

User's Manual



Androstenedione Saliva ELISA

Enzyme Immunoassay for the quantitative determination of Androstenedione in saliva.



SLV-4780



96



DRG 

DRG Instruments GmbH, Germany
Frauenbergstr. 18, D-35039 Marburg
Telefon: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49-(0)6421-1700 50
Internet: www.drg-diagnostics.de
E-Mail: drg@drg-diagnostics.de

DRG 

DRG International, Inc.
USA
Telephone: (908) 233-2079
Fax: (908) 233-0758
E-Mail: corp@drg-international.com

**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.
Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.**

Table of Contents / Inhaltsverzeichnis / Tabella die Contenuti / Tabla de Contenidos

1	INTENDED USE	2
2	PRINCIPLE.....	2
3	REAGENT, MATERIAL AND INSTRUMENTATION.....	2
4	PRECAUTION	3
5	PROCEDURE.....	3
6	QUALITY CONTROL.....	5
7	LIMITATION OF PROCEDURE.....	5
8	RESULTS	5
9	REFERENCE VALUE	6
10	PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS	6
11	WASTE MANAGEMENT	7
12	BIBLIOGRAPHY	7
13	TROUBLESHOOTING.....	7
1	VERWENDUNGSZWECK	8
2	TESTPRINZIP	8
3	REAGENZIE, MATERIALIEN UND GERÄTEAUSSTATTUNG	8
4	SICHERHEITSMÄßNAHMEN	9
5	TESTDURCHFÜHRUNG.....	9
6	QUALITÄTSKONTROLLE	11
7	GRENZEN DES TESTS	11
8	ERGEBNISSE	11
9	REFERENZWERT.....	12
10	TESTCHARAKTERISTIKA.....	12
11	ENTSORGUNG.....	13
12	LITERATUR.....	13
13	FEHLERBEHEBUNG (TROUBLESHOOTING).....	13
1	DESTINAZIONE D'USO	14
2	PRINCIPIO DEL METODO.....	14
3	REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE	14
4	PRECAUZIONI	15
5	PROCEDIMENTO	15
6	CONTROLLO QUALITA'	17
7	LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA	17
8	RISULTATI	17
9	VALORI DI RIFERIMENTO	18
10	PARAMETRI CARATTERISTICI	18
11	DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO.....	19
12	BIBLIOGRAFIA.....	19
13	SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI.....	19
	SYMBOLS USED WITH DRG ASSAYS.....	20

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 Δ 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 horseradish peroxidase androstenedione (enzyme-labelled antigen) for binding onto the limited number of anti- androstenedione (antibody) sites on the microplates (solid phase).

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

The enzyme substrate (H_2O_2) and the TMB-Substrate (TMB) are added. After an appropriate time has elapsed for maximum colour development, the enzyme reaction is stopped and the absorbances are determined. Androstenedione concentration in the sample is calculated based on a series of standard.

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

3 REAGENT, MATERIAL AND INSTRUMENTATION

3.1 Reagent and material supplied in the kit

1. **Androstenedione Standards** S0 – S4 (5 x1 vial = 1 mL)
2. **Incubation Buffer** (1 bottle) 30 mL
Phosphate buffer pH 7.5 BSA 1 g/L, stabilizer
3. **Conjugate** (1 bottle) 1.0 mL
Androstenedione-HRP conjugate
4. **Coated Microplate** (1 microplate breakable)
Anti-Androstenedione IgG adsorbed on microplate
5. **TMB-Substrate** (1 bottle) 15 mL
 H_2O_2 -TMB 0.26 g/L (avoid any skin contact)
6. **Stop Solution** (1 bottle) 15 mL
Sulphuric acid 0.15 mol/L (avoid any skin contact)

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.

The microplate, once opened, is stable until the expiry date of kit. Do not remove the adhesive sheets on the unused strips

4 PRECAUTION

- The reagents contain Proclin 300 as preservative.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H₂O₂ to direct sunlight, metals or oxidants.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of the reagents.
- Do not use different lots of reagents.
- This method allows the determination of Androstenedione from 5 pg/mL to 1000 pg/mL.
- Samples with expected concentrations > 1000 pg/mL should be further diluted (1+1) with S0.
- The clinical significance of Androstenedione determination can be invalidated if the patient was treated with cortisone or natural or synthetic steroids.

5 PROCEDURE**5.1 Preparation of the Standard**

(S0, S1, S2, S3, S4)

Before use, mix for 5 min. with rotating mixer

The standard has the following concentration of Androstenedione:

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

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

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

5.2 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.

5.3 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 DRG SALI TUBES 100 (REF SLV-4158)

Do not use sample collector commercially available as "SALIVETTE". Other sample collectors commercially available have not been tested.

5.3.1 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 for saliva collection, the following should be noted:

- If saliva collection is carried out in the morning ensure that this is carried out prior to brushing teeth
- During the day allow 1 hour after any food or drink before collecting saliva samples
- 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.

5.3.2 Saliva Processing Instructions

Let the saliva flow down through the straw into the centrifuge glass tube

- Centrifuge the sample for 15 minutes at 3000 rpm
- Store at – 20 °C for at least 1 hour
- Defrost samples
- Centrifuge again for 15 minutes at 3000 rpm
- The saliva sample is now ready to be tested.
- Store the sample at 2 °C - 8 °C for one week or at – 20 °C for longer time.

5.4 Procedure

As it is necessary to perform the determination in duplicate, prepare two wells for each of the five points of the standard curve (S₀-S₄), two for each sample, one for Blank.

Reagent	Standard	Samples	Blank
Standard S ₀ -S ₄	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 with 300 µL of distilled water. Repeat the washing procedure by draining the water completely			
TMB substrate	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			

6 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.

7 LIMITATION OF PROCEDURE

7.1 Assay Performance

Sample(s), which are contaminated microbiologically, should not be used in the assay. Highly lipaemic 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 more 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. 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. Failure to remove adhering solution adequately in the aspiration or decantation wash step(s) may result in poor replication and spurious results.

7.2 Interpretation

If computer controlled data reduction is used to calculate the results of the test, it is imperative that the predicted values for the calibrators fall within 10% of the assigned concentrations.

8 RESULTS

8.1 Mean Absorbance

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

8.2 Standard Curve

Plot the mean value of absorbance of the standards (E_m) 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

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 zero standard 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	1×10^{-3} %
Estrone	1×10^{-3} %
Cortisol	1×10^{-3} %

10.5 Correlation

The Androstenedione saliva ELISA kit (SLV-4780) 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 (SLV-4780)

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.

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

Androstendion (Antigen) in der Probe konkurriert mit an Meerrettich-Peroxidase (HRP) gebundenem Androstendion (enzymmarkiertes Antigen) um die Anlagerung an eine begrenzte Anzahl von Anti-Androstendion- (Antikörper-) Bindestellen auf den Mikrotiterplatten (feste Phase).

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

Das Enzymsubstrat (H_2O_2) und das TMB-Substrat (TMB) werden hinzugefügt. Nach der für die maximale Farbentwicklung angemessenen Zeit wird die Enzymreaktion gestoppt und die Absorption gemessen. Mit Hilfe einer Standardreihe wird die Androstendion-Konzentration in der Probe berechnet.

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

3 REAGENZIIEN, MATERIALIEN UND GERÄTEAUSSTATTUNG

3.1 Im Kit enthaltene Reagenzien und Materialien

1. **Androstenedione Standards (Androstendion-Standards) S0 – S4** (5 x1 Fläschchen = 1 mL)
2. **Incubation Buffer (Inkubationspuffer)** (1 Flasche) 30 mL;
Phosphatpuffer pH 7,5, BSA 1 g/L, Stabilisator
3. **Conjugate (Konjugat)** (1 Flasche) 1,0 mL;
Androstendion-HRP-Konjugat
4. **Coated Microplate (Beschichtete Mikrotiterplatte)** (brechbar);
Anti-Androstendion-IgG an die Mikrotiterplatte gebunden
5. **TMB-Substrate (TMB-Substrat)** (1 Flasche) 15 mL;
 H_2O_2 -TMB 0,26 g/L (Hautkontakt vermeiden)
6. **Stop Solution (Stopplösung)** (1 Flasche) 15 mL;
Schwefelsäure 0,15 mol/L (Hautkontakt vermeiden)

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 (Coated Microplate / 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 SICHERHEITSMABNAHMEN

- Die Reagenzien enthalten Proclin 300 als Konservierungsmittel.
- Reagenz TMB/H₂O₂ keinem direkten Sonnenlicht, Metallen oder Oxidationsmitteln aussetzen.
- Beim Lösen und Pipettieren der Reagenzien ist größte Genauigkeit erforderlich.
- Keine unterschiedlichen Reagenzienchargen verwenden.
- Mit diesem Verfahren können Androstendion-Konzentrationen von 5 pg/mL bis 1000 pg/mL bestimmt werden.
- Proben mit zu erwartenden Konzentrationen > 1000 pg/mL sollten mit S0 weiter verdünnt werden (1+1).
- Die Androstendion-Bestimmung hat möglicherweise keine klinische Aussagekraft, wenn der Patient mit Kortison oder natürlichen bzw. synthetischen Steroiden behandelt wurde.

5 TESTDURCHFÜHRUNG**5.1 Vorbereitung der Standards**

(S0, S1, S2, S3, S4)

Vor der Verwendung 5 min mit einem rotierenden Schüttelgerät mischen.

Die Standards haben die folgenden Androstendion-Konzentrationen:

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

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

5.2 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.

5.3 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 oder mit DRG SALI TUBES 100 (REF SLV-4158) zu sammeln.

Nicht den unter dem Namen "SALIVETTE" kommerziell erhältlichen Probensammler verwenden. Andere kommerzielle Probensammler wurden nicht getestet.

5.3.1 Verfahren und Bedingungen für die Probensammlung

Speichelproben zu den angegebenen Zeiten sammeln.

Wenn keine besonderen Anweisungen gegeben sind, können Proben der Mundflüssigkeit (Speichel) jederzeit gesammelt werden, dabei bitte Folgendes beachten:

- Wenn der Speichel morgens gesammelt wird, soll dies vor dem Zähneputzen durchgeführt werden.
- Tagsüber vor dem Sammeln von Speichelproben 1 Stunde lang nichts essen oder trinken.
- 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.

5.3.2 Vorbereitung der Speichelproben

Den Speichel durch den Halm in das Zentrifugenröhrchen aus Glas fließen lassen.

- Die Probe bei 3000 rpm für 15 Minuten zentrifugieren.
- Mindestens 1 Stunde bei -20 °C einfrieren.
- Probe auftauen.
- Die Probe nochmals bei 3000 rpm für 15 Minuten zentrifugieren.
- Die Speichelprobe ist nun testbereit.
- Die Probe kann eine Woche lang bei $2\text{ °C} - 8\text{ °C}$ oder bei -20 °C für längere Zeit gelagert werden.

5.4 Test-Verfahrensweise

Da der Test als Doppelbestimmung durchgeführt wird, für jeden der fünf Punkte 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	
1 Stunde bei $+37\text{ °C}$ inkubieren. Inhalt der Vertiefungen entfernen. Vertiefungen mit 300 µL destilliertem Wasser waschen. Den Waschvorgang wiederholen und das Wasser vollständig entfernen.			
TMB-Substrat	100 µL	100 µL	100 µL
15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur ($22\text{ °C} - 28\text{ °C}$) inkubieren.			
Stopplösung	100 µL	100 µL	100 µL
Mikrotiterplatte vorsichtig schütteln. Die Absorption (E) bei 450 nm gegen den Nullwert messen.			

6 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.

7 GRENZEN DES TESTS

7.1 Test-Performance

Mikrobiell kontaminierte Proben nicht im Test verwenden. Stark lipämische oder hämolysierte Proben ebenfalls nicht verwenden. Die Reaktionszeit muss für alle Vertiefungen konstant gehalten werden, damit die Ergebnisse reproduzierbar sind. Das Pipettieren der Proben darf nicht länger als 10 Minuten dauern, um Testabweichungen zu vermeiden. Bei Verwendung von mehreren Platten wird empfohlen, die Dosis-Wirkungs-Kurve zu wiederholen. Durch die Zugabe der Substratlösung wird eine kinetische Reaktion gestartet, die durch Hinzufügen der Stopplösung beendet wird. Deshalb müssen die Substrat- und die Stopplösung jeweils in derselben Reihenfolge pipettiert werden, um Zeitabweichungen während der Reaktion zu vermeiden. Mikrotiterplatten-Lesegeräte lesen vertikal ab. Nicht die Unterseite der Vertiefungen berühren. Wenn bei den Ansaug- oder Abgieß-Waschschritten anhaftende Flüssigkeit zurückbleibt, kann das zu mangelnder Wiederholbarkeit und falschen Ergebnissen führen.

7.2 Interpretation

Wenn computergesteuerte Verfahren zur Datenreduktion für die Berechnung der Testergebnisse verwendet werden, dürfen die ermittelten Werte aller Kalibratoren nicht mehr als 10 % von der vorgegebenen Konzentration abweichen.

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 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

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 (SLV-4780) wurde mit einem anderen kommerziell erhältlichen Androstendion-Speicheltest verglichen. In beiden Testsystemen wurden entsprechend 38 Speichelproben analysiert. Die lineare Regressionskurve wurde berechnet:

$$y = 0,46x + 5,51; \quad r^2 = 0,983$$

y = Androstenedione Saliva Elisa Testkit (SLV-4780)

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

1 DESTINAZIONE D'USO

Metodo competitivo immunoenzimatico colorimetrico per la determinazione quantitativa dell'Androstenedione Libero nella saliva.

Il kit Androstenedione Saliva è destinato al solo uso di laboratorio.

1.1 Significato Clinico

Androstenedione (o Δ 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 PRINCIPIO DEL METODO

L'androstenedione "libero" (antigene) presente nel campione, compete con l'antigene marcato con perossidasi nei confronti dell'anticorpo anti-Androstenedione adsorbito su micropiastra (fase solida). La separazione libero-legato si ottiene mediante semplice lavaggio della fase solida.

L'enzima presente nella frazione legata, catalizza la reazione tra il Substrato (H_2O_2) ed il TMB-Substrate (TMB), sviluppando una colorazione blu che vira al giallo dopo aggiunta dello Stop solution (H_2SO_4).

L'intensità del colore sviluppato è proporzionale alla concentrazione di antigene marcato e quindi inversamente proporzionale alla concentrazione dell'androstenedione "libero" presente nel campione.

3 REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

3.1 Reattivi e materiali forniti nel kit

1. **Androstenedione Standard S0 – S4** (5 x1 flacone = 1 mL)
2. **Incubation Buffer** (1 flacone) 30 mL
Tampone fosfato pH 7,5 BSA 1 g/L, conservanti
3. **Conjugate** (1 flacone) 1,0 mL
Androstenedione coniugato con Perossidasi
4. **Coated Microplate** (1 micropiastra breakable)
Anti-Androstenedione adsorbito su micropiastra
5. **TMB-Substrate** (1 flacone) 15mL
 H_2O_2 -TMB (0,26 g/L) (evitare il contatto con la pelle)
6. **Stop Solution** (1flacone) 15 mL
Acido Solforico 0,15 mol/L (evitare il contatto con la pelle)

3.2 Reattivi necessari non forniti nel kit

Acqua distillata.

3.3 Materiale e strumentazione ausiliare

Dispensatori automatici.

Lettore per micropiastre (450 nm)

Saliva Collection Device

Note

Conservare i reattivi a 2 °C - 8 °C, al riparo dalla luce.

Aprire la busta del Reattivo 4 (Coated Microplate) solo dopo averla riportata a temperatura ambiente e chiuderla subito dopo il prelievo delle strip da utilizzare; una volta aperta è stabile fino alla data di scadenza del kit.

Evitare di staccare la sheet adesiva dalle strip che non vengono utilizzate nella seduta analitica.

4 PRECAUZIONI

- I reagenti contengono Proclin 300 come conservante.
- Evitare l'esposizione del reattivo TMB/H₂O₂ alla luce solare diretta, metalli o ossidanti.
- Osservare la massima precisione nella ricostituzione e nella dispensazione dei reattivi.
- Non usare reattivi appartenenti a lotti diversi.
- Questo metodo consente di determinare concentrazioni di Androstenedione da 5 pg/mL a 1000 pg/mL.
- Per campioni con concentrazioni maggiori di 1000 pg/mL diluire il campione (1/1) con S0.
- La somministrazione di steroidi naturali o sintetici può alterare i livelli salivari di Androstenedione.

5 PROCEDIMENTO**5.1 Preparazione degli Standard (S0, S1, S2, S3, S4)**

Prima dell'uso lasciare su agitatore rotante per almeno 5 minuti.

Agli Standard corrispondono le seguenti concentrazioni di Androstenedione:

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

Stabili 6 mesi a 2 °C - 8 °C dall'apertura dei flaconcini.

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

5.2 Preparazione del Coniugato Diluito

Preparare al momento dell'uso.

Diluire 10 µL di Reattivo 3 (Conjugate) con 1 mL di Reattivo 2 (Incubation Buffer).

I volumi possono essere variati rispettando tale proporzione. Mescolare delicatamente per almeno 5 minuti su agitatore rotante.

Stabile 3 ore a Temperatura ambiente 22 °C - 28 °C.

5.3 Preparazione del campione

Questo kit permette la determinazione di Androstenedione in campioni di saliva.

Per la raccolta del campione si consiglia l'utilizzo di tubi in vetro da centrifuga e di una cannuccia in plastica o DRG SALI TUBES 100 (REF SLV-4158).

Si consiglia di non utilizzare dispositivi di raccolta disponibili in commercio come "SALIVETTE". Altri tipi di dispositivi di raccolta commercialmente disponibili non sono stati testati.

5.3.1 Metodo e limitazioni

Raccogliere i campioni di saliva nei tempi indicati.

- Se non vengono date indicazioni specifiche per la raccolta delle salive, è possibile raccogliere i campioni in qualsiasi momento ma tenendo conto dei seguenti fattori:
Se la raccolta della saliva viene effettuata al mattino, questa deve essere prelevata prima di lavarsi i denti.
- Durante la giornata attendere almeno un ora dopo aver mangiato o bevuto, prima di raccogliere i campioni di saliva
- E' molto importante ottenere un campione limpido – non contaminato da cibo, cosmetici, sangue, chewing gum od altri materiali estranei.

5.3.2 Processazione delle salive

Far defluire la saliva attraverso la cannuccia nel tubo di vetro.

- Centrifugare il campione per 15 minuti a 3000 rpm
- Porlo a – 20 °C per almeno 1 ora
- Scongela quindi il campione.
- Centrifugare ancora per 15 minuti a 3000 rpm
- Il campione di saliva è così pronto per essere testato.
- Conservare il campione a 2 °C - 8 °C per una settimana od a –20°C per un tempo maggiore.

5.4 Procedimento

Poiché è necessario operare in doppio, allestire due pozzetti per ogni punto della curva Standard (S0-S4), due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagente	Standard	Campioni	Bianco
Standard S ₀ -S ₄	50 µL		
Campioni		50 µL	
Coniugato Diluito	150 µL	150 µL	
Incubare 1 h a +37°C. Allontanare la miscela di reazione, lavare aggiungendo in ogni pozzetto 0,3 mL di acqua distillata; ripetere il lavaggio allontanando completamente l'acqua			
TMB substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubare 15 minuti a temperatura ambiente 22÷28°C, al riparo dalla luce.			
Stop solution	100 µL	100 µL	100 µL
Agitare delicatamente la micropiastra. Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm azzerando con il Bianco.			

6 CONTROLLO QUALITA'

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 standard 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.

7 LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

7.1 Prestazioni dell'analisi

Non usare campioni microbiologicamente contaminati, così come campioni altamente lipemici o emolizzati. E' importante che il tempo di reazione di ogni pozzetto sia lo stesso per la riproducibilità dei risultati. Il tempo di dispensazione dei pozzetti non deve essere superiore a 10 minuti. Se si protrae per oltre 10 minuti si raccomanda di seguire l'ordine di dispensazione. Se si utilizza più di una piastra, ripetere la curva standard in ogni piastra. L'aggiunta del TMB-substrate da inizio a una reazione cinetica, la quale termina con l'aggiunta della stop solution. L'aggiunta del substrato e della stop solution deve avvenire nella stessa sequenza per eliminare differenti tempi di reazione. Le Plate readers misurano le OD verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti. La non completa aspirazione della soluzione di lavaggio dai pozzetti può dar luogo a cattivi replicati e a falsi risultati.

7.2 Interpretazione dei risultati

Se per calcolare i risultati è stato usato il computer, è imperativo che i valori dei calibratori cadano entro il 10 % delle concentrazioni assegnate.

8 RISULTATI

8.1 Estinzione Media

Calcolare l'estinzione media (E_m) di ciascun punto della curva standard (S0 -S4) e di ogni campione.

8.2 Curva Standard

Tracciare sul grafico delle assorbanze i valori calcolati delle estinzioni medie (E_m) di ciascuno standard (S0 -S4) in funzione delle concentrazioni. Tracciare la miglior curva passante per i punti standard (es: Four Parameter Logistic).

8.3 Calcolo dei risultati

Interpolare, dal grafico, i valori di assorbanza relativi a ciascun campione e leggerne la corrispondente concentrazione in pg/mL.

9 VALORI DI RIFERIMENTO

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

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

		pg/mL
DONNE	Normali	20 – 160
	P.C.O. - Irsutismo	120 – 300
UOMINI		20 - 150

10 PARAMETRI CARATTERISTICI

10.1 Precisione

10.1.1 Intra-Assay

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

10.1.2 Inter-Assay

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 $\leq 11\%$.

10.2 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 $102,60\% \pm 13,23\%$.

10.3 Sensibilità

La concentrazione minima di Androstenedione misurabile è 5 pg/mL con un limite di confidenza del 95%.

10.4 Specificità

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

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 Correlazione

Il kit Androstenedione saliva (SLV-4780) è stato comparato con un kit disponibile in commercio. Sono stati testati 38 campioni di saliva. La curva di regressione è :

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

$$r^2 = 0,983$$

y = Androstenedione saliva Elisa kit (SLV-4780)

x = Salivary Androstenedione Salimetrics Elisa kit

11 DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

I reagenti devono essere smaltiti in accordo con le leggi locali.

12 BIBLIOGRAFIA

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 SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

ERRORE CAUSE POSSIBILI/ SUGGERIMENTI

Nessuna reazione colorimetrica del saggio

- mancata dispensazione del coniugato
- contaminazione del coniugato e/o del Substrato
- errori nell'esecuzione del saggio (es. Dispensazione accidentale dei reagenti in sequenza errata o provenienti da flaconi sbagliati, etc.)

Reazione troppo blanda (OD troppo basse)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo breve, temperatura di incubazione troppa bassa

Reazione troppo intensa (OD troppo alte)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo lungo, temperatura di incubazione troppa alta
- qualità scadente dell'acqua usata per la soluzione di lavaggio (basso grado di deionizzazione)
- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

Valori inspiegabilmente fuori scala

- contaminazione di pipette, puntali o contenitori- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)








CV% intrasaggio elevato

- reagenti e/o strip non portate a temperature ambiente prima dell'uso
- il lavatore per micropiastre non lava correttamente (suggerimento: pulire la testa del lavatore)

CV% intersaggio elevato

- condizioni di incubazione non costanti (tempo o temperatura)
- controlli e campioni non dispensati allo stesso tempo (con gli stessi intervalli) (controllare la sequenza di dispensazione)
- variabilità intrinseca degli operatori

SYMBOLS USED WITH DRG 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