testergebnisse als Doppelbestimmung durchgeführt wird, für jeden Punkt der Standardkurve (S0-S4) zwei Vertiefungen, für jede Probe ebenfalls zwei Vertiefungen und für den Nullwert eine Vertiefung vorbereiten.

Reagenz	Standard	Proben	Nullwert
Standard S0-S4	50 µL		
Proben		50 µL	
Verdünntes Konjugat	150 µL	150 µL	
<i>1 Stunde bei +37 °C inkubieren.</i> Inhalt der Vertiefungen entfernen. Vertiefungen mit 3-mal mit 300 µL Waschlösung waschen.			
TMB-Substrat	100 µL	100 µL	100 µL
<i>15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur (22 °C -28 °C) inkubieren.</i>			
Stopplösung	100 µL	100 µL	100 µL
Mikrotiterplatte vorsichtig schütteln. Die Absorption (E) bei 450 nm innerhalb von 5 Minuten gegen den Nullwert messen.			

7 QUALITÄTSKONTROLLE

Jedes Labor sollte zur Überprüfung der Test-Performance Kontrollen mit normalen, hohen und niedrigen Androstendion-Spiegeln testen. Diese Kontrollen sollten wie unbekannte Proben behandelt und die Werte in jedem durchgeführten Testlauf bestimmt werden. Die Aufzeichnungen der Qualitätskontrolle sollten aufbewahrt werden, um die Performance der Kit-Reagenzien verfolgen zu können. Angemessene statistische Methoden sollten zur Ermittlung von Trends angewendet werden. Jedes Labor sollte Grenzwerte für eine ausreichende Test-Performance festlegen. Die Achsenabschnitte der Standardkurve bei 80 %, 50 % und 20 % sollten zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit zwischen den verschiedenen Durchläufen als weitere Parameter ebenfalls überwacht werden. Außerdem sollte die maximale Absorption mit den bisher gesammelten Werten übereinstimmen. Treten deutliche Abweichungen gegenüber der bisherigen Performance auf, so kann das auf unbemerkte Änderungen der Testbedingungen oder verdorbene Kit-Reagenzien hinweisen. Um die Ursache der Abweichungen zu ermitteln, sollten frische Reagenzien verwendet werden.

8 ERGEBNISSE

8.1 Mittlere Absorption

Für jeden Punkt auf der Standardkurve und für jede Probe jeweils die mittlere Absorption (Em) berechnen.

8.2 Standardkurve

Die mittlere Absorption der Standards (Em) gegen die Konzentration (S0 - S4) auftragen. Dann eine Ausgleichskurve durch die aufgetragenen Punkte zeichnen (z. B.: 4-Parameter-Funktion).

8.3 Ermittlung der Ergebnisse

Mit den Werten für die Proben die entsprechenden Werte für die Konzentration in pg/mL aus der Standardkurve ablesen.

9 REFERENZWERT

Da sich die Konzentrationen von Androstendion im Speichel im Tagesverlauf verändern (circadiane Schwankungen), wird empfohlen, die Proben immer zu derselben Uhrzeit zu sammeln (8 Uhr morgens):

Die folgenden Werte können als vorläufige Richtlinie verwendet werden, bis das Labor jeweils seinen eigenen Wertebereich etabliert hat.

		pg/mL
FRAUEN	Normal	20 – 160
	PCO-Hirsutismus	120 – 300
MÄNNER		20 - 150

Bitte beachten, dass die Ermittlung des zu erwartenden Wertebereichs für eine „normale“ Population mit einer bestimmten Methode von vielen Faktoren, wie der Spezifität und Sensitivität der verwendeten Methode und der Zusammensetzung der untersuchten Population, abhängt. Deshalb sollten die Labors den vom Hersteller etablierten Wertebereich nur als allgemeine Orientierung verwenden und jeweils einen eigenen zu erwartenden Wertebereich mit der Bevölkerung im Einzugsbereich des Labors erstellen.

10 TESTCHARAKTERISTIKA

10.1 Präzision

10.1.1 Intra-Assay-Präzision

Die Abweichung innerhalb eines Testlaufs wurde durch die wiederholte Bestimmung (16x) von zwei verschiedenen Kontroll-Speichelproben in einem Testdurchlauf ermittelt.

Die Intra-Assay-Variabilität beträgt $\leq 8,5\%$.

10.1.2 Inter-Assay-Präzision

Die Abweichung zwischen verschiedenen Testläufen wurde durch die wiederholte Bestimmung (10x) von zwei verschiedenen Kontroll-Speichelproben mit verschiedenen Testkit-Chargen ermittelt.

Die Inter-Assay-Variabilität beträgt $\leq 11\%$.

10.2 Genauigkeit

Die Untersuchung der Wiederfindung von 50, 100 und 500 pg/mL zu den Proben hinzugefügtem Androstendion ergab einen Durchschnittswert (\pm SD) von $102,60\% \pm 13,23\%$ bezogen auf die ursprüngliche Konzentration.

10.3 Sensitivität

Die niedrigste nachweisbare Androstendion-Konzentration, die sich vom Nullstandard signifikant unterscheidet, beträgt 5 pg/mL (Konfidenzintervall 95%).

10.4 Spezifität

Die folgende Tabelle zeigt die nach Abraham mit 50 % berechnete Kreuzreaktion des Antikörpers:

Androstenedione Saliva	100 %
Testosteron	1,2 %
Epitestosteron	0,2 %
5 α -Dihydrotestosteron	0,1 %
DHEA	0,1 %
Progesteron	1×10^{-3} %
Östron	1×10^{-3} %
Cortisol	1×10^{-3} %

10.5 Korrelation

Das Androstenedione Saliva ELISA Testkit (DESLV4780) wurde mit einem anderen kommerziell erhältlichen Androstendion-Speicheltest verglichen. In beiden Testsystemen wurden entsprechend 38 Speichelproben analysiert. Die lineare Regressionskurve wurde berechnet:

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

$$r^2 = 0,983$$

y = Androstenedione Saliva Elisa Testkit (DESLV4780)

x = Salivary Androstenedione Salimetrics Elisa Testkit

11 ENTSORGUNG

Bei der Entsorgung der Reagenzien sind die örtlichen Vorschriften zu beachten.

12 LITERATUR

1. Judd H. and Yen S. J. Clin. Endoc. & Metab., 36 475 (1973)
2. Abraham G. J. Clin. Endoc. & M. 39, 340 (1974)
3. Hillier S.G. 79th Year book Medical Publishers Inc: Chicago. (1985)
4. Venturoli S. et al Fertility and Sterility, 48(1), 78 (1987)
5. Venturoli S. et al Hormone Res., 24, 269 (1986)
6. D. Riad et al Endocr. Reviews, 3 (4) 304 367 (1982)

13 FEHLERBEHEBUNG (TROUBLESHOOTING)

MÖGLICHE FEHLERQUELLEN/ LÖSUNGEN

Keine kolorimetrische Reaktion

- kein Konjugat pipettiert (Reaktion erfolgt nach Zugabe)
- Kontamination des Konjugats und / oder Substrats
- Fehler bei der Durchführung des Testverfahrens (z. B. versehentliches Pipettieren der Reagenzien in der falschen Reihenfolge oder aus einem falschen Fläschchen etc.)

Zu geringe Reaktion (OD-Werte zu niedrig)

- falsches Konjugat (z. B. nicht aus dem Original-Testkit stammend)
- Inkubationszeit zu kurz, Inkubationstemperatur zu niedrig

Zu starke Reaktion (OD-Werte zu hoch)

- falsches Konjugat (z. B. nicht aus dem Original-Testkit stammend)
- Inkubationszeit zu lang, Inkubationstemperatur zu hoch
- Wasserqualität für den Waschpuffer nicht ausreichend (geringe Wasserqualität oder entionisiertes Wasser)
- unzureichendes Waschen (Konjugat nicht ordnungsgemäß entfernt)

Unerklärliche Ausreißer

- Kontamination der Pipetten, Spitzen oder Behälter
- unzureichendes Waschen (Konjugat nicht ordnungsgemäß entfernt)










Zu hoher VK innerhalb des Laufs

- Reagenzien und / oder Streifen vor Gebrauch nicht auf Raumtemperatur aufgewärmt
- Mikrotiterplatten-Waschgerät wäscht nicht ordnungsgemäß (Vorschlag: Waschkopf reinigen)

Zu hoher VK zwischen verschiedenen Läufen

- Inkubationsbedingungen nicht konstant (Zeit, Temperatur)
- Kontrollen und Proben nicht zur selben Zeit pipettiert (mit denselben Intervallen) (Pipettierreihenfolge überprüfen)
- personenabhängige Abweichungen

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Français	Español	Italiano
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las instrucciones de uso	Consultare le istruzioni per l'uso
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conformité aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostic in vitro	Para uso Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Numéro de catalogue	Número de catálogo	Numero di Catalogo
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	Numéro de lot	Número de lote	Numero di lotto
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
Distributed by	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore
Content	Content	Inhalt	Conditionnement	Contenido	Contenuto
Volume/No.	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantité	Volumen/Número	Volume/Quantità