

Instructions for use

Androstenedione Saliva ELISA Free

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit

REF

SA E-6700



IVD

CE

1. INTENDED USE

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

Androstenedione Saliva ELISA 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 $\sim 20\%$ 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 (H_2SO_4) 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**

Standards and Controls - ready to use

Cat. no.	Component	Standard	Concentration	Volume / Vial
SA E-6701	STANDARD A	Standard A	0 pg/ml	1 ml
SA E-6702	STANDARD B	Standard B	20 pg/ml	1 ml
SA E-6703	STANDARD C	Standard C	100 pg/ml	1 ml
SA E-6704	STANDARD D	Standard D	400 pg/ml	1 ml
SA E-6705	STANDARD E	Standard E	1000 pg/ml	1 ml
SA E-6751	CONTROL 1	Control A		1 ml
SA E-6752	CONTROL 2	Control B		1 ml

SA E-6713 INC-BUFF Incubation Buffer - ready to use

Contents: Phosphate buffer pH 7.5 BSA 1 g/l

Volume: 1 x 30 ml

SA E-6740 CONJUGATE-CONC Enzyme Conjugate - concentrated

Contents: Androstenedione conjugated with horseradish peroxidase (HRP)

Volume: 1 x 1 ml

SA E-6731 96 Microtiterwells

Contents: (1 microplate breakable); Anti-androstenedione antibody adsorbed on microplate

MS E-0055 **SUBSTRATE** **Substrate Solution** - ready to use
Contents: H₂O₂-TMB 0.26 g/l (avoid any skin contact)
Volume: 1 x 15 ml

MS E-0080 **STOP-SOLN** **Stop Solution** - ready to use
Contents: Sulphuric acid 0.15 mol/l (avoid any skin contact)
Volume: 1 x 15 ml

Hazards
identification: 

H290 May be corrosive to metals.
H314 Causes severe skin burns and eye damage.

SA E-0030 **WASH-CONC 50x** **Wash Solution** - 50x concentrated
Contents: NaCl 45 g/l; Tween20 55 g/l
Volume: 1 x 20 ml

3.2 Reagents necessary not supplied

Distilled water

3.3 Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser
Microplate reader (450 nm, 620-630 nm)
Saliva Collection Device

Note

Store all reagents at 2 °C - 8 °C in the dark.
Open the bag of reagent 5 (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**

1. This kit is intended for in vitro use by professional persons only. Not for internal or external use in humans or animals.
2. Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
3. Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products
4. Some reagents contain small amounts of Proclin 300 as preservatives. Avoid the contact with skin or mucosa.
5. 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.
6. 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.
7. Avoid the exposure of reagent TMB/H₂O₂ to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.
8. This method allows the determination of Androstenedione from 5 pg/ml to 1000 pg/ml.
9. The clinical significance of Androstenedione determination can be invalidated if the patient was treated with cortisone or natural or synthetic steroids.

5. **PRECAUTIONS**

1. 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.
2. 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.
3. Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22 °C - 28 °C) and mix well prior to use.
4. 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.
5. If you use automated equipment the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately tested.

6. The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background.
7. To improve the performance of the kit on automatic systems is recommended to increase the number of washes.
8. 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
9. 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.
10. Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
11. Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of the reagents.
12. Samples microbiologically contaminated, highly lipaemic or haemolysed should not be used in the assay.
13. Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

6. PROCEDURE

6.1 Preparation of the Standard

(Standard A, Standard B, Standard C, Standard D, Standard E)

Before use, mix for 5 minutes with rotating mixer

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

	Std A	Std B	Std C	Std D	Std E
pg/ml	0	20	100	400	1000

For samples with Androstenedione concentration greater than 1000 pg/ml dilute the sample (1:2) with Standard A.

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 to 1.0 ml of Incubation Buffer. 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 Preparation of the Sample

This kit allows the determination of Androstenedione concentration in saliva samples.

It is recommended to collect saliva samples with a centrifuge glass tube and a plastic straw, or Sali Set (catalogue no. SA D-6100, 100 pieces).

Other commercially available sample collectors have not been tested.

The controls are ready to use.

6.4.1 Method and Limitations

Collect saliva samples at the times indicated.

If no specific instructions have been given, saliva samples may be collected at any time, paying attention to the following indications:

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

6.4.2 Saliva Processing Instructions

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

6.5 Procedure

Allow all reagents to reach room temperature (22 °C - 28 °C). At the end of the assay, store immediately the reagents at 2 °C - 8 °C; avoid long exposure to room temperature.

Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2 °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 (Standard A-E), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Standard	Sample/Control	Blank
Standard A-E	50 µl		
Sample/Control		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. 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: if you use automated equipment, wash the wells at least 5 times.			
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 a reference wavelength of 620-630 nm or against Blank within 5 minutes.			

7. QUALITY CONTROL

Each laboratory should assay controls at normal, high and low levels range of 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) (Standard A-E) 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 A 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	100 %
Testosterone	1.2 %
Epitestosterone	0.2 %
5 α -dihydrotestosterone	0.1 %
DHEA	0.1 %
Progesterone	1×10^{-3} %
Estrone	1×10^{-3} %
Cortisol	1×10^{-3} %

10.5 Correlation

The 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 Elisa kit

x = Salimetrics Salivary Androstenedione 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

Symbols:

	Storage temperature		Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Expiry date	LOT	Batch code	IVD	For in-vitro diagnostic use only!
	Consult instructions for use	CONT	Content	CE	CE labelled
	Caution	REF	Catalogue number		

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**

Standards und Controls - gebrauchsfertig

Cat. no.	Komponente	Standard	Konzentration	Volumen / Flasche
SA E-6701	STANDARD A	Standard A	0 pg/ml	1 ml
SA E-6702	STANDARD B	Standard B	20 pg/ml	1 ml
SA E-6703	STANDARD C	Standard C	100 pg/ml	1 ml
SA E-6704	STANDARD D	Standard D	400 pg/ml	1 ml
SA E-6705	STANDARD E	Standard E	1000 pg/ml	1 ml
SA E-6751	CONTROL 1	Kontrolle 1		1 ml
SA E-6752	CONTROL 2	Kontrolle 2		1 ml

SA E-6713 INC-BUFF Incubation Buffer (Inkubationspuffer) - gebrauchsfertig

Inhalt: Phosphatpuffer pH 7,5, BSA 1 g/l

Volumen: 1 x 30 ml

SA E-6740 CONJUGATE-CONC Enzyme Conjugate (Konjugat) - konzentriert

Inhalt: Androstendion-HRP-Konjugat

Volumen: 1 x 1 ml

SA E-6731	 96	Microtiterwells (Beschichtete Mikrotiterplatte)
Inhalt:	(brechbar); Anti-Androstendion-IgG an die Mikrotiterplatte gebunden	
MS E-0055	 SUBSTRATE	Substrate Solution (Substratlösung) - gebrauchsfertig
Inhalt:	H ₂ O ₂ -TMB 0.26 g/L (Hautkontakt vermeiden)	
Volumen:	1 x 15 ml	
MS E-0080	 STOP-SOLN	Stop Solution (Stopplösung) - gebrauchsfertig
Inhalt:	Schwefelsäure 0,15 mol/L (Hautkontakt vermeiden)	
Volumen:	1 x 15 ml	
Mögliche Gefahren:		
	H290 Kann gegenüber Metallen korrosiv sein. H314 Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden	
SA E-0030	 WASH-CONC  50x	Wash Solution (Waschlösung) - 50x konzentriert
Inhalt:	NaCl 45 g/l; Tween20 55 g/l	
Volumen:	1 x 20 ml	

3.2 Nicht im Kit enthaltene erforderliche Reagenzien

Destilliertes Wasser

3.3 Erforderliche Hilfsmittel und Geräteausstattung

Pipettierautomat
Mikrotiterplatten-Lesegerät (450 nm, 620-630 nm)
Speichelsammelvorrichtung

Wichtige Hinweise

Alle Kit-Reagenzien bei 2 °C - 8 °C im Dunkeln lagern.
Den Beutel der beschichteten 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

1. Dieses Testkit ist nur für In-vitro-Diagnostik zur Anwendung durch Fachpersonal bestimmt. Nicht zur inneren oder äußeren Anwendung bei Mensch oder Tier geeignet.
2. Beim Arbeiten mit den enthaltenen Reagenzien geeignete persönliche Schutzausrüstung verwenden.
3. Beim Arbeiten mit Blutprodukten die GLP-(„Good laboratory practice“) Richtlinien befolgen.
4. Manche Reagenzien enthalten kleine Mengen an Proclin 300 als Konservierungsmittel. Kontakt mit der Haut oder Schleimhaut vermeiden.
5. 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.
6. 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.
7. Reagenz TMB/H₂O₂ keinem direkten Sonnenlicht, Metallen oder Oxidationsmitteln aussetzen. Die Lösung nicht einfrieren.
8. Mit diesem Verfahren können Androstendion-Konzentrationen von 5 pg/ml bis 1000 pg/ml bestimmt werden.
9. Die Androstendion-Bestimmung hat möglicherweise keine klinische Aussagekraft, wenn der Patient mit Kortison oder natürlichen bzw. synthetischen Steroiden behandelt wurde.

5. VORSICHTSMASSNAHMEN

1. 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.
2. 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.
3. Vor der Verwendung müssen alle Testkit-Komponenten und Proben Raumtemperatur (22 °C - 28 °C) annehmen und gut gemischt werden.
4. 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.
5. Wenn Sie automatische Geräte verwenden, unterliegt es Ihrer Verantwortung zu überprüfen, ob die Tests mit dem Kit ordnungsgemäß durchgeführt wurden.
6. Unvollständige oder ungenaue Entfernung der Flüssigkeit aus den Vertiefungen kann die Testpräzision beeinträchtigen und/oder den Hintergrund verstärken.
7. Bei Verwendung von automatischen Systemen wird empfohlen die Anzahl der Waschschrte zu erhöhen, um die Test-Performance zu verbessern.
8. 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.
9. 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.
10. Die Richtlinien zur Qualitätskontrolle im medizinischen Labor müssen befolgt werden, indem Kontrollen und/oder vereinigte Serumproben mit untersucht werden.
11. Beim Lösen und Pipettieren der Reagenzien ist größte Genauigkeit erforderlich.
12. Mikrobiell kontaminierte, stark lipämische oder hämolysierte Proben nicht im Test verwenden.
13. Mikrotiterplatten-Lesegeräte lesen vertikal ab. Nicht die Unterseite der Vertiefungen berühren.

6. TESTDURCHFÜHRUNG

6.1 Vorbereitung der Standards

(Standard A, Standard B, Standard C, Standard D, Standard E)

Vor der Verwendung 5 min mit einem rotierenden Schüttelgerät mischen.

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

	Std A	Std B	Std C	Std D	Std E
pg/ml	0	20	100	400	1000

Proben mit zu erwartenden Konzentrationen > 1000 pg/ml sollten mit Standard A 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 zu 1,0 ml Inkubationspuffer 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 Sammlung von Speichelproben

Dieser Testkit ermöglicht die Bestimmung der Androstendion-Konzentration in Speichel. Es wird empfohlen, Speichelproben mit einem Zentrifugenröhrchen aus Glas und einem Kunststoff-Trinkhalm, mit dem Sali Set (Katalog-Nr. SA D-6100, 100 Stück) zu sammeln. Andere kommerzielle Probensammler wurden nicht getestet. Die Kontrollen sind gebrauchsfertig.

6.4.1 Verfahren und Bedingungen für die Probensammlung

Speichelproben zu den angegebenen Zeiten sammeln. Wenn keine besonderen Anweisungen gegeben sind, können die Speichelproben jederzeit gesammelt werden, dabei bitte Folgendes beachten:

1. Wenn der Speichel morgens gesammelt wird, soll dies vor dem Zähneputzen durchgeführt werden.
2. Tagsüber vor dem Sammeln von Speichelproben 1 Stunde lang nichts essen oder trinken, keine Medikamente einnehmen und nicht Zähne putzen.
3. Es ist sehr wichtig, eine gute klare Probe zu erhalten, d.h. sie darf nicht mit Essen, Lippenstift, Blut (Zahnfleischbluten) oder anderen fremden Materialien verunreinigt sein.

6.4.2 Vorbereitung der Speichelproben

1. Den Speichel durch den Halm in das Zentrifugenröhrchen aus Glas fließen lassen.
2. Die Probe bei 3000 rpm für 15 Minuten zentrifugieren.
3. Mindestens 1 Stunde bei - 20 °C einfrieren.
4. Die Probe nochmals bei 3000 rpm für 15 Minuten zentrifugieren.
5. Die Speichelprobe ist nun testbereit.
6. Die Probe kann eine Woche lang bei 2 °C - 8 °C oder bei - 20 °C für längere Zeit gelagert werden.

6.5 Test-Verfahrensweise

Alle Reagenzien müssen Raumtemperatur annehmen (22 °C - 28 °C). Am Ende der Testdurchführung die Reagenzien sofort wieder bei 2 °C - 8 °C lagern, längere Zeiten bei Raumtemperatur möglichst vermeiden. Nicht verwendete beschichtete Mikrotiter-Streifen müssen wieder zusammen mit dem beigelegten 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 (Std A-E) zwei Vertiefungen, für jede Kontrolle zwei Vertiefungen, für jede Probe ebenfalls zwei Vertiefungen und für den Nullwert eine Vertiefung vorbereiten.

Reagenz	Standard	Proben / Kontrollen	Nullwert
Standard A-E	50 µl		
Proben / Kontrollen		50 µl	
Verdünntes Konjugat	150 µl	150 µl	
1 Stunde bei +37 °C inkubieren.			
Inhalt der Vertiefungen entfernen. Vertiefungen mit 3-mal mit 300 µl Waschlösung waschen.			
Wichtiger Hinweis: bei jedem Waschschrift die Platte 5 Sekunden vorsichtig schütteln. Überschüssige Flüssigkeit durch Aufschlagen der umgedrehten Platte auf saugfähigem Papier entfernen.			
Waschautomat: Bei Verwendung eines Waschautomaten die Vertiefungen mindestens 5-mal waschen.			
TMB-Substrat	100 µl	100 µl	100 µl
15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur (22 °C -28 °C) inkubieren.			
Stopplösung	100 µl	100 µl	100 µl
Mikrotiterplatte vorsichtig schütteln.			
Die Absorption (E) bei 450 nm innerhalb von 5 Minuten gegen die Referenzwellenlänge von 620-630 nm oder 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 (E_m) berechnen.

8.2 Standardkurve

Die mittlere Absorption der Standards (E_m) gegen die Konzentration (Std. A-E) 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 Standard A 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	100 %
Testosteron	1,2 %
Epitestosteron	0,2 %
5 α -Dihydrotestosteron	0,1 %
DHEA	0,1 %
Progesteron	1x10 ⁻³ %
Östron	1x10 ⁻³ %
Cortisol	1x10 ⁻³ %

10.5 Korrelation

Das Androstenedione Saliva ELISA Testkit 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

x = Salimetrics Salivary Androstenedione 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

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit

Symbole:

	Lagertemperatur		Hersteller		Enthält Testmaterial für <n> Teste
	Verwendbar bis		Chargennummer		In vitro Diagnostikum
	Vor Gebrauch Packungsbeilage lesen		Inhalt		CE gekennzeichnet
	Achtung		Katalog-Nummer		