

Androstenedione

CE

1. INTRODUCTION

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

2. INDICATION D'UTILISATION

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

3. PRINCIPE DU DOSAGE

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

4. MATERIELS

4.1. Réactifs fournis

- **Puits recouverts d'Anti-Androstènedione** : 12 bandes détachables enduites d'Anti-Androstènedione de 8 puits, en sachet d'aluminium refermable.
- **Solution stop** : 1 flacon contenant 15 ml d'acide sulfurique, 0.15 mol/l (éviter tout contact avec la peau).
- **Conjugué Androstènedione-HRP**: 1 flacon contenant 21 ml d'Androstènedione marqué à la peroxydase de raifort.
- **Solution de TMB** : 1 flacon contenant 15 ml de 3, 3', 5, 5'-Tétraméthylbenzidine (H_2O_2 -TMB 0.26g/l) (éviter tout contact avec la peau).
- **Solution de lavage (concentrée x 10)** : 1 flacon contenant 50 ml (NaCl 160 g/l, Tween-20 10 g/l, Tampon phosphaté 0,2 M pH 7,4)
- **Contrôle d'Androstènedione**: 1 flacon contenant 1 ml d'un lot spécifique d'une solution de contrôle prête à l'emploi. La concentration est indiquée sur l'étiquette.
- **Etalons Androstènedione** : 6 flacons, 1 ml chacun

Etalon 0:	0 ng/ml
Etalon 1:	0.1 ng/ml
Etalon 2:	0.4 ng/ml
Etalon 3:	1.2 ng/ml
Etalon 4:	4.0 ng/ml
Etalon 5:	10.0 ng/ml

4.2. Matériels fournis

- 1 support de plaque
- 1 jeu de feuilles de recouvrement
- 1 mode d'emploi
- 1 schéma de distribution et d'identification

4.3. Matériels et équipements requis

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

5. STABILITE ET CONSERVATION

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

6. PREPARATION DES REACTIFS

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

6.1. Bandes détachables enduites

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

6.2. Conjugué Androstènedione-HRP

La solution est prête à l'emploi.

6.3. Etalons Androstènedione

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

Etalon 0:	0 ng/ml
Etalon 1:	0.1 ng/ml
Etalon 2:	0.4 ng/ml
Etalon 3:	1.2 ng/ml
Etalon 4:	4.0 ng/ml
Etalon 5:	10.0 ng/ml

Mélanger 5 minutes avant utilisation avec un vortex. Les étalons sont prêts à l'emploi.

Après la première utilisation les contrôles restent stables pendant encore 6 mois s'ils sont conservés à 2 – 8° C.

6.4. Solution TMB

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

6.4. Solution stop

Le flacon contient 15 ml d'une solution d'acide sulfurique 0.15 M (R 36/38, S 26).

6.5. Solution de lavage

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

7. PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

La détermination de Androstènedione peut être effectuée sur du plasma ou du sérum humain. Conserver les échantillons à -20°C si la détermination n'est pas effectuée le jour du prélèvement. Si les échantillons sont conservés congelés, bien mélanger les échantillons décongelés avant le dosage. *Eviter les cycles répétés de congélation et de décongélation.* Les échantillons de patients avec des concentrations d'Androstènedione au-dessus de 10 ng/ml peuvent être dilués (par exemple 1:2) avec étalon 0.

7.1. Précaution d'usage

- Certains réactifs contiennent de petites quantités de Proclin 300^R comme conservateur. Eviter tout contact avec peau et les muqueuses.
- Ne pas utiliser des échantillons microbiologiquement contaminés ou des échantillons hautement lipémiques ou hémolysés.
- Observer la plus grande précision dans la reconstitution et la distribution des réactifs.
- Cette méthode permet de déterminer des concentrations d'Androstènedione de 0,1 ng/ml à 10 ng/ml.
- Éviter l'exposition du réactif TMB/H₂O₂ à la lumière directe du soleil, aux métaux et aux substances oxydantes. Ne pas congeler la solution.
- L'administration de stéroïdes naturels ou synthétiques peut altérer les niveaux d'Androstènedione dans le sang.

8. PROCEDE DU DOSAGE

8.1. Préparation du dosage

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

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

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

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

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

1. Pipeter 25 µl d'étalons, de contrôles et d'échantillons dans leurs puits respectifs.
2. Ajouter 200 µl de conjugué dans chaque puits. Garder le puits A1 pour le blanc.
3. Couvrir les puits avec le couvercle fourni dans le kit.
4. **Incuber pendant 1 heure à 37 °C.**
5. À la fin de l'incubation, enlever le couvercle, aspirer le contenu des puits et laver chaque puits trois fois avec 300 µl de solution de lavage diluée. Eviter les débordements de puits de réaction. Pendant chaque pas de lessive, secouez doucement la plaque depuis 5 secondes et enlevez la solution d'excès en tapant la plaque inversée sur un essuie-mains en papier absorbant.

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

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

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

8.2. Mesure

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

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

Mesurer l'absorbance de tous les puits à **450 nm** et enregistrer les valeurs d'absorbance pour chaque contrôle et échantillon de patient dans le plan de distribution et d'identification.

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

9. RESULTATS

9.1. Calcul des résultats

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

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

9.2. Valeurs de Référence

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

Hommes		0.60 – 2.7 ng/ml
Femmes	phase folliculaire	0.75 – 3.1 ng/ml
	Phase lutéinique	0.94 – 3.2 ng/ml

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

10. CONTROLE QUALITE

Chaque laboratoire doit faire des contrôles de dosage à des niveaux de gammes normales, élevées et faibles d'Androstènedione pour surveiller la performance des dosages. Ces contrôles doivent être considérés comme inconnus et les valeurs doivent être déterminés dans chaque test effectué. Les chartes de contrôles qualité doivent être maintenues pour suivre les performances des réactifs fournis. Des méthodes de statistiques pertinentes doivent être employées pour établir des tendances. Le laboratoire individuel doit établir des limites de performance de dosage acceptables. De plus, l'absorbance maximale doit être dans la même ligne que les expériences passées. Les déviations significatives provenant des performances établies peuvent indiquer un changement non remarquable dans les conditions expérimentales ou dans la dégradation des réactifs du kit. Les réactifs frais doivent être utilisés pour déterminer la raison des variations.

11. PERFORMANCE DU DOSAGE

11.1. Précision

Variation Intra Dosage

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

Variation Inter Dosage

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

11.2. Spécificité analytique

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

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

17 beta-Estradiol	< 0,001 %
Estriol	< 0,001 %
Aldosterone	< 0,001 %

11.3. Sensibilité Analytique

La plus petite concentration détectable d'Androstènedione par l'étalon 0 est 0.01 ng/ml avec un niveau de confiance 95%.

11.4. Exactitude

L'épreuve de récupération conduite sur un échantillon enrichi avec 0,4 - 0,8 - 1,6 - 3,2 ng/ml d'Androstenedione a donné une valeur moyenne (\pm SD) de 100,91% \pm 5,61%.

L'épreuve de dilution (2 - 4 - 8 - 16 fois) conduite sur trois échantillons a donné une valeur de récupération moyenne (\pm SD) de 107,18 % \pm 3,03%.

11.5. Corrélation avec le dosage RIA

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

La courbe de régression est :

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

$$r = 0,84$$

12. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

- En accord avec l'article 1 paragraphe 2b de la directive européenne 98/79/EC, l'utilisation des dispositifs médicaux de diagnostic in vitro est destinée par le fabricant à garantir la pertinence, les performances et la sécurité du produit. Par conséquent, la procédure de dosage, l'information, les précautions et mises en garde du mode d'emploi doivent être suivies de façon stricte. L'utilisation de ces kits avec des automates ou dispositifs similaires doit être validée. Aucun changement de la conception, composition et procédure de dosage, ainsi que l'utilisation avec d'autres produits non approuvés par le fabricant, ne sont autorisés ; seul l'utilisateur est responsable de tels changements. Le fabricant n'est pas responsable des faux résultats et des incidents dus à ces modifications. Le fabricant n'est pas responsable des résultats fournis par analyse visuelle des échantillons des patients.
- Uniquement pour diagnostic in vitro.
- Suivre les Bonnes Pratiques de Laboratoires (BPL) pour la manipulation de produits sanguins.
- Tous les composants d'origine humaine utilisés pour la fabrication de ces réactifs ont été analysés et ont été testés non réactifs aux antigènes HBs, en anticorps anti-VIH et en anticorps anti-VHC. Néanmoins, tous les produits doivent être considérés et traités comme étant potentiellement infectieux.
- Ne pas échanger les réactifs ou les bandes provenant de différents lots de production.
- Ne pas utiliser de réactifs provenant d'autres fabricants avec les réactifs de ce kit.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
- Utiliser seulement des cônes de pipette, des distributeurs et du matériel de laboratoire propres.
- Ne pas échanger les bouchons des flacons, pour éviter la contamination croisée
- Fermer les flacons de réactifs immédiatement après l'utilisation pour éviter l'évaporation et la contamination microbienne.
- Avant une nouvelle utilisation, vérifier les flacons de conjugué et de contrôle, déjà utilisés, pour exclure une contamination microbienne.
- Pour éviter la contamination croisée et des résultats faussement élevés, introduire les échantillons de patients et le conjugué exactement au fond des puits en évitant les éclaboussures.
- Quand l'utilisation a automatisé l'équipement, l'utilisateur a la responsabilité de s'assurer que le kit a été convenablement évalué.
- Si le liquide n'est pas complètement extrait des puits, cela peut influencer la précision du dosage et/ou augmenter le bruit de fond. Pour améliorer la performance du kit sur les systèmes automatiques ELISA, on recommande d'augmenter le nombre de se lave.
- Le TMB est irritant, ce qui peut être nocif s'il est inhalé, ingéré ou absorbé à travers la peau. Eviter toute inhalation, ingestion ou contact avec la peau et les yeux pour prévenir de ces risques.
- La solution stop est une solution d'acide sulfurique diluée. L'aide sulfurique est un poison corrosif et peut être toxique s'il est ingéré. Eviter tout contact avec la peau ou les yeux pour prévenir des brûlures chimiques.
- L'addition de la solution de substrat initie la réaction cinétique qui se termine par l'ajout de solution stop. Par conséquent, l'addition de solution de substrat et de solution stop doit être faite durant la manipulation pour éliminer tous risques de dépassement de la durée de réaction.
- Suivre la notice pour les contrôles qualité dans les laboratoires médicaux en dosant les contrôles et/ou les sérums.
- Les lecteurs de microplaques mesurent verticalement. Ne pas toucher le fond des puits.
- La méthode ELISA de NovaTec est destinée à un personnel qualifié qui est familiarisé avec les Bonnes Pratiques de Laboratoire.

AVERTISSEMENT:	L'acide sulfurique est irritant pour les yeux et la peau. Garder hors de la portée des enfants. En cas de contact avec les yeux, rincer soigneusement avec de l'eau et consulter un médecin !
----------------	---

12.1. Elimination des déchets

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

13. INFORMATION POUR LES COMMANDES

Prod. No.:

DNOV008

Androstènedione (96 Dosages)