

Product information

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



AMH ELISA



DE6141



96



Demeditec Diagnostics GmbH
Lise-Meitner-Strasse 2
24145 Kiel – Germany
www.demeditec.com

**Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.
Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.
Por favor, use sólo la versión válida de las instrucciones de uso que se suministran con el kit.
Utilisez seulement la version valide des Instructions d'utilisation fournies avec le kit.
Utilize apenas a versão válida das Instruções de Utilização fornecidas com o kit.**

Introduced modifications / Durchgeführte Änderungen / Modifiche introdotte / Modificaciones introducidas / Modifications apportées / Modificações introduzidas	
The following changes have been made in comparison to the previous version: Im Vergleich zur Vorgängerversion wurden folgende Änderungen vorgenommen: Rispetto alla versione precedente, sono state apportate le seguenti modifiche: Se han introducido los siguientes cambios en comparación con la versión anterior: Les modifications suivantes ont été apportées par rapport à la version précédente : Foram efetuadas as seguintes alterações em comparação com a versão anterior:	
Detailed editorial revision. Changed wording in several chapters. Ausführliche redaktionelle Überarbeitung. Geänderter Wortlaut in mehreren Kapiteln. Revisione editoriale dettagliata. Modificato il testo in diversi capitoli. Revisión editorial detallada. Se ha cambiado la redacción de algunos capítulos. Révision éditoriale détaillée. Modification de la formulation dans plusieurs chapitres. Revisão editorial detalhada. Texto alterado em vários capítulos.	
1 INTENDED USE and 1.1 Scientific Validity Report	In regard to contribution in the diagnosis "certain diseases such as granulosa cell tumors" was removed.
4.1 Materials provided with the kit:	Concentration for Stop Solution is given now in percent instead of mol/L ("< 5 % H ₂ SO ₄ " instead of "0,5 M H ₂ SO ₄ ")
9.2 Sensitivity:	Measuring range: 0.052 ng/mL – 20.0 ng/mL = LoD to Smax, (before: 9.1 Assay Dynamic Range: 0.062 ng/mL – 20.0 ng/mL = LoQ to Smax), Linear range added;
9.3.3 Between-lot Precision:	Added
9.6 Method Comparison:	Changed to Passing–Bablok regression.
11.4 Reporting of Serious Incident:	Added

ENGLISH	3
DEUTSCH	12
ITALIANO	20
ESPAÑOL.....	28
FRANÇAIS.....	36
PORTUGUES.....	44
REFERENCES / LITERATURE	52
SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS	52

1 INTENDED USE

The **DEMEDIATEC AMH ELISA** is a manual enzyme immunoassay for the **quantitative** measurement of Anti-Müllerian Hormone (AMH) in human serum or plasma (EDTA or Li-heparin plasma).

For *in vitro* diagnostic use. For laboratory professional use.

The device is **intended to be used** for prognosis of individuals where information on one or more of the following is required:

- Assessment of ovarian reserve in women

Or as an aid to one or more of the following:

- Distinction between women presenting with AFC (antral follicle count) values > 15 (high ovarian reserve) and women with AFC values ≤ 15 (normal or diminished ovarian reserve)
- Prediction of early ovarian follicle loss and menopause onset
- Contribution in the diagnosis of polycystic ovary syndrome (PCOS)

The device is **not intended** to be used for monitoring of women undergoing controlled ovarian stimulation in an Assisted Reproduction Technology program.

1.1 Scientific Validity Report

Anti-Müllerian Hormone (AMH), a dimeric 140 KDa glycoprotein, is a member of the transforming growth factor- β (TGF- β) family of cytokines which plays an essential role in the normal differentiation of reproductive structures. (1) AMH is secreted by Sertoli cells of the testes during embryogenesis of the fetal male, preventing the development of the Müllerian ducts to the uterus and other Müllerian structures. In females, AMH is secreted by the granulosa cells of ovarian follicles. (2,3) AMH has been identified as a reliable marker of ovarian reserve that can help predict early ovarian follicle loss and menopause onset. AMH levels also reflect the effects of damaging gynecologic surgeries or gonadotoxic treatments such as chemotherapy on ovarian reserve. Furthermore, AMH contributes in the diagnosis of polycystic ovary syndrome (PCOS). (4,5,6,7,8,9,10)

2 PRINCIPLE OF THE TEST

The DEMEDIATEC AMH ELISA is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on the **sandwich principle**. The microtiter wells are coated with a monoclonal antibody (mouse) directed towards a unique antigenic site of the AMH molecule. During the first incubation, AMH in the added sample binds to the immobilized antibody. The simultaneously added enzyme conjugate, which contains an anti-AMH antibody conjugated to horseradish peroxidase, binds to the AMH forming a sandwich complex. After a washing step to remove all unbound substances, the solid phase is incubated with the substrate solution. The colorimetric reaction is stopped by addition of stop solution, and optical density (OD) of the resulting yellow product is measured. The intensity of color is proportional to the concentration of the analyte in the sample. A standard curve is constructed by plotting OD values against concentrations of standards, and concentrations of unknown samples are determined using this standard curve.

3 WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. This kit is for *in vitro* diagnostic use only. For laboratory professional use only.
2. Before starting the assay, read the instructions for use completely and carefully. Use the valid version of instructions for use provided with the kit. Be sure that everything is understood.
3. Do not mix or use components from kits with different lot numbers. It is advised not to interchange wells of different plates even of the same lot. The kits may have been shipped or stored under different conditions and the binding characteristics of the plates may result slightly different.
4. Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
5. Do not reuse microtiter wells.
6. Reagents of other manufacturers must not be used together with the reagents of this test kit.
7. All reagents in this kit are clear liquids, substrate solution is clear and colorless. Changes in its appearance may affect the performance of the test. In that case, contact DEMEDITEC.
8. Microbial contamination of reagents or samples may give false results.
9. Allow the reagents to reach room temperature (20 °C to 26 °C) before starting the test. Temperature will affect the optical density readings of the assay. However, values for the patient samples will not be affected.
10. All indicated volumes must be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiter plate readers.
11. Use reservoirs only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing a substrate solution that had previously been used for the conjugate solution may turn solution coloured. Do not pour reagents back into original vials as reagent contamination may occur.

General precautions

1. Follow laboratory quality assurance and laboratory safety guidelines.
2. Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and samples with skin and mucous membranes.
3. Do not smoke, eat, drink, or apply cosmetics in areas where samples or kit reagents are handled.
4. Wear lab coats and disposable latex gloves when handling samples and reagents and where necessary safety glasses.

Biohazard information

1. All reagents of this test kit which contain human serum or plasma have been tested and confirmed negative for HIV I/II, HBsAg and HCV by FDA approved procedures. However, no known test method can offer total assurance that no infectious agent is present.
2. The device contains material of animal origin, which is certified apparently free of infectious or contagious diseases and injurious parasites.
3. Bovine components originate from countries where BSE (Bovine spongiform encephalopathy) has not been reported.
4. All materials and samples of human or animal origin must be handled as if capable of transmitting infectious diseases.
5. Handling must be done in accordance with the procedures defined by appropriate national biohazard and safety guideline or regulation. Waste must be discarded according to local rules and regulations.

Information to chemical hazards and hazard classification

1. Some reagents contain preservatives in non-declarable concentrations. Nevertheless, in case of contact with eyes or skin, flush immediately with water.
2. Substrate Solution contains an ingredient in non-declarable concentrations which causes serious eye irritation. In case of possible contact with eyes, rinse immediately carefully and thoroughly with eye wash or water. After contact with skin, wash with plenty of water. Take-off contaminated clothing and wash it before reuse.
3. Avoid contact with Stop Solution containing < 5 % H₂SO₄. It may cause skin irritation and burns.
4. Chemicals and prepared or used reagents must be treated as hazardous waste according to the national safety guideline or regulation.
5. This product does not contain substances which have carcinogenic, mutagenic or toxic for reproduction (CMR) properties.

All reagents of this test kit do NOT contain hazardous substances in concentrations to be declared, a classification and labelling is not required.

For detailed information, please refer to the Safety Data Sheet, which is available upon request directly from Demeditec.

4 MATERIALS

4.1 Materials provided with the kit

- SORB MT** Microtiterwells, 12 x 8 wells (break apart);
Coated with anti-AMH antibody (monoclonal).
- CAL 0 – 5** Standard (Standard 0 - 5)*, 6 x 1 mL, ready to use;
Concentrations: 0.0 – 0.4 – 1.0 – 4.0 – 10 – 20 ng/mL
Conversion: 1 ng/mL = 7.14 pmol/L
Calibrated against the following reference material: 1st WHO International Reference Reagent, Mullerian Inhibiting Substance/Anti-Mullerian Hormone, NIBSC code: 16/190.
- CONTROL low & high** Control Low & High*, 2 x 1 mL, ready to use; *For control values and ranges please refer to Certificate of Analysis.*
- ENZ CONJ** Enzyme Conjugate*, 1 x 14 mL, ready to use; Anti-AMH antibody conjugated with horseradish peroxidase; colored red.
- SUB TMB** Substrate Solution, 1 x 14 mL, ready to use; Contains 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB). Keep away from direct sun light.
- STOP SOLN** Stop Solution, 1 x 14 mL, ready to use; Contains < 5 % H₂SO₄. *Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.*
- WASH SOLN 40x** Wash Solution*, 40x concentrate, 1 x 30 mL; See "Reagent Preparation".

Instructions for Use, 1x

Certificate of Analysis (CoA), 1x

*contains non-mercury preservative.

4.2 Materials required but not provided

- A calibrated microtiter plate reader (450 nm, with reference wavelength at 620 nm to 630 nm)
- Calibrated variable precision micropipettes
- Manual or automatic equipment for rinsing microtiter plate wells
- Absorbent paper
- Distilled water
- Timer
- Graph paper or software for data reduction

4.3 Storage and Stability of the Kit

Unopened kits and reagents as well as **opened reagents** must be stored at 2 °C to 8 °C. The microplate must always be stored in the resealable aluminum pouch containing a desiccant. Do not open the pouch until it has reached room temperature. The microtiter plate consists of 12 individual strips. Each strip can be divided into 8 individual wells. Unused wells must be immediately returned to the aluminum pouch with the desiccant and stored again tightly resealed at 2 °C to 8 °C. Once opened, reagent vials must be closed tightly again.

	Storage Temperature	Stability
Unopened kits and unopened reagents	2 °C to 8 °C	Until the expiration date printed on the label. Do not use reagents beyond this date!
Opened kit	2 °C to 8 °C	8 weeks

4.4 Reagent Preparation

Bring all reagents and required number of strips to room temperature (20 °C to 26 °C) prior to use.

Wash Solution

Add distilled water to the 40X concentrated Wash Solution. Dilute 30 mL of concentrated Wash Solution with 1170 mL distilled water to a final volume of 1200 mL.

Stability after dilution:	at 20 °C to 26 °C	1 week
---------------------------	-------------------	--------

4.5 Disposal of the Kit

The disposal of the kit and all used materials/reagents must be performed according to the national regulations. Special information for this product is given in the Safety Data Sheet, section 13.

4.6 Damaged Test Kits

In case of any damage to the test kit or components, DEMEDITEC must be informed in writing, at the latest one week after receiving the kit. Damaged single components must not be used for a test run. They have to be stored until a final solution has been found. After this, they must be disposed of according to the official regulations.

5 SAMPLE COLLECTION, STORAGE AND PREPARATION

The following sample material can be used in this test:

Human serum or plasma (EDTA plasma or lithium heparin plasma)

Samples containing sodium azide should not be used in the assay.

In general, it should be avoided to use hemolytic, icteric, or lipemic samples. For further information refer to chapter "*Interfering Substances*".

5.1 Sample Collection

Serum:

Collect blood by venipuncture (e.g. Sarstedt Monovette for serum), allow to clot, and separate serum by centrifugation at room temperature. Do not centrifuge before complete clotting has occurred. Patients receiving anticoagulant therapy may require increased clotting time.

Plasma:

Whole blood should be collected into centrifuge tubes containing anticoagulant (e.g. Sarstedt Monovette with the appropriate plasma preparation) and centrifuged immediately after collection.

Whole blood should not be frozen before centrifugation.

5.2 Sample Storage

Samples must be stored tightly capped prior to performing the assay. If stored frozen, freeze only once. Thawed samples must be inverted several times prior to testing.

Stability	at 2 °C to 8 °C	7 days
	at -20 °C (in aliquots)	up to 3 months

5.3 Sample Preparation

Samples can be assayed without additional preparation.

6 ASSAY PROCEDURE

6.1 Procedural notes

- All reagents and samples must be allowed to come to room temperature (20 °C to 26 °C) before use.
- All reagents must be mixed without foaming.
- Do not interchange caps of reagent vials to avoid cross-contamination.
- Use new disposal plastic pipette tips for each standard, control, or sample in order to avoid carry-over.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense conjugate without splashing accurately to the bottom of wells.
- Mix the contents of the microtiter plate wells thoroughly to ensure good test results.
- Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.
- Once the test has been started, all steps must be completed without interruption and in the same sequence for each step.
- The enzymatic reaction is linearly proportional to time and temperature.
- Optical density is a function of the incubation time and temperature. Respect the incubations times and temperatures as given in chapter "Test Procedure".
- Before starting the assay, it is recommended that all reagents are ready, caps removed, all needed wells secured in holder, etc. This will ensure equal elapsed time for each pipetting step without interruption.
- **Important note to wash procedure:**
Washing is critical. Improperly washed wells will give erroneous results. The sensitivity and precision of this assay is markedly influenced by the correct performance of the washing procedure!
- **Test performance using fully automated analysis devices:**
Automated test performance using fully automated, open-system analysis devices is possible. However, the combination must be validated by the user.

6.2 Test Procedure

Each run must include a standard curve. The controls serve as internal controls for the reliability of the test procedure. They must be assayed with each test run. The given test procedure describes manual processing.

8. Secure the desired number of microtiter wells in the frame holder.
9. Pipette **25 µL** of each **Standard, Control,** and **sample** with new disposable tips into appropriate wells.
10. Add **100 µL Enzyme Conjugate** into each well.
Thoroughly mix for 10 seconds. It is important to have a complete mixing in this step.
11. Incubate for **60 minutes** at room temperature.
12. Wash the wells as follows:
If the wash step is performed manually:
Briskly shake out the contents of the wells.
Rinse the wells **3 times** with **300 µL** diluted *Wash Solution* per well.

If an automated plate washer is used:
Rinse the wells **3 times** with **400 µL** diluted *Wash Solution* per well.

At the end of the washing step, always strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets!
13. Pipette **100 µL** of **Substrate Solution** to each well.
14. Incubate for **15 minutes** at room temperature.
15. Stop the enzymatic reaction by adding **50 µL** of **Stop Solution** to each well.
16. Measure the optical density (OD) of the solution in each well at **450 nm (reading) and at 620 nm to 630 nm (background subtraction, recommended)** with a microtiter plate reader.
It is recommended that the wells be read **within 10 minutes** after adding the *Stop Solution*.

6.3 Calculation of Results

1. The concentration of the samples can be read directly from the standard curve.
2. For duplicate determinations, the mean of the two optical density (OD) values for each standard, control, and patient sample must be taken. If the two values deviate substantially from one another, DEMEDITEC recommends retesting the samples.
3. Samples with concentrations exceeding the highest standard can be further diluted with *Standard 0* and re-assayed as described in "Test Procedure", or must be reported as > 20 ng/mL. For the calculation of the concentrations, this dilution factor must be considered.
(*Example: dilution 1:10: 10 µL sample + 90 µL Standard 0*)
4. Automated method:
The results in the instructions for use have been calculated automatically using a four-parameter logistic (4PL) curve fit. (4PL Rodbard or 4PL Marquardt are the preferred methods.) Other data reduction functions may give slightly different results.
5. Manual method:
Using linear or semi-logarithmic graph paper, construct a standard curve by plotting the (mean) OD obtained from each standard against its concentration with OD value on the vertical (Y) axis and concentration on the horizontal (X) axis.
Determine the corresponding sample concentration from the standard curve by using the (mean) OD value for each sample.

6.3.1 Example of Typical Standard Curve

The following data is for demonstration only and **cannot** be used in place of data generations at the time of assay.

Standard	Optical Density (450 nm)
Standard 0 (0.0 ng/mL)	0.03
Standard 1 (0.4 ng/mL)	0.08
Standard 2 (1.0 ng/mL)	0.16
Standard 3 (4.0 ng/mL)	0.55
Standard 4 (10 ng/mL)	1.27
Standard 5 (20 ng/mL)	2.28

7 REFERENCE VALUES

It is strongly recommended that each laboratory determines its own reference values.

In a study conducted with apparently healthy adults, using the DEMEDITEC AMH ELISA the following data were observed:

Population	n	Mean (ng/mL)	Median (ng/mL)	2.5 th - 97.5 th Percentile (ng/mL)	Range (min. - max.) (ng/mL)
Males	30	3.99	3.69	0.32 - 7.36	0.06 - 7.75
Females (20 - 29 years)	30	2.71	2.38	0.69 - 6.23	0.66 - 6.37
Females (30 - 39 years)	30	2.42	1.85	0.51 - 6.72	0.48 - 8.39
Females (40 - 49 years)	30	0.61	0.29	< 0.06 - 4.09	< 0.06 - 4.37

Median AMH values in women diagnosed with polycystic ovary syndrome (PCOS) were two- to four-fold higher compared to healthy women and did not markedly decline with increasing age. In women diagnosed with PCOS, a median of 7.19 ng/mL was observed in subjects aged 20–24 years, and a median of 6.46 ng/mL was observed in subjects aged 35–39 years. (11) For women with AMH values ≤ 0.681 ng/mL, the probability of a low antral follicle count (AFC 0-7) is 63%, the probability of belonging to the middle AFC group (8-15) is approximately 32%, and the probability of AFC > 15 is only 4.4%. (12, 13)

Values above or below reference range should be considered as suspicious and require additional testing. The results alone should not be the only reason for any therapeutic consequences. The results must be correlated to other clinical observations and diagnostic tests.

8 QUALITY CONTROL

Good quality assurance in the laboratory requires that controls be run with each calibration curve. A statistically significant number of controls should be assayed to establish mean values and acceptable ranges to assure proper performance. It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day-to-day validity of results. Use controls at both normal and pathological levels. The controls and the corresponding results of the Quality Control Laboratory are stated in the Certificate of Analyses (CoA) added to the kit. The values and ranges stated on the CoA always refer to the current kit lot and must be used for direct comparison of the results. If available, it is also recommended to make use of national or international Quality Assessment programs in order to ensure the accuracy of the results. Apply appropriate statistical methods for analyzing control values and trends. If the results of the assay do not agree with the established acceptable ranges of control materials, patient results should be considered invalid. In this case, please check the following technical areas: Pipetting and timing devices; photometer, expiration dates of reagents, storage and incubation conditions, aspiration and washing methods. After checking the above-mentioned items without finding any error contact your distributor or DEMEDITEC directly.

9 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

9.1 Specificity of Antibodies (Cross-Reactivity)

The following substances were tested for cross-reactivity of the assay:

Substance	Concentration Range of Spiked Substance (ng/mL)	Mean cross-reactivity (%)
AMH	0.40 – 10	100
Inhibin A	2.0 – 2000	0.03
Actvin AB	2.0 – 2000	0.27
LH	2.0 – 2000	0.18
FSH	2.0 – 2000	0.26
HCG	2.0 – 2000	0.12
TSH	2.0 – 2000	0.39
TGF-β1	2.0 – 2000	0.18
TGF-β2	2.0 – 2000	0.18
Prolactin	2.0 – 2000	0.38

9.2 Sensitivity

Limit of Blank (LoB)	0.044 ng/mL
Limit of Detection (LoD)	0.052 ng/mL
Limit of Quantification (LoQ)	0.062 ng/mL
Measuring range	0.052 ng/mL – 20.0 ng/mL
Linear range	0.19 ng/mL – 20 ng/mL

9.3 Reproducibility

9.3.1 Within-run Precision

The within-run precision was determined with 4 patient samples covering the complete measuring range in 1 run with 10 replicates. CV was calculated as mean CV of 10 replicates.

Sample	n	Mean (ng/mL)	CV (%)
1	10	0.22	7.3
2	10	0.67	3.1
3	10	5.76	2.4
4	10	15.88	2.6

9.3.2 Between-run Precision

The between-run precision was determined for 4 patient samples covering the measuring range in 3 independent runs on 3 days with 10 determinations. CV was calculated from 30 determinations.

Sample	n	Mean (ng/mL)	CV (%)
1	30	0.23	6.0
2	30	0.69	5.4
3	30	5.73	3.1
4	30	15.90	4.1

9.3.3 Between-lot Precision

The between-lot variation was determined by 6 measurements of different samples with 3 different kit lots.

Sample	n	Mean (ng/mL)	CV (%)
1	18	0.33	7.82
2	18	1.04	5.59
3	18	6.63	1.99
4	18	12.87	0.27

9.4 Recovery

Recovery was determined by adding increasing amounts of the analyte to different patient samples containing different amounts of endogenous analyte. The percentage recoveries were determined by comparing expected and measured values of the samples.

		Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4
Concentration (ng/mL)		0.20	0.70	5.85	15.89
Average Recovery (%)		98.8	97.5	97.0	98.5
Range of Recovery (%)	from	94.2	95.4	94.1	95.9
	to	101.8	100.3	101.1	100.8

9.5 Linearity

Samples containing different amounts of analyte were serially diluted with *Standard 0*. The percentage recovery was calculated by comparing the expected and measured values for the analyte.

		Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4
Concentration (ng/mL)		3.01	5.99	9.75	16.29
Average Recovery (%)		105.2	106.8	95.2	110.3
Range of Recovery (%)	from	94.7	102.4	94.5	106.6
	to	111.9	110.9	95.9	113.8

9.6 Method Comparison

A comparison of DEMEDITEC AMH ELISA (DE6141) (y) and the reference method Roche Elecsys® AMH Plus (x) using clinical samples gave the following correlation:

$$y = -0.1419 + 0.905x; \quad n = 52, r = 0.980$$

10 LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Reliable and reproducible results will be obtained when the assay procedure is performed with a complete understanding of the instructions for use and in compliance with the laboratory quality assurance guidelines.

Any improper handling of samples or modification of this test might influence the results.

10.1 Interfering Substances

Hemoglobin (up to 4 mg/mL), bilirubin (up to 0.5 mg/mL) and triglyceride (up to 7.5 mg/mL) have no influence on the assay results.

10.2 Drug Interferences

Until today no substances (drugs) are known to us, which have an influence on the measurement of AMH in a sample.

10.3 High-Dose-Hook Effect

"High-Dose Hook Effect" is not detected up to 400 ng/mL of AMH.

11 LEGAL ASPECTS

11.1 Reliability of Results

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover, the user must strictly adhere to the laboratory quality assurance guidelines and applicable national standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test. The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications. If there is any doubt or concern regarding a result, please contact DEMEDITEC.

11.2 Therapeutic Consequences

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as stated under point 11.1. Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of a patient. Only in cases where the laboratory results are in acceptable agreement with the overall clinical picture of the patient should therapeutic consequences be derived. The test result itself should never be the sole determinant for deriving any therapeutic consequences.

11.3 Liability

Any modification of the test kit and/or exchange or mixture of any components of different lots from one test kit to another could negatively affect the intended results and validity of the overall test. Such modification and/or exchanges invalidate any claim for replacement. Claims submitted due to customer misinterpretation of laboratory results subject to point 11.2 are also invalid. Regardless, in the event of any claim, the manufacturer's liability is not to exceed the value of the test kit. Any damage caused to the test kit during transportation is not subject to the liability of the manufacturer.

11.4 Reporting of Serious Incident

Any serious incident that has occurred in relation to the device shall be reported to the manufacturer and the competent authority of the Member State in which the user and/or the patient is established.

1 ZWECKBESTIMMUNG

Der **DEMEDIATEC AMH ELISA** ist ein manueller Enzymimmunoassay zur **quantitativen** Messung des Anti-Müller-Hormons (AMH) in Serum oder Plasma (EDTA- oder Lithium-Heparinplasma).

Für den Einsatz in der *In-vitro* Diagnostik. Für den beruflichen Gebrauch in Laboratorien.

Weitere Informationen zur bestimmungsgemäßen Verwendung finden Sie in der englischen Version der Gebrauchsanweisung.

2 TESTPRINZIP

Der DEMEDIATEC **AMH ELISA** ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay, der auf der **Sandwichtechnik** basiert. Die Wells der Mikrotiterplatten sind mit einem monoklonalen Antikörper (Maus) beschichtet, der gegen eine definierte Antikörper-Bindungsstelle des AMH-Moleküls gerichtet ist. Während der ersten Inkubation bindet das AMH-Molekül in der zugegebenen Probe an den immobilisierten Antikörper. Die Konjugatlösung, die gleichzeitig zugegeben wird und einen an Meerrettichperoxidase konjugierten AMH-Antikörper enthält, bindet an AMH unter Bildung eines Sandwich-Komplexes. Nach einem Waschschrift, um alle ungebundenen Substanzen zu entfernen, wird die feste Phase mit der Substratlösung inkubiert. Die Farbreaktion wird durch die Zugabe der Stopplösung beendet und die optische Dichte (OD) des resultierenden gelben Produktes gemessen. Die Intensität der Farbe ist proportional zur Konzentration des Analyten in der Probe. Durch Auftragen der OD-Werte gegen die Konzentrationen der Standards wird eine Standardkurve erstellt, und die Konzentrationen der unbekanntenen Proben werden anhand dieser Standardkurve bestimmt.

3 VORSICHTSMAßNAHMEN

1. Dieser Kit ist nur für den Einsatz in der In-vitro Diagnostik bestimmt. Nur für den professionellen Gebrauch in Laboratorien.
2. Bevor Sie mit dem Test beginnen, lesen Sie die Gebrauchsanweisung vollständig und sorgfältig durch. Verwenden Sie nur die gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung. Stellen Sie sicher, dass Sie alles verstanden haben.
3. Komponenten aus Kits mit unterschiedlichen Chargennummern dürfen nicht gemischt oder zusammen verwendet werden. Vertiefungen verschiedener Platten, auch aus derselben Charge, sollten nicht untereinander ausgetauscht werden. Die Kits können unter unterschiedlichen Bedingungen transportiert oder gelagert worden sein, so dass die Bindungscharakteristik der Platten leichte Unterschiede aufweisen kann.
4. Reagenzien nicht über das auf den Kit-Etiketten angegebene Verfallsdatum hinaus verwenden.
5. Mikrotitervertiefungen nicht wiederverwenden.
6. Reagenzien anderer Hersteller dürfen nicht zusammen mit den Reagenzien dieses Testkits verwendet werden.
7. Alle Reagenzien dieses Kits sind klare Lösungen, die Substratlösung ist klar und farblos. Veränderungen des Aussehens können die Durchführung des Tests beeinträchtigen. In diesem Fall wenden Sie sich bitte an DEMEDIATEC.
8. Eine mikrobielle Kontamination von Reagenzien oder Proben kann zu falschen Ergebnissen führen.
9. Lassen Sie die Reagenzien vor Testbeginn Raumtemperatur (20 °C bis 26 °C) erreichen. Die Temperatur wirkt sich auf die Messungen der optischen Dichte des Assays aus. Die Werte für die Patientenproben werden jedoch nicht beeinflusst.
10. Alle im Kit-Protokoll angegebenen Volumina müssen genau eingehalten werden. Optimale Ergebnisse können nur durch Verwendung kalibrierter Pipetten und Mikrotiterplatten-Lesegeräte erreicht werden.
11. Behältnisse jeweils nur für ein einziges Reagenz verwenden. Dies gilt insbesondere für die Substrat-Behälter. Die Verwendung eines Behälters zum Pipettieren der Substratlösung, der zuvor für die Konjugatlösung verwendet wurde, kann zu einer Verfärbung der Lösung führen. Geben Sie keine Reagenzien zurück in die Originalfläschchen, da es zu einer Kontamination der Reagenzien kommen kann.

Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen

1. Befolgen Sie die Richtlinien zur Qualitätssicherung und zur Sicherheit im Labor.
2. Niemals mit dem Mund pipettieren und den Kontakt von Reagenzien und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
3. In Bereichen, in denen mit Kitbestandteilen oder Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen, trinken oder Kosmetika verwenden.
4. Beim Umgang mit Proben und Reagenzien sind Laborkittel und Einweg-Latexhandschuhe sowie, falls erforderlich, eine Schutzbrille zu tragen.

Informationen zur biologischen Gefährdung

1. Alle Bestandteile dieses Testkits, die humanes Serum oder Plasma enthalten, wurden mit FDA-geprüften Methoden auf HIV I/II, HbsAg und HCV getestet und als negativ bestätigt. Kein bekanntes Testverfahren kann jedoch mit absoluter Sicherheit ausschließen, dass kein Infektionserreger vorhanden ist.
2. Das Produkt enthält Material tierischen Ursprungs, das nachweislich frei von infektiösen oder ansteckenden Krankheiten und schädigenden Parasiten ist.
3. Komponenten von Rindern stammen aus Ländern, in denen keine BSE (Bovine Spongiforme Enzephalopathie) gemeldet wurde.
4. Alle Materialien und Proben menschlichen oder tierischen Ursprungs müssen so behandelt werden, als ob sie ansteckende Krankheiten übertragen könnten.
5. Die Handhabung muss in Übereinstimmung mit den Verfahren erfolgen, die in den entsprechenden nationalen Richtlinien oder Vorschriften für Biogefährdung und Sicherheit festgelegt sind. Abfälle müssen gemäß den lokalen Regeln und Vorschriften entsorgt werden.

Informationen zu chemischen Gefahren und zur Gefahreinstufung

1. Einige Reagenzien enthalten Konservierungsmittel in nicht kennzeichnungspflichtiger Konzentrationen. Bei Kontakt der Reagenzien mit den Augen oder der Haut dennoch sofort mit ausreichend Wasser spülen.
2. Die Substratlösung enthält einen Inhaltsstoff in nicht kennzeichnungspflichtiger Konzentration, der schwere Augenreizungen verursacht. Bei möglichem Kontakt mit den Augen sofort sorgfältig und gründlich mit Augenspülung oder Wasser spülen. Bei Berührung mit der Haut mit reichlich Wasser abwaschen. Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor Wiederverwendung waschen.
3. Kontakt mit der Stopplösung (*Stop Solution*) vermeiden, da sie < 5 % H₂SO₄ enthält. Schwefelsäure kann Hautreizungen und -verätzungen verursachen.
4. Chemikalien und zubereitete oder gebrauchte Reagenzien müssen als gefährlicher Abfall gemäß den nationalen Sicherheitsrichtlinien oder -vorschriften behandelt werden.
5. Dieses Produkt enthält keine Stoffe, die krebserregende, erbgutverändernde oder fortpflanzungsgefährdende Eigenschaften (CMR) haben.

Alle Reagenzien dieses Testkits enthalten KEINE gefährlichen Stoffe in deklarationspflichtigen Konzentrationen, eine Einstufung und Kennzeichnung ist nicht erforderlich.

Ausführliche Informationen entnehmen Sie bitte dem Sicherheitsdatenblatt, das Sie auf Anfrage direkt bei DEMEDITEC erhalten.

4 MATERIALIEN

4.1 Im Kit mitgelieferte Materialien

- SORB MT Microtiterwells**, 12 x 8 Wells (einzeln brechbar), gebrauchsfertig;
Mit anti-AMH-Antikörper (monoklonal) beschichtet.
- CAL 0 – 5 Standard (Standard 0 - 5)**, 6 x 1 mL, gebrauchsfertig;
Konzentrationen: 0,0 – 0,4 – 1,0 – 4,0 – 10 – 20 ng/mL
Umrechnungsfaktor: 1 ng/mL = 7,14 pmol/L
Kalibriert gegen folgendes Referenzmaterial: 1st WHO International Reference Reagent, Mullerian Inhibiting Substance/Anti-Mullerian Hormone, NIBSC code: 16/190.
- CONTROL low & high Control Low & High** (Kontrolle), 2 x 1 mL, gebrauchsfertig;
Kontrollwerte und -bereiche entnehmen Sie bitte dem „Certificate of Analysis“.
- ENZ CONJ Enzyme Conjugate** (Enzymkonjugat), 1 x 14 mL, gebrauchsfertig;
Anti-AMH-Antikörper mit Meerrettichperoxidase konjugiert; rot gefärbt.
- SUB TMB Substrate Solution** (Substratlösung); 1 x 14 mL, gebrauchsfertig;
enthält 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB). *Von direktem Sonnenlicht fernhalten.*
- STOP SOLN Stop Solution** (Stopplösung), 1 x 14 mL, gebrauchsfertig;
enthält < 5 %H₂SO₄. *Kontakt mit der Stopplösung vermeiden! Kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.*
- WASH SOLN 40x Wash Solution** (Waschlösung, 40X-Konzentrat), 1 x 30 mL; *Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.*

Gebrauchsanweisung (IFU), 1x

Analysezertifikat, 1x

* Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.

4.2 Erforderliche, aber nicht enthaltene Materialien

- Kalibriertes Mikrotiterplattenlesegerät (450 nm, mit Referenzwellenlänge bei 620 nm bis 630 nm)
- Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipetten
- Manuelle oder automatische Waschvorrichtung für Mikrotiterplatten
- Saugfähiges Papier
- Destilliertes Wasser
- Laborwecker
- Millimeterpapier oder Software zur Datenauswertung

4.3 Lagerung und Haltbarkeit des Kits

Ungeöffnete Kits und Reagenzien sowie **geöffnete Reagenzien** müssen bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden.

Die Mikrotiterplatte muss immer in dem wiederverschließbaren Aluminiumbeutel, der ein Trockenmittel enthält, gelagert werden. Öffnen Sie den Beutel erst, wenn er Raumtemperatur erreicht hat. Die Mikrotiterplatte besteht aus 12 einzelnen Streifen. Jeder Streifen kann in 8 einzelne Kavitäten (Wells) unterteilt werden. Nicht benötigte Kavitäten müssen sofort in den Aluminiumbeutel mit dem Trockenmittel zurückgegeben und wieder dicht verschlossen bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden.

Einmal geöffnete Reagenzfläschchen müssen wieder fest verschlossen werden.

	Lagerungstemperatur	Stabilität
Ungeöffneter Kit und ungeöffnete Reagenzien	2 °C bis 8 °C	Bis zu dem auf dem Etikett aufgedruckten Verfallsdatum. Reagenzien nach Ablauf dieses Datums nicht mehr verwenden!
Geöffneter Kit	2 °C bis 8 °C	8 Wochen

4.4 Vorbereitung der Reagenzien

Alle Reagenzien und die benötigte Anzahl der Mikrotiterstreifen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur (20 °C bis 26 °C) bringen.

Wash Solution

Fügen Sie der 40-fach konzentrierten Waschlösung (*Wash Solution*) destilliertes Wasser hinzu.

30 mL der konzentrierten Waschlösung mit 1170 mL destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 1200 mL verdünnen.

Stabilität nach Verdünnung:	bei 20 °C bis 26 °C	1 Woche
-----------------------------	---------------------	---------

4.5 Entsorgung des Kits

Die Entsorgung des Kits und aller verwendeten Materialien / Reagenzien muss gemäß den nationalen gesetzlichen Vorschriften erfolgen. Spezielle Informationen für dieses Produkt finden Sie im Sicherheitsdatenblatt, Abschnitt 13.

4.6 Beschädigte Testkits

Im Falle einer Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss die Firma DEMEDITEC in schriftlicher Form spätestens eine Woche nach Erhalt des Kits informiert werden. Beschädigte Einzelkomponenten dürfen nicht für den Testlauf verwendet werden. Sie müssen aufbewahrt werden, bis eine endgültige Lösung gefunden wurde. Danach sollten Sie gemäß den offiziellen Richtlinien entsorgt werden.

5 ENTNAHME, LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER PROBEN

Das folgende Probenmaterial kann in diesem Test eingesetzt werden:

Humanes Serum oder Plasma (EDTA- oder Lithium-Heparinplasma)

Proben, die Natriumazid enthalten, sollten nicht verwendet werden.

Generell sollte die Verwendung von hämolytischen, ikterischen oder lipämischen Proben vermieden werden. Weitere Informationen finden Sie im Kapitel „*Interferenzen*“.

5.1 Probenentnahme

Serum:

Blut durch Venenpunktion entnehmen (z.B. mit Sarstedt Monovette für Serum), gerinnen lassen und das Serum durch Zentrifugation bei Raumtemperatur abtrennen. Vor der Zentrifugation muss die Gerinnung vollständig abgeschlossen sein. Bei Patienten, die Antikoagulantien erhalten, kann die Gerinnungszeit länger dauern.

Plasma:

Die Blutentnahme erfolgt mit Röhrchen, die ein Antikoagulanzen enthalten (z.B.: Sarstedt Monovette – mit entsprechender Plasma-Präparierung). Das Plasma wird als Überstand nach einer Zentrifugation gewonnen.

Vollblut sollte vor der Zentrifugation nicht eingefroren werden.

5.2 Probenlagerung

Die Proben müssen bis zur Durchführung des Tests fest verschlossen aufbewahrt werden. Wenn sie gefroren gelagert werden, nur einmal einfrieren. Aufgetaute Proben müssen vor dem Test mehrmals geschwenkt werden.

Stabilität:	bei 2 °C bis 8 °C	7 Tage
	bei -20 °C (in Aliquoten)	bis zu 3 Monate

5.3 Probenvorbereitung

Die Proben können ohne zusätzliche Vorbereitung analysiert werden.

6 TESTDURCHFÜHRUNG

6.1 Allgemeine Hinweise

- Alle Reagenzien und Proben müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur (20 °C bis 26 °C) gebracht werden.
- Alle Reagenzien müssen ohne Schaumbildung gemischt werden.
- Die Kappen der Reagenzfläschchen dürfen nicht vertauscht werden, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.
- Für jeden Standard, jede Kontrolle oder Probe eine neue Einweg-Plastikspitze verwenden, um Verschleppungen zu vermeiden.
- Mischen Sie den Inhalt der Mikrotiterplatten-Vertiefungen gründlich, um gute Testergebnisse zu gewährleisten.
- Kavitäten während der Testdurchführung nicht trocknen lassen; Reagenzien unmittelbar nach Ende des Waschschriffs hinzufügen.
- Sobald der Test begonnen wurde, müssen alle Schritte ohne Unterbrechung und in der gleichen Reihenfolge für jeden Schritt abgeschlossen werden.
- Die enzymatische Reaktion ist linear proportional zu Zeit und Temperatur.

- Die optische Dichte ist eine Funktion der Inkubationszeit und -temperatur. Die in Kapitel "Testverfahren" angegebenen Inkubationszeiten und -temperaturen müssen eingehalten werden.
- Es wird empfohlen, vor Beginn der Testdurchführung alle Reagenzien in einen arbeitsbereiten Zustand zu bringen, die Deckel der Fläschchen zu öffnen, alle benötigten Wells in den Halter zu setzen, usw. Nur eine solche Vorbereitung garantiert für jeden Pipettierschritt gleiche Zeiten ohne Unterbrechung.
- **Wichtiger Hinweis zum Waschvorgang:**
Das Waschen ist entscheidend. Unsachgemäß gewaschene Kavitäten führen zu fehlerhaften Ergebnissen. Die Sensitivität und Präzision dieses Assays wird erheblich beeinflusst von der korrekten Durchführung des Waschschrilles!
- **Testdurchführung mit vollautomatischen Analysegeräten:**
Eine automatisierte Testdurchführung mit vollautomatischen, systemoffenen Analysegeräten ist möglich. Die Kombination muss jedoch vom Anwender validiert werden.

6.2 Testdurchführung

Jeder Lauf muss eine Standardkurve beinhalten. Die Kontrollen dienen der internen Überprüfung der Zuverlässigkeit des Testverfahrens. Sie müssen bei jedem Testdurchlauf gemessen werden. Das angegebene Testverfahren beschreibt die manuelle Abarbeitung.

- Die benötigte Anzahl der Mikrotiter-Wells in der Halterung befestigen.
- Je 25 µL Standard, Control und Probe** mit neuen Plastikspitzen in die entsprechenden Wells pipettieren.
- 100 µL Enzyme Conjugate** in jedes Well zugeben.
Für 10 Sekunden gut schütteln. Es ist sehr wichtig, in diesem Schritt eine komplette Durchmischung zu erreichen.
- 60 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
- Die Vertiefungen folgendermaßen waschen:
Wenn der Waschschrille manuell durchgeführt wird:
Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln.
Wells **3-mal** mit **300 µL** verdünnter *Wash Solution* pro Well waschen.

Bei Verwendung eines Waschautomaten:
Wells **3-mal** mit **400 µL** verdünnter *Wash Solution* pro Well waschen.

Am Ende des Waschschrilles die Vertiefungen immer kräftig auf saugfähigem Papier ausklopfen, um verbliebene Flüssigkeit zu entfernen.
- 100 µL Substrate Solution** in jedes Well pipettieren.
- 15 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
- Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von **50 µL Stop Solution** in jedes Well abstoppen.
- Die Optische Dichte (OD) der Lösung in jedem Well bei **450 nm (Messung) und 620 nm bis 630 nm (Abzug des Hintergrundes, empfohlen)** mit einem Mikrotiterplattenleser bestimmen.
Es wird empfohlen, die Vertiefungen **innerhalb von 10 Minuten** nach Zugabe der Stopplösung abzulesen.

6.3 Ergebnisermittlung

- Die Konzentration der Proben kann direkt von der Standardkurve abgelesen werden.
- Bei Doppelbestimmungen muss für jeden Standard, jede Kontrolle und Patientenproben der Mittelwert der beiden OD-Werte verwendet werden. Weichen die beiden Werte erheblich voneinander ab, empfiehlt DEMEDITEC, die Proben erneut zu testen.
- Proben mit Konzentrationen, die den höchsten Standard überschreiten, können mit *Standard 0* weiter verdünnt und wie unter "Testdurchführung" beschrieben erneut gemessen werden oder müssen als > 20 ng/mL angegeben werden. Bei der Berechnung der Konzentrationen muss dieser Verdünnungsfaktor berücksichtigt werden.
(*Beispiel:* Verdünnung 1:10: 10 µL Probe + 90 µL *Standard 0*)
- Automatische Methode:
Die in der Gebrauchsanweisung angegebenen Ergebnisse wurden automatisch mit Hilfe der 4-Parameter-Gleichung bestimmt. (4-Parameter-Rodbard oder 4-Parameter-Marquardt sind die bevorzugten Methoden.) Andere Auswertungsfunktionen können leicht abweichende Werte ergeben.
- Manuelle Methode:
Erstellen Sie unter Verwendung von linearem oder halblogarithmischem Millimeterpapier eine Standardkurve, indem Sie die (mittlere) OD jedes Standards gegen seine Konzentration auftragen, wobei der OD-Wert auf der vertikalen (Y) Achse und die Konzentration auf der horizontalen (X)

Achse liegt. Bestimmen Sie die entsprechende Probenkonzentration anhand der Standardkurve, indem Sie den (mittleren) OD-Wert für jede Probe verwenden.

6.3.1 Beispiel einer typischen Standardkurve

Die folgenden Daten dienen nur zur Orientierung und dürfen **nicht** anstelle der Datengenerierung zum Zeitpunkt des Tests verwendet werden.

Standard	Optische Dichte (450 nm)
Standard 0 (0,0 ng/mL)	0,03
Standard 1 (0,4 ng/mL)	0,08
Standard 2 (1,0 ng/mL)	0,16
Standard 3 (4,0 ng/mL)	0,55
Standard 4 (10 ng/mL)	1,27
Standard 5 (20 ng/mL)	2,28

7 REFERENZWERTE

Es wird dringend empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzwerte ermittelt.

In einer Studie mit dem DEMEDITEC AMH ELISA wurden die Proben von scheinbar gesunden Erwachsenen untersucht. Dabei ergaben sich folgende Werte:

Population	n	Mittelwert (ng/mL)	Median (ng/mL)	2,5. - 97,5. Perzentile (ng/mL)	Bereich (min. - max.) (ng/mL)
Männer	30	3,99	3,69	0,32 - 7,36	0,06 - 7,75
Frauen (20 - 29 Jahre)	30	2,71	2,38	0,69 - 6,23	0,66 - 6,37
Frauen (30 - 39 Jahre)	30	2,42	1,85	0,51 - 6,72	0,48 - 8,39
Frauen (40 - 49 Jahre)	30	0,61	0,29	< 0,06 - 4,09	< 0,06 - 4,37

Die Median-AMH-Werte von Frauen, bei denen ein polyzystisches Ovarialsyndrom (PCOS) diagnostiziert wurde, waren im Vergleich zu gesunden Frauen zwei- bis viermal höher und gingen mit zunehmendem Alter nicht merklich zurück. Bei Frauen mit diagnostiziertem PCOS wurde bei Probanden im Alter von 20 bis 24 Jahren ein Median von 7,19 ng/mL und bei Probanden im Alter von 35 bis 39 Jahren ein Median von 6,46 ng/mL beobachtet. (11) Bei Frauen mit AMH \leq 0,681 ng/mL beträgt die Wahrscheinlichkeit einer niedrigen Antralfollikelzahl (AFC 0-7) 63%, die Wahrscheinlichkeit, zur mittleren AFC-Gruppe (8-15) zu gehören, etwa 32% und die Wahrscheinlichkeit einer AFC > 15 beträgt nur 4,4%. (12, 13) Die mit diesem Testkit erzielten Ergebnisse sollten niemals als alleinige Grundlage für therapeutische Konsequenzen dienen. Werte, die über oder unter dem Referenzbereich liegen, sollten als verdächtig angesehen werden und erfordern zusätzliche Untersuchungen. Die Ergebnisse müssen zusammen mit anderen klinischen Befunden und diagnostischen Tests des Patienten interpretiert werden.

8 QUALITÄTSKONTROLLE

Eine gute Qualitätssicherung im Labor erfordert, dass mit jeder Standardkurve Kontrollen mitgeführt werden. Eine statistisch signifikante Anzahl von Kontrollen sollte gemessen werden, um Mittelwerte und Akzeptanzbereiche zu ermitteln und damit eine korrekte Testdurchführung zu gewährleisten. Es wird empfohlen, die Kontrollproben gemäß den nationalen gesetzlichen Bestimmungen einzusetzen. Durch die Verwendung von Kontrollproben wird eine Tag-zu-Tag-Überprüfung der Ergebnisse erzielt. Es sollten Kontrollen sowohl mit normalem als auch pathologischem Level eingesetzt werden. Die Kontrollen mit den entsprechenden Ergebnissen des QC-Labors sind im Analysenzertifikat (CoA), das dem Kit beiliegt, aufgeführt. Die im CoA angegebenen Werte und Bereiche beziehen sich stets auf die aktuelle Kitcharge und sollen zum direkten Vergleich der Ergebnisse verwendet werden. Falls verfügbar, wird ebenfalls empfohlen, an nationalen oder internationalen Qualitätssicherungsprogrammen teilzunehmen, um die Genauigkeit der Ergebnisse zu sichern. Es sollten geeignete statistische Methoden zur Analyse von Kontrollwerten und Trends angewendet werden. Wenn die Ergebnisse des Assays nicht mit den angegebenen Akzeptanzbereichen des Kontrollmaterials übereinstimmen, sollten die Patientenergebnisse als ungültig eingestuft werden. In diesem Fall überprüfen Sie bitte die folgenden Bereiche: Pipetten und Zeitnehmer, Photometer, Verfallsdaten der Reagenzien, Lagerungs- und Inkubationsbedingungen, Absaug- und Waschmethode. Sollten nach Überprüfung der vorgenannten Bereiche keine Fehler erkennbar sein, setzen Sie sich bitte mit Ihrem Lieferanten oder direkt mit der Firma DEMEDITEC in Verbindung.

9 LEISTUNGSMERKMALE

9.1 Spezifität der Antikörper (Kreuzreaktivität)

Ausführliche Informationen zu den getesteten Substanzen finden Sie in der englischen Version der Gebrauchsanweisung.

9.2 Sensitivität

„Limit of Blank“ (LoB)	0,044 ng/mL
Nachweisgrenze (LoD)	0,052 ng/mL
Quantifizierungsgrenze (LoQ)	0,062 ng/mL
Messbereich	0,052 ng/mL – 20,0 ng/mL
Linearer Bereich	0,19 ng/mL – 20 ng/mL

Die Daten zu:

9.3 Reproduzierbarkeit (Präzision)

9.4 Wiederfindung

9.5 Linearität

9.6 Methodenvergleich

entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Version der Gebrauchsanweisung.

10 GRENZEN DES VERFAHRENS

Zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse werden erzielt, wenn das Testverfahren mit vollständigem Verständnis der Gebrauchsanweisung und unter Einhaltung der Richtlinien zur Qualitätssicherung im Labor durchgeführt wird. Jede unsachgemäße Handhabung der Proben oder eine Modifikation dieses Tests kann die Ergebnisse beeinflussen.

10.1 Störsubstanzen

Hämoglobin (bis zu 4 mg/mL), Bilirubin (bis zu 0,5 mg/mL) und Triglyceride (bis zu 7,5 mg/mL) haben keinen Einfluss auf das Testergebnis.

10.2 Beeinflussung durch Medikamente

Zurzeit sind uns keine Substanzen (Medikamente) bekannt, die einen Einfluss auf die Bestimmung von AMH in einer Probe haben.

10.3 High-Dose-Hook Effekt

Ein Hook-Effekt tritt in diesem Test bis zu einer Konzentration von 400 ng/mL AMH nicht auf.

11 RECHTLICHE GRUNDLAGEN

11.1 Zuverlässigkeit der Ergebnisse

Der Test muss exakt gemäß der Testanleitung des Herstellers abgearbeitet werden. Darüber hinaus muss der Anwender die Richtlinien zur Qualitätssicherung im Labor und anwendbare nationale Normen und/oder Gesetze strikt einhalten. Dies betrifft besonders den Gebrauch der Kontrollreagenzien. Es ist sehr wichtig, bei der Testdurchführung stets eine ausreichende Anzahl Kontrollen zur Überprüfung der Genauigkeit und Präzision mitzuführen. Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn alle Kontrollen in den vorgegebenen Bereichen liegen, und wenn alle anderen Testparameter die vorgegebenen Spezifikationen für diesen Assay erfüllen. Wenn bezüglich eines Ergebnisses Zweifel oder Bedenken bestehen, setzen Sie sich bitte mit der Firma DEMEDITEC in Verbindung.

11.2 Therapeutische Konsequenzen

Therapeutische Konsequenzen sollten keinesfalls nur aufgrund von Laborergebnissen erfolgen, selbst dann nicht, wenn alle Testergebnisse mit den in 11.1 genannten Voraussetzungen übereinstimmen. Jedes Laborergebnis ist nur ein Teil des klinischen Gesamtbildes eines Patienten.

Nur in Fällen, in denen die Laborergebnisse in akzeptabler Übereinstimmung mit dem allgemeinen klinischen Bild des Patienten stehen, sollten therapeutische Konsequenzen eingeleitet werden.

Das Testergebnis allein sollte niemals als alleinige Grundlage für die Einleitung therapeutischer Konsequenzen dienen.

11.3 Haftung

Jegliche Veränderungen des Testkits und/oder Austausch oder Vermischung von Komponenten unterschiedlicher Chargen von einem Testkit zu einem anderen, können die gewünschten Ergebnisse und die Gültigkeit des gesamten Tests negativ beeinflussen. Solche Veränderungen und/oder Austausch haben den Ausschluss jeglicher Ersatzansprüche zur Folge.

Reklamationen, die aufgrund von Falschinterpretation von Laborergebnissen durch den Kunden gemäß Punkt 11.2 erfolgen, sind ebenfalls abzuweisen. Im Falle jeglicher Reklamation ist die Haftung des Herstellers maximal auf den Wert des Testkits beschränkt. Jegliche Schäden, die während des Transports am Kit entstanden sind, unterliegen nicht der Haftung des Herstellers.

11.4 Meldung von schwerwiegenden Vorkommnissen

Jedes schwerwiegende Vorkommnis im Zusammenhang mit dem Produkt ist dem Hersteller und der zuständigen Behörde des Mitgliedstaats, in dem der Anwender und/oder der Patient niedergelassen ist, zu melden.

1 DESTINAZIONE D'USO

DEMEDIATEC AMH ELISA è un test immunoenzimatico manuale per la misurazione **quantitativa** d'ormone anti-Mülleriano (Anti-Müllerian Hormone, AMH) nel siero o nel plasma umano (EDTA o eparina di litio).

Per uso diagnostico *in vitro*. Per uso professionale di laboratorio.

Per ulteriori informazioni sulla destinazione d'uso, consultare le istruzioni per l'uso in inglese.

2 PRINCIPIO DEL TEST

Il test DEMEDIATEC AMH ELISA è un dosaggio immuno-assorbente legato a un enzima a fase solida (ELISA) basato sul **principio sandwich**. I pozzetti per microtitolazione sono rivestiti con un anticorpo monoclonale (topo) diretto verso un sito antigenico unico della molecola di AMH. Durante la prima incubazione, l'analita AMH nel campione aggiunto si lega all'anticorpo immobilizzato. Il coniugato enzimatico aggiunto simultaneamente, che contiene un anticorpo anti-AMH coniugato alla perossidasi di rafano, si lega all'analita AMH formando un complesso sandwich. Dopo una fase di lavaggio per rimuovere tutte le sostanze non legate, la fase solida viene incubata con la soluzione di substrato. La reazione colorimetrica viene bruscamente interrotta con l'aggiunta di soluzione di arresto e viene misurata la densità ottica (DO) del prodotto giallo risultante. L'intensità della colorazione è proporzionale alla concentrazione dell'analita nel campione. Una curva standard viene costruita tracciando i valori di DO rispetto alle concentrazioni di standard; le concentrazioni di campioni sconosciuti vengono determinate usando questa curva standard.

3 AVVERTENZE E PRECAUZIONI

1. Questo kit è solo per uso diagnostico *in vitro*. Solo per uso professionale di laboratorio.
2. Prima di avviare il dosaggio, leggere completamente e attentamente le istruzioni per l'uso. Utilizzare la versione valida delle istruzioni per l'uso fornita con il kit. Assicurarsi che tutto sia stato compreso.
3. Non miscelare o utilizzare componenti provenienti da kit con un diverso numero di lotto. Si raccomanda di non scambiare pozzetti di piastre diverse, anche se dello stesso lotto. I kit potrebbero essere stati spediti o conservati in condizioni differenti e le caratteristiche di legame delle piastre potrebbero essere leggermente diverse.
4. Non utilizzare reagenti oltre la data di scadenza riportata sulle etichette del kit.
5. Non riutilizzare i pozzetti di microtitolazione.
6. Non usare reagenti di altri produttori in combinazione con i reagenti di questo kit di test.
7. Tutti i reagenti di questo kit sono liquidi trasparenti; la soluzione di substrato è trasparente e incolore. Modifiche nell'aspetto possono influenzare le prestazioni del test. In questo caso, contattare DEMEDIATEC.
8. La contaminazione microbica dei reagenti o dei campioni può dare risultati falsi.
9. Prima di avviare il test, attendere che i reagenti raggiungano la temperatura ambiente (da 20 °C a 26 °C). La temperatura influenza le letture della densità ottica del dosaggio. Tuttavia, i valori relativi ai campioni dei pazienti non verranno influenzati.
10. Usare i volumi indicati secondo quanto previsto dal protocollo. I risultati ottimali del test si ottengono solo utilizzando pipette calibrate e lettori di piastre per microtitolazione.
11. Utilizzare serbatoi solo per reagenti singoli. Ciò vale in particolare per i serbatoi per il substrato. L'utilizzo di un serbatoio per l'erogazione di una soluzione di substrato precedentemente usato per la soluzione di coniugato potrebbe causare una colorazione della soluzione. Non versare nuovamente i reagenti nelle fiale originali, poiché potrebbe verificarsi una contaminazione.

Precauzioni generali

1. Seguire le linee guida per la garanzia di qualità e la sicurezza in laboratorio.
2. Non pipettare mai a bocca ed evitare il contatto dei reagenti e dei campioni con la pelle e le mucose.
3. Non fumare, mangiare, bere o applicare cosmetici nelle aree dove vengono manipolati campioni o reagenti del kit.
4. Quando si maneggiano campioni e reagenti, indossare camici da laboratorio e guanti in lattice monouso e occhiali di sicurezza ove necessario.

Informazioni sul rischio biologico

1. Tutti i reagenti di questo kit che contengono siero o plasma umano sono stati testati e confermati negativi rispetto a HIV I/II, HBsAg e HCV usando procedure approvate dalla FDA. Tuttavia, nessun metodo noto può garantire con certezza assoluta che non sia presente alcun agente infettivo.
2. Il dispositivo contiene materiale di origine animale, certificato come apparentemente privo di malattie infettive o contagiose e parassiti nocivi.
3. I componenti bovini provengono da paesi in cui non è stata segnalata la BSE (Encefalopatia spongiforme bovina).
4. Maneggiare tutti i materiali e i campioni di origine umana o animale come potenziali fonti di malattie infettive.
5. Manipolare in conformità con le procedure definite dalle linee guida o dai regolamenti nazionali in materia di rischio biologico e sicurezza. Smaltire i rifiuti secondo le norme e i regolamenti locali.

Informazioni sul rischio chimico e sulla classificazione dei pericoli

1. Alcuni reagenti contengono conservanti in concentrazioni non dichiarabili. Tuttavia, in caso di contatto con gli occhi o la pelle, sciacquare immediatamente con acqua.
2. La soluzione di substrato contiene un ingrediente in concentrazioni non dichiarabili che provoca grave irritazione oculare. In caso di contatto con gli occhi, sciacquare subito accuratamente ed abbondantemente con una soluzione di lavaggio oculare o acqua. Dopo il contatto con la pelle, lavare abbondantemente con acqua. Togliere gli indumenti contaminati e lavarli prima di riutilizzarli.
3. Evitare il contatto con la soluzione di arresto contenente < 5 % H₂SO₄. Può provocare irritazioni e ustioni alla pelle.
4. Trattare i prodotti chimici e i reagenti preparati o usati come rifiuti pericolosi secondo le linee guida o i regolamenti nazionali sulla sicurezza.
5. Questo prodotto non contiene sostanze con proprietà cancerogene, mutagene o tossiche per la riproduzione (CMR).

Tutti i reagenti di questo kit di test NON contengono sostanze pericolose in concentrazioni da dichiarare; non è richiesta una classificazione ed etichettatura.

Per informazioni dettagliate fare riferimento alla Scheda di Sicurezza, disponibile su richiesta direttamente da DEMEDITEC.

4 MATERIALI

Materiali forniti nel kit

- SORB** **MT** **Microtiterwells** (Micropozetti), 12 x 8 pozzetti (separabili), Piastra per microtitolazione. Rivestita di anticorpo anti-AMH (monoclonale); Pronto all'uso.
- CAL** **0** – **5** **Standard (Standard 0 - 5)**, 6 x 1 mL, Standard *;
Concentrazioni: 0,0 – 0,4 – 1,0 – 4,0 – 10 – 20 ng/mL
Conversione 1 ng/mL = 7,14 pmol/L
Calibrato rispetto al seguente materiale di riferimento: 1st WHO International Reference Reagent, Mullerian Inhibiting Substance/Anti-Mullerian Hormone, NIBSC code: 16/190; Pronto all'uso.
- CONTROL** **low** & **high** **Control Low & High** 2 x 1 mL, Controlli *; *Per gli intervalli e i valori di controllo vedere l'etichetta della fiala o il certificato di analisi (CoA); Pronto all'uso.*
- ENZ** **CONJ** **Enzyme Conjugate** 1 x 14 mL, Coniugato enzimatico *; Anticorpo anti-AMH coniugato con perossidasi di rafano; Colorata di rosso; Pronto all'uso.
- SUB** **TMB** **Substrate Solution** 1 x 14 mL, Soluzione di substrato Contiene 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). *Conservare al riparo dalla luce solare diretta; Pronto all'uso.*
- STOP** **SOLN** **Stop Solution** 1 x 14 mL, Soluzione di arresto Contiene < 5 % H₂SO₄. *Evitare il contatto con la soluzione di arresto. Potrebbe causare irritazioni cutanee e ustioni; Pronto all'uso.*
- WASH** **SOLN** **40x** **Wash Solution** 1 x 30 mL, Soluzione di lavaggio, Concentrato 40X *; *Vedere "Preparazione dei reagenti".*

Istruzioni per l'uso (IFU), 1x

Certificato di analisi (CoA), 1x

* Contiene un conservante privo di mercurio.

Materiali necessari ma non forniti

- Lettore di piastre per microtitolazione calibrato (450 nm, con lunghezza d'onda di riferimento tra 620 nm e 630 nm)
- Micropipette a precisione variabile, calibrate
- Dispositivo di lavaggio manuale o automatico per piastre per microtitolazione
- Carta assorbente
- Acqua distillata
- Timer
- Carta millimetrata o software per il calcolo dei dati

Conservazione e stabilità del kit

I kit e i reagenti non aperti e i reagenti aperti devono essere conservati a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C.

La micropiastra deve sempre essere conservata nel sacchetto richiudibile in alluminio contenente un essiccante. Non aprire il sacchetto finché non ha raggiunto la temperatura ambiente. La piastra per microtitolazione è costituita da 12 strisce singole. Ogni striscia può essere suddivisa in 8 pozzetti singoli. I pozzetti inutilizzati devono essere immediatamente riposti nel sacchetto in alluminio contenente l'essiccante, richiusi ermeticamente e conservati a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C.

Dopo l'apertura, le fiale di reagente devono essere nuovamente chiuse ermeticamente.

	Temperatura di conservazione	Stabilità
Kit non aperto e reagenti non aperti	2 °C a 8 °C	Fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta. Non utilizzare i reagenti dopo questa data!
Kit aperti	2 °C a 8 °C	8 settimane

Preparazione dei reagenti

Prima dell'uso portare tutti i reagenti e il numero necessario di pozzetti a temperatura ambiente (20 °C a 26 °C).

Soluzione di lavaggio

Aggiungere acqua distillata alla soluzione di lavaggio con concentrazione di 40X.

Diluire 30 mL soluzione di lavaggio concentrata con 1170 mL di acqua distillata fino a un volume finale di 1200 mL.

Stabilità dopo la diluizione:	da 20 °C a 26 °C	1 settimana
-------------------------------	------------------	-------------

Smaltimento del kit

Lo smaltimento del kit e di tutti i materiali/reagenti usati deve essere effettuato nel rispetto delle normative nazionali. Informazioni specifiche su questo prodotto sono riportate nella Scheda di Sicurezza, sezione 13.

Kit di test danneggiati

In caso di danni al kit del test o ai componenti, DEMEDITEC deve essere informato per iscritto, al più tardi una settimana dopo la ricezione del kit. I singoli componenti danneggiati non devono essere utilizzati per i test. Devono essere invece conservati fino a quando non è stata individuata una soluzione definitiva. Successivamente potranno essere smaltiti secondo le norme in vigore.

5 PRELIEVO, CONSERVAZIONE E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

In questo test è possibile utilizzare il seguente materiale campione:

Siero o plasma umano (EDTA o litio eparina)

Campioni contenenti azoturo di sodio non devono essere utilizzati nel dosaggio.

In generale si dovrebbe evitare l'uso di campioni emolitici, itterici o lipemici. Per ulteriori informazioni consultare il capitolo "Sostanze interferenti".

Prelievo dei campioni

Siero: Prelevare il sangue mediante venipuntura (ad es. Sarstedt Monovette per siero), far coagulare e separare il siero centrifugando a temperatura ambiente. Non centrifugare prima che la coagulazione sia completata. Campioni di pazienti in terapia anticoagulante potrebbero richiedere più tempo per la coagulazione.

Plasma: Prelevare il sangue in provette da centrifuga contenenti un anticoagulante (ad es. Sarstedt Monovette con un'adeguata preparazione per il plasma) e centrifugare subito dopo il prelievo.

Il sangue intero non deve essere congelato prima della centrifugazione.

Conservazione dei campioni

I campioni devono essere conservati ben tappati prima di eseguire il dosaggio. Se vengono conservati in congelatore, congelarli solo una volta. I campioni scongelati devono essere invertiti più volte prima di eseguire il test.

Stabilità:	da 2 °C a 8 °C	7 giorni
	a -20 °C (in aliquote)	fino a 3 mesi

Preparazione dei campioni

I campioni possono essere analizzati senza ulteriore preparazione.

6 PROCEDURA DEL DOSAGGIO**Note sulla procedura**

- Portare tutti i reagenti e i campioni a temperatura ambiente (tra 20 °C e 26 °C) prima dell'uso.
- Miscelare tutti i reagenti senza formare schiuma.
- Non scambiare tra loro i tappi delle fiale di reagente per evitare contaminazioni incrociate.
- Per ogni componente, standard, controllo o campione è necessario utilizzare un nuovo puntale di pipettaggio in plastica monouso per evitare il carry-over.
- Per evitare la contaminazione incrociata e risultati falsamente elevati, pipettare i campioni dei pazienti e dispensare il coniugato accuratamente sul fondo dei pozzetti senza produrre schizzi.
- Per garantire risultati ottimali del test, mescolare accuratamente il contenuto dei pozzetti della piastra per microtitolazione.
- Non lasciare asciugare i pozzetti durante il dosaggio; aggiungere i reagenti subito dopo aver completato le fasi di risciacquo.

- Dopo l'avvio del test, completare tutti i passaggi senza interruzioni e seguendo la stessa sequenza per ogni passaggio.
- La reazione enzimatica è linearmente proporzionale al tempo e alla temperatura.
- La densità ottica è una funzione del tempo di incubazione e della temperatura. Rispettare i tempi e le temperature di incubazione come indicato nel capitolo "Procedura del test".
- Prima di avviare il dosaggio, è raccomandato fare in modo che tutti i reagenti siano pronti, i tappi rimossi, tutti i pozzetti necessari fissati sul supporto ecc. Questo garantirà un tempo trascorso identico per ogni fase di pipettaggio senza interruzioni.
- **Nota importante sulla procedura di lavaggio:**
Il lavaggio è fondamentale. I pozzetti lavati in modo improprio daranno risultati errati. La sensibilità e la precisione di questo dosaggio sono notevolmente influenzate dalla corretta esecuzione della procedura di lavaggio!
- **Prestazioni del test utilizzando dispositivi di analisi completamente automatizzati:**
È possibile eseguire test automatizzati utilizzando dispositivi di analisi a sistema aperto completamente automatizzati. Tuttavia, la combinazione deve essere convalidata dall'utente.

Procedura del test

Ogni analisi deve includere una curva standard.

I controlli servono come controlli interni per la valutazione dell'affidabilità della procedura del test. Essi devono essere dosati a ogni esecuzione del test.

La procedura del test indicata descrive l'elaborazione manuale.

1. Fissare il numero desiderato di pozzetti di microtitolazione nel telaio di supporto.
2. Pipettare **25 µL** di ogni **Standard, Control, e campione** nei pozzetti appropriati, utilizzando puntali monouso.
3. Aggiungere **100 µL** di **Enzyme Conjugate** in ogni pozzetto.
Mescolare accuratamente per 10 secondi. In questa fase, è importante che la miscelazione sia completa.
4. Incubare per **60 minuti** a temperatura ambiente.
5. Lavare i pozzetti nel modo seguente:
Qualora la fase di lavaggio venga eseguita manualmente:
Agitare energicamente il contenuto dei pozzetti.
Risciacquare ogni pozzetto **3 volte** con **300 µL** di soluzione di lavaggio diluita.
Qualora si usi un dispositivo di lavaggio di micropiastre automatizzato:
Risciacquare ogni pozzetto **3 volte** con **400 µL** di soluzione di lavaggio diluita.
Al termine della fase di lavaggio, scuotere sempre energicamente i pozzetti su carta assorbente per rimuovere le gocce residue.
6. Pipettare **100 µL** di **Substrate Solution** in ogni pozzetto.
7. Incubare per **15 minuti** a temperatura ambiente.
8. Arrestare la reazione enzimatica aggiungendo **50 µL** di **Stop Solution** in ogni pozzetto.
9. Misurare la densità ottica (DO) della soluzione in tutti i pozzetti a **450 nm (lettura) e tra 620 e 630 nm (sottrazione del fondo, consigliata)** utilizzando un lettore per piastre per microtitolazione.
Si consiglia di effettuare la lettura dei pozzetti **entro 10 minuti** dall'aggiunta della soluzione di arresto.

Calcolo dei risultati

1. La concentrazione dei campioni può essere letta direttamente dalla curva standard.
2. Per le misurazioni duplicate, è necessario considerare la media dei due valori di densità ottica (DO) per ogni standard, controllo e campione di paziente. Se i due valori si discostano sostanzialmente l'uno dall'altro, DEMEDITEC raccomanda di ritestare i campioni.
3. I campioni con concentrazioni superiori a quelle dello standard più elevato possono essere ulteriormente diluiti con *Standard 0* e sottoposti di nuovo al test come descritto in "Procedura del test".

in alternativa, devono essere refertati come > 20 ng/mL. Per il calcolo delle concentrazioni è necessario considerare questo fattore di diluizione.

(Esempio: diluizione 1:10: 10 μ L campione + 90 μ L Standard 0)

4. Metodo automatizzato:

I risultati nelle istruzioni per l'uso sono stati calcolati automaticamente utilizzando un adattamento della curva logistica a quattro parametri (4PL). (I metodi preferiti sono 4PL Rodbard o 4PL Marquardt.) Altre funzioni di riduzione dei dati potrebbero dare risultati leggermente diversi.

5. Metodo manuale:

Utilizzando carta millimetrata lineare o semilogaritmica, costruire una curva standard tracciando la (media) DO ottenuta da ogni standard contro la rispettiva concentrazione con il valore DO sull'asse verticale (Y) e la concentrazione sull'asse orizzontale (X). Determinare la concentrazione del campione corrispondente dalla curva standard utilizzando il valore OD (medio) per ogni campione.

Esempio di una curva standard tipica

I seguenti dati vengono riportati a scopo esclusivamente dimostrativo e **non possono** sostituire i dati generati al momento di esecuzione del dosaggio.

Standard	Densità ottica (450 nm)
Standard 0 (0,0 ng/mL)	0,03
Standard 1 (0,4 ng/mL)	0,08
Standard 2 (1,0 ng/mL)	0,16
Standard 3 (4,0 ng/mL)	0,55
Standard 4 (10 ng/mL)	1,27
Standard 5 (20 ng/mL)	2,28

7 VALORI DI RIFERIMENTO

È fortemente consigliato che ogni laboratorio determini i propri valori di riferimento.

In uno studio condotto su adulti apparentemente sani, usando il test DEMEDITEC AMH ELISA, sono stati osservati i seguenti risultati:

Popolazione	n	Media (ng/mL)	Mediano (ng/mL)	2,5. - 97,5. percentile (ng/mL)	Intervallo (min. - max.) (ng/mL)
Uomini	30	3,99	3,69	0,32 - 7,36	0,06 - 7,75
Donne (20 - 29 anni)	30	2,71	2,38	0,69 - 6,23	0,66 - 6,37
Donne (30 - 39 anni)	30	2,42	1,85	0,51 - 6,72	0,48 - 8,39
Donne (40 - 49 anni)	30	0,61	0,29	< 0,06 - 4,09	< 0,06 - 4,37

I valori mediani di AMH per le donne con diagnosi di sindrome dell'ovaio policistico (PCOS) erano da due a quattro volte superiori rispetto alle donne sane e non diminuivano significativamente con l'età.

Nelle donne con diagnosi di PCOS, è stata osservata una mediana di 7,19 ng/mL in soggetti di età compresa tra 20 e 24 anni e una mediana di 6,46 ng/mL in soggetti di età compresa tra 35 e 39 anni. (11)

Per le donne con AMH $\leq 0,681$ ng/mL, la probabilità di un basso conteggio dei follicoli antrali (AFC 0-7) è del 63 %, la probabilità di appartenere al AFC gruppo medio (8-15) è di circa il 32 %, e la probabilità di AFC > 15 è solo del 4,4 %. (12, 13)

Valori superiori o inferiori all'intervallo di riferimento devono essere considerati sospetti e richiedono ulteriori esami.

I risultati da soli non dovrebbero essere l'unico motivo per eventuali conseguenze terapeutiche. Correlare i risultati ad altre osservazioni cliniche e test diagnostici.

8 CONTROLLO DI QUALITÀ

Una buona garanzia di qualità in laboratorio richiede che i controlli siano inclusi in ogni curva standard. Un numero statisticamente significativo di controlli dovrebbe essere analizzato per stabilire i valori medi e gli intervalli accettabili per garantire prestazioni adeguate.

Si raccomanda di usare campioni di controllo secondo quanto previsto dalle norme locali o nazionali. Si consiglia di utilizzare campioni di controllo per garantire la validità giornaliera dei risultati. Utilizzare controlli sia a livelli normali che a livelli patologici.

I controlli e i corrispondenti risultati del Laboratorio di controllo qualità sono riportati nel Certificato di Analisi (CoA) inserito nel kit. I valori e gli intervalli indicati sul Certificato di analisi si riferiscono sempre al lotto del kit corrente e devono essere utilizzati per il confronto diretto dei risultati.

Se disponibili, si raccomanda inoltre di partecipare ai programmi nazionali o internazionali della valutazione della qualità per assicurare la precisione dei risultati.

Per analizzare i valori di controllo e gli andamenti, utilizzare metodi statistici appropriati. Se i risultati del dosaggio non si adattano agli intervalli di riferimento stabiliti per i controlli, i risultati dei pazienti non possono essere considerati validi.

In tal caso, verificare le seguenti aree tecniche: Dispositivi di pipettaggio e temporizzazione; fotometro, date di scadenza dei reagenti, condizioni di conservazione e incubazione, metodi di aspirazione e lavaggio.

Dopo aver verificato le voci sopra indicate senza riscontrare alcun errore, contattare il proprio distributore o direttamente DEMEDITEC.

9 CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

Specificità degli anticorpi (reattività incrociata)

La versione inglese delle istruzioni per l'uso contiene informazioni dettagliate sulle sostanze testate.

Sensibilità

Limite del bianco (LoB)	0,044 ng/mL
Limite del bianco (LoD)	0,052 ng/mL
Limite di quantificazione (LoQ)	0,062 ng/mL
Intervallo di misurazione	0,052 ng/mL – 20,0 ng/mL
Intervallo lineare	0,19 ng/mL – 20 ng/mL

I dati relativi a:

Riproducibilità (precisione)

Recupero

Linearità

Confronto dei metodi

sono riportati nella versione inglese dettagliata delle istruzioni per l'uso.

10 LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

Se si esegue la procedura del dosaggio con una completa comprensione delle istruzioni per l'uso e in conformità con le linee guida per l'assicurazione della qualità del laboratorio, si ottengono risultati affidabili e riproducibili.

Qualsiasi manipolazione impropria dei campioni o modifica di questo test potrebbe influenzare i risultati.

Sostanze interferenti

L'emoglobina (fino a 4 mg/mL), bilirubina (fino a 0,5 mg/mL) e i trigliceridi (fino a 7,5 mg/mL) non influiscono in alcun modo sui risultati del dosaggio.

Interferenze dei farmaci

Al momento non siamo a conoscenza di sostanze (farmaci) che influiscono sulla misurazione di AMH in un campione.

Effetto gancio a dose elevata

Non viene rilevato alcun "Effetto gancio a dose elevata" fino a 400 ng/mL di AMH.

11 ASPETTI LEGALI

Affidabilità dei risultati

Il test deve essere eseguito esattamente secondo quanto previsto dalle istruzioni d'uso del produttore. Inoltre, l'utente deve attenersi rigorosamente alle linee guida di garanzia della qualità del laboratorio e alle standard nazionali e/o leggi in vigore. Questo è particolarmente importante per l'uso dei reagenti di controllo. È importante includere sempre, all'interno della procedura del test, un numero sufficiente di controlli per convalidare l'accuratezza e la precisione del test.

I risultati del test sono validi solo se tutti i controlli sono compresi negli intervalli specificati e se anche tutti gli altri parametri del test rientrano nelle specifiche del dosaggio. In caso di dubbi o preoccupazioni in relazione a un risultato, contattare DEMEDITEC.

Conseguenze terapeutiche

Le conseguenze terapeutiche non devono mai basarsi esclusivamente sui risultati di laboratorio, anche qualora tutti i risultati dei test concordino con gli elementi come indicato al punto 11.1. Qualsiasi risultato di laboratorio costituisce solo una parte del quadro clinico complessivo di un paziente.

Si dovrebbero trarre conseguenze terapeutiche solo nei casi in cui i risultati di laboratorio concordino in modo accettabile con il quadro clinico complessivo del paziente.

Il risultato del test, di per sé, non deve mai essere l'unico fattore determinante per una decisione terapeutica.

Responsabilità legali

Qualsiasi modifica del kit di test e/o scambio o miscela di qualsiasi componente di lotti diversi da un kit di test a un altro potrebbe influenzare negativamente i risultati previsti e la validità del test nel suo complesso. Tali modifiche e/o scambi rendono nulla qualsiasi richiesta di sostituzione.

Anche i reclami presentati a causa di un'errata interpretazione da parte del cliente dei risultati di laboratorio indicati al punto 11.2 non saranno ritenuti validi.

In ogni caso, in caso di reclamo, la responsabilità del produttore non potrà superare il valore del kit di test. Il produttore non sarà responsabile di eventuali danni causati al kit di test durante il trasporto.

Segnalazione di incidenti gravi

Tutti gli incidenti gravi relativi a questo prodotto devono essere notificati al fabbricante e all'autorità competente dello Stato membro di residenza dell'utente e/o del paziente

1 FINALIDAD PREVISTA

El **DEMEDIATEC AMH ELISA** es un inmunoensayo enzimático manual para realizar diagnósticos **cuantitativos** de hormona antimulleriana (AMH) en suero o plasma (EDTA o heparina de litio).

Para uso diagnóstico *in vitro*. Para uso profesional de laboratorio.

Para obtener más información sobre el uso previsto, consulte la versión en inglés de las instrucciones de uso.

2 PRINCIPIO DEL TEST

El DEMEDIATEC AMH ELISA es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) en fase sólida basado en el **principio de sándwich**. Los pocillos de microtítulo están recubiertos de un anticuerpo **monoclonal** (ratón) que tiene como diana una única **zona antigénica** de la molécula de AMH. Durante la primera incubación, el AMH de la muestra añadida se une al anticuerpo inmovilizado. El conjugado enzimático añadido simultáneamente, que contiene un anticuerpo de anti-AMH conjugado con peroxidasa de rábano, se une al AMH para formar un compuesto de tipo sándwich. Tras un proceso de lavado para eliminar cualquier sustancia sin unir, la fase sólida se incuba con la solución de sustrato. La reacción colorimétrica se detiene añadiendo una solución de parada, y se realiza una medición de la densidad óptica (DO) del producto amarillo resultante. La intensidad del color es proporcional a la concentración del analito en la muestra. Se crea una curva estándar cotejando los valores de DO con las concentraciones de estándares, y las concentraciones de las muestras desconocidas se determinan usando esta curva estándar.

3 ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Este kit es exclusivo para diagnóstico *in vitro*. Para uso profesional exclusivo de laboratorio.
2. Antes de iniciar el ensayo, lea todas las instrucciones de uso detenidamente. Utilice la versión en vigor de las instrucciones de uso suministradas junto con el kit. Asegúrese de que todo está claro.
3. No mezcle ni utilice componentes de kits con números de lote distintos. No es aconsejable intercambiar pocillos de placas diferentes, aun cuando pertenezcan al mismo lote. Puede que los kits se hayan enviado o almacenado en unas condiciones distintas y existe la posibilidad de que las características de unión de las placas sean ligeramente diferentes.
4. No use los reactivos una vez superada la fecha de caducidad indicada en las etiquetas del kit.
5. No reutilice los pocillos de microtítulo.
6. No use reactivos de otros fabricantes junto con los reactivos de este kit de prueba.
7. Todos los reactivos incluidos en este kit son líquidos transparentes. La solución de sustrato es transparente e incolora. Cualquier cambio en su apariencia podría afectar al rendimiento de la prueba. Si así es, póngase en contacto con DEMEDIATEC.
8. Una contaminación microbiana de los reactivos o de las muestras podría arrojar resultados falsos.
9. Antes de iniciar la prueba, deje que los reactivos alcancen la temperatura ambiente (entre 20 °C y 26 °C). La temperatura afectará a las lecturas de densidad óptica del ensayo. En cambio, los valores de las muestras de paciente no se verán afectados.
10. Todos los volúmenes indicados se deben respetar siguiendo el protocolo. Solo se obtendrán unos resultados de prueba óptimos si se usan pipetas calibradas y lectores de placas de microtítulo.
11. Utilice depósitos solo con reactivos únicos. Esto es especialmente cierto en el caso de los depósitos de sustratos. Si se usa un depósito para dispensar una solución de sustrato que ya se usó previamente con la solución de conjugado, la solución podría acabar tiznada. No vierta reactivo de nuevo a su vial original, ya que podría producirse una contaminación del reactivo.

Precauciones generales

1. Siga las directrices de garantía de calidad y seguridad en el laboratorio.
2. No pipetee nunca con la boca y evite el contacto con los reactivos y las muestras con la piel y las membranas mucosas.
3. No fume, coma, beba ni aplique sustancias cosméticas en las áreas de manipulación de muestras o reactivos del kit.
4. Utilice batas de laboratorio y guantes de látex desechables al manipular reactivos y, si fuera necesario, gafas protectoras también.

Información de riesgo biológico

1. Todos los reactivos de este kit de prueba que contienen plasma o suero humano se han analizado y se ha confirmado su negativo en HIV I/II, HBsAg y HCV mediante procedimientos aprobados de la FDA. Pese a ello, no existe ningún método de prueba conocido que ofrezca garantía total de no presencia de agentes infecciosos.
2. El producto contiene materia de origen animal certificado como aparentemente libre de enfermedades contagiosas o infecciosas y parásitos nocivos.
3. Los componentes bovinos proceden de países en los que no se han notificado casos de EEB (encefalopatía espongiforme bovina).
4. Todas las materias y muestras de origen humano o animal deben tratarse como si existiera la posibilidad de transmisión de enfermedades infecciosas.
5. La manipulación de material debe realizarse siguiendo los procedimientos establecidos según la normativa o instrucción de seguridad y riesgo biológico nacional pertinente. Los residuos deben desecharse respetando las normativas o regulaciones locales correspondientes.

Información sobre riesgos químicos y la clasificación de riesgos

1. Algunos reactivos contienen conservantes con niveles de concentración no declarables. Aún así, en caso de contacto con los ojos o la piel, enjuague de inmediato con agua.
2. La solución de sustrato contiene un ingrediente con niveles de concentración no declarables que puede provocar irritaciones de los ojos graves. En caso de posible contacto con los ojos, enjuáguelos concienzudamente de inmediato con agua o con algún colirio. Tras un contacto con la piel, lave con abundante agua. Quítese la ropa contaminada y lávela antes de volver a utilizarla.
3. Evite el contacto con una solución de parada que contenga < 5 % H₂SO₄. Puede provocar irritación cutánea o quemaduras.
4. Los componentes químicos y los reactivos preparados o usados se deben tratar como desecho peligroso siguiendo la normativa o instrucción de seguridad nacional pertinente.
5. Este producto no contiene sustancias con propiedades carcinogénicas, mutagénicas o tóxicas para la reproducción (CMR).

Los reactivos de este kit de prueba NO contienen sustancias peligrosas con niveles de concentración que deban declararse. No es necesario clasificarlo o etiquetarlo a tal efecto.

Para obtener información detallada, consulte la ficha de datos de seguridad, que puede solicitar directamente a DEMEDITEC.

4 MATERIAL

Material suministrado junto con el kit

- SORB** **MT** **Microtiterwells** 12 x 8 pocillos (por separado), Placa de microtítulo Recubierta de anticuerpo de anti-AMH (monoclonal); Listo para usar.
- CAL** **0** – **5** **Standard (Standard 0 - 5)** 6x 1 mL, Estándares *
Concentraciones: 0,0 – 0,4 – 1,0 – 4,0 – 10 – 20 ng/MI
Conversión: 1 ng/mL = 7,14 pmol/L
Calibrado con el siguiente material de referencia: 1st WHO International Reference Reagent, Mullerian Inhibiting Substance/Anti-Mullerian Hormone, NIBSC code: 16/190, Listo para usar.
- CONTROL** **low** & **high** **Control Low & High** 2 x 1 mL, Controles * *Para obtener los intervalos y valores de control, consulte la etiqueta del vial o el certificado de análisis (CoA)*; Listo para usar.
- ENZ** **CONJ** **Enzyme Conjugate** 1 x 14 mL, Conjugado enzimático* Anticuerpo de anti-AMH conjugado con peroxidasa de rábano; Coloreado en rojo; Listo para usar.
- SUB** **TMB** **Substrate Solution** 1 x 14 mL, Solución de sustrato Contiene 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). *Mantener lejos de la luz solar directa*; Listo para usar.
- STOP** **SOLN** **Stop Solution** 1 x 14 mL, Solución de parada Contiene < 5 % H₂SO₄. *Evite el contacto con la solución de parada. Puede provocar irritación cutánea o quemaduras*; Listo para usar.
- WASH** **SOLN** **40x** **Wash Solution** 1 x 30 mL, Solución de lavado, Concentrado 40X*; *Ver «Preparación de los reactivos».*

Instrucciones de uso (IFU), 1x

Certificado de análisis (CoA), 1x

* Contiene conservante sin mercurio.

Materiales necesarios no suministrados

- Un lector de placas de microtítulo calibrado (450 nm, con una longitud de onda de referencia de entre 620 nm y 630 nm)
- Micropipetas de precisión variable calibradas
- Equipamiento manual o automático para lavar los pocillos de placa de microtítulo
- Papel absorbente
- Agua destilada
- Cronómetro
- Papel cuadriculado o software para la reducción de datos

Almacenamiento y estabilidad del kit

Los reactivos y kits sin abrir, así como **los reactivos abiertos**, se deben almacenar a una temperatura entre 2 °C y 8 °C.

La microplaca siempre debe almacenarse en la bolsa de aluminio con cierre que contiene desecante. No abra la bolsa hasta que alcance la temperatura ambiente. La placa de microtítulo consta de 12 tiras individuales. Cada tira está dividida en 8 pocillos individuales. Los pocillos sin utilizar deben volverse a colocar inmediatamente en la bolsa de aluminio con el desecante y almacenarse de nuevo bien cerrados a 2 °C y 8 °C.

Una vez abiertos, los viales de reactivo se deben volver a cerrar herméticamente.

	Temperatura de almacenamiento	Estabilidad
Kit y reactivos sin abrir	2 °C a 8 °C	Hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta impresa. No use los reactivos una vez superada esta fecha.
Kit abierto	2 °C a 8 °C	8 semanas

Preparación de los reactivos

Antes de usarlos, espere a que todos los reactivos y la cantidad de bandas necesaria estén a temperatura ambiente (20 °C a 26 °C).

Wash Solution (Solución de lavado)

Añada agua destilada a la solución de lavado concentrada a 40X (*Wash Solution*).

Diluya 30 mL de solución de lavado concentrada con 1170 mL de agua destilada hasta llegar a un volumen final de 1200 mL.

Estabilidad tras la dilución:	entre 20 °C y 26 °C	1 semana
-------------------------------	---------------------	----------

Eliminación del kit

El kit y todo los materiales/reactivos usados deberán desecharse siguiendo la regulación nacional correspondiente. En el apartado 13 de la ficha de datos de seguridad encontrará información general relativa a este producto.

Kits de prueba dañados

En caso de que el kit de prueba o alguno de sus componentes estén dañados, se deberá comunicar a DEMEDITEC por escrito como máximo una semana después de la recepción del kit. Los componentes dañados no deben usarse en ninguna serie de prueba. Deberán guardarse hasta que el asunto se resuelva. Tras ello, deberán desecharse siguiendo la regulación oficial en vigor.

5 TOMA DE LA MUESTRA, ALMACENAMIENTO Y PREPARACIÓN

En este ensayo pueden ser usados los tipos de muestra detallados a continuación:

Suero o plasma humano (plasma con EDTA o con heparina de litio).

En el ensayo no deben usarse muestras que contengan azida de sodio.

En términos generales, absténgase de usar muestras hemolíticas, lipémicas o con ictericia. Para obtener más información, consulte el capítulo «*Sustancias interferentes*».

Toma de muestras

Suero: Extraiga sangre mediante venipuntura (p. ej., Sarstedt Monovette para suero), deje que coagule y separe el suero mediante centrifugado a temperatura ambiente. No centrifugue hasta que la coagulación se realice por completo. Puede que las muestras de los pacientes sometidos a terapia anticoagulante necesiten más tiempo para coagularse.

Plasma: Se debe extraer sangre total en tubos de centrifugado que contengan anticoagulante (p. ej., Sarstedt Monovette con la preparación de plasma que corresponda) y centrifugarse inmediatamente después de haberse extraído.

La sangre total no debe congelarse antes del centrifugado.

Almacenamiento de muestras

Las muestras deben almacenarse cerradas herméticamente antes de realizar el ensayo. Si se van a almacenar congeladas, se pueden congelar solo una vez. Las muestras descongeladas se deben invertir varias veces antes de analizarlas.

Estabilidad	entre 2 °C y 8 °C	7 días
	a -20 °C (en alícuotas)	hasta 3 meses

Preparación de las muestras

Las muestras se pueden analizar sin ninguna preparación adicional.

6 PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Notas sobre el procedimiento

- Todos los reactivos y muestras deben estar a temperatura ambiente (entre 20 °C y 26 °C) antes de usarlos.
- Todos los reactivos deben mezclarse sin que generen espuma.
- No intercambie los tapones de los viales de reactivo para evitar posibles contaminaciones cruzadas.
- Use puntas de pipeta de plástico desechables nuevas con cada estándar, control o muestra para evitar posibles contaminaciones por arrastre.
- Para evitar posibles contaminaciones cruzadas y resultados engañosamente elevados, pipetee las muestras de paciente y dispense conjugado sin salpicar de forma minuciosa en el fondo de los pocillos.
- Mezcle bien el contenido de los pocillos de la placa de microtítulo para procurar que los resultados de la prueba sean correctos.
- No deje que los pocillos se sequen durante el ensayo; añada reactivo inmediatamente una vez acabados los pasos de enjuagado.
- Una vez iniciada la prueba, todos los pasos se deben completar de forma ininterrumpida y en la misma secuencia de cada paso.

- La reacción enzimática es linealmente proporcional al tiempo y la temperatura.
- La densidad óptica es una función del tiempo y la temperatura de incubación. Es importante respetar los tiempos y las temperaturas de incubación que se indican en el capítulo «Procedimiento de la prueba».
- Antes de iniciar el ensayo, se recomienda tener todos los reactivos listos, los tapones quitados, todos los pocillos necesarios fijados en el soporte, etc. De este modo, se asegurará de que el tiempo que va a transcurrir en cada paso de pipeteo es el mismo y sin interrupción alguna.
- **Nota importante sobre el procedimiento de lavado:**
El lavado es tremendamente importante. Con unos pocillos mal lavados se obtendrán resultados engañosos. La sensibilidad y la precisión de este ensayo dependen enormemente de un correcto rendimiento del procedimiento de lavado.
- **Rendimiento de pruebas mediante aparatos de análisis completamente automáticos:**
Se puede obtener un rendimiento de pruebas automático usando aparatos de análisis de sistema abierto y completamente automáticos. Sin embargo, la combinación debe estar validada por el usuario.

Procedimiento de la prueba

Cada serie debe incluir una curva estándar.

Los controles actúan como controles internos de la fiabilidad del procedimiento del test. Se deben analizar en cada serie de prueba.

El procedimiento de prueba aquí indicado describe un procesamiento manual.

1. Fije la cantidad de pocillos de microtítulo que desee en el soporte del bastidor.
2. Pipetee **25 µL** de cada **Standard**, cada **Control** y cada **muestra** con puntas nuevas desechables en los pocillos correspondientes.
3. Añada **100 µL** de **Enzyme Conjugate** en cada pocillo.
Mezcle bien durante 10 segundos. En este paso es importante que todo quede bien mezclado.
4. Incube durante **60 minutos** a temperatura ambiente.
5. Lave los pocillos del siguiente modo:
Si el paso de lavado se efectúa manualmente:
Agite enérgicamente el contenido de los pocillos.
Enjuague los pocillos **3 veces** con **300 µL** de solución de lavado diluida por pocillo.
Si se usa un aparato de lavado automático de placas:
Enjuague los pocillos **3 veces** con **400 µL** de solución de lavado diluida por pocillo.
Al término de cada paso de lavado, frote bien los pocillos con papel absorbente para eliminar las gotas residuales!
6. Pipetee **100 µL** de **Substrate Solution** en cada pocillo.
7. Incube durante **15 minutos** a temperatura ambiente.
8. Detenga la reacción enzimática añadiendo **50 µL** de **Stop Solution** a cada pocillo.
9. Mida la densidad óptica (DO) de la solución a **450 nm (lectura) y entre 620 nm y 630 nm (reducción del fondo, recomendada)** con un lector de placas de microtítulo. Se recomienda realizar la lectura de los pocillos **en los 10 minutos** siguientes a la incorporación de la solución de parada.

Cálculo de los resultados

1. La concentración de las muestras se puede leer directamente de la curva estándar.
2. Para determinar los duplicados, se debe hacer la media de los dos valores de densidad óptica (DO) de cada estándar, cada control y cada muestra de paciente. Si estos dos valores se desvían considerablemente el uno de otro, DEMEDITEC recomienda volver a analizar las muestras.
3. Las muestras con una concentración superior al estándar más elevado pueden diluirse adicionalmente con *Standard 0* y volverse a analizar siguiendo las instrucciones de «Procedimiento de la prueba», o bien comunicarse como > 20 ng/mL.
En el cálculo de las concentraciones se debe tener en cuenta este factor de dilución.
(Ejemplo: Dilución 1:10: 10 µL muestra + 90 µL *Standard 0*)

4. Método automático:

Los resultados de estas instrucciones de uso se han calculado automáticamente mediante un ajuste de curva de una función logística de cuatro parámetros (4PL). (Los métodos de preferencia son 4PL Rodbard o 4PL Marquardt.) Otras funciones de reducción de datos podrían arrojar resultados ligeramente distintos.

5. Método manual:

Usando un papel cuadrículado lineal o semilogarítmico, construya una curva estándar trazando el valor medio de densidad óptica obtenido de cada estándar en comparación con su concentración con un valor de densidad óptica en el eje vertical (Y) y la concentración en el eje horizontal (X). Determine la concentración de muestra correspondiente de la curva estándar usando el valor medio de densidad óptica de cada muestra.

Ejemplo de curva estándar típica

Los siguientes datos se proporcionan únicamente a título ilustrativo y **no** se pueden usar como reemplazo de las generaciones de datos en el momento de realizar el ensayo.

Estándares		Densidad óptica (450 nm)
Standard 0	(0,0 ng/mL)	0,03
Standard 1	(0,4 ng/mL)	0,08
Standard 2	(1,0 ng/mL)	0,16
Standard 3	(4,0 ng/mL)	0,55
Standard 4	(10 ng/mL)	1,27
Standard 5	(20 ng/mL)	2,28

7 VALORES DE REFERENCIA

Se recomienda encarecidamente que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

Un estudio realizado con sujetos adultos aparentemente sanos en el que se usó DEMEDITEC AMH ELISA reveló lo siguiente:

Población	n	Media (ng/mL)	Mediana (ng/mL)	Percentil 2,5 - 97,5 (ng/mL)	Intervalo (min. - max.) (ng/mL)
Hombres	30	3,99	3,69	0,32 - 7,36	0,06 - 7,75
Mujeres (20 - 29 años)	30	2,71	2,38	0,69 - 6,23	0,66 - 6,37
Mujeres (30 - 39 años)	30	2,42	1,85	0,51 - 6,72	0,48 - 8,39
Mujeres (40 - 49 años)	30	0,61	0,29	< 0,06 - 4,09	< 0,06 - 4,37

Los valores medianos de AMH en mujeres diagnosticadas con síndrome de ovario poliquístico (SOP) fueron de dos a cuatro veces más altos en comparación con las mujeres sanas y no disminuyeron notablemente con el aumento de la edad. En las mujeres diagnosticadas con SOP se observó una mediana de 7,19 ng/mL en individuos de 20 a 24 años de edad, y una mediana de 6,46 ng/mL en individuos de 35 a 39 años de edad. (11)

Para las mujeres con AMH \leq 0,681 ng/mL, la probabilidad de un número bajo de folículos antrales (AFC 0-7) es del 63 %, la probabilidad de pertenecer al grupo medio de AFC (8-15) es aproximadamente del 32 %, y la probabilidad de AFC > 15 es sólo del 4,4 %. (12, 13)

Los valores por encima o por debajo del rango de referencia deben considerarse sospechosos y requieren una investigación adicional.

Los resultados no deben ser el único motivo que justifique la aplicación de una terapia. Los resultados deben estar vinculados con otras observaciones clínicas y pruebas diagnósticas.

8 CONTROL DE CALIDAD

Una buena garantía de calidad en el laboratorio requiere el uso de controles con cada curva estándar. Es conveniente analizar una cantidad de controles estadísticamente significativa para poder establecer unos valores de media y unos intervalos aceptables que favorezcan un rendimiento adecuado. Se recomienda usar las muestras de control según las regulaciones estatales y federales. El uso de muestras de control es aconsejable para garantizar la validez de los resultados cada día. Use controles en niveles tanto normales como patológicos. Los controles y los resultados correspondientes del laboratorio de control de calidad figuran en el certificado de análisis (CoA) incluido con el kit. Los valores e intervalos reflejados en un CoA siempre se corresponden con el lote de kit actual, y deben usarse para cotejar los resultados de forma directa. Si los hay, también es recomendable participar en programas de control de calidad nacionales o internacionales para garantizar la precisión de los resultados. Emplee unos métodos estadísticos adecuados para analizar las tendencias y los valores de control. Si los resultados del ensayo no coinciden con los intervalos aceptables establecidos del material de control, los resultados de paciente deben considerarse como no válidos. En tal caso, compruebe las siguientes cuestiones técnicas: Aparatos de pipeteo y temporizadores; fotómetro, fechas de caducidad de los reactivos, condiciones de almacenamiento e incubación, métodos de aspiración y lavado. Si, una vez comprobadas todas estas cuestiones, sigue sin encontrar errores, póngase en contacto su distribuidor o directamente con DEMEDITEC.

9 CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

Especificidad de los anticuerpos (reactividad cruzada)

En la versión en inglés de las instrucciones de uso encontrará información pormenorizada sobre las sustancias analizadas.

Sensibilidad

Límite de blanco (LoB)	0,044 ng/mL
Límite de detección (LoD)	0,052 ng/mL
Límite de cuantificación (LoQ)	0,062 ng/mL
Intervalo de medición	0,052 ng/mL – 20,0 ng/mL
Intervalo lineal	0,19 ng/mL – 20 ng/mL

Encontrará información sobre lo siguiente:

Reproducibilidad (precisión)

Recuperación

Linealidad

Comparación del método

en la versión en inglés detallada de las instrucciones de uso.

10 LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Se obtendrán unos resultados fiables y reproducibles si el procedimiento de ensayo se lleva a cabo habiendo comprendido completamente las instrucciones de uso y observando las directrices de garantía de calidad del laboratorio.

Manipular las muestras de forma indebida o alterar esta prueba podría influir en los resultados.

Sustancias interferentes

La hemoglobina (hasta 4 mg/mL), la bilirrubina (hasta 0,5 mg/mL) y los triglicéridos (hasta 7,5 mg/mL) no tienen efecto alguno en los resultados del ensayo.

Interferencias de medicamentos

Hasta la fecha no se tiene conocimiento de ninguna sustancia (medicamento) que tenga efecto en las mediciones de AMH de una muestra.

Efecto gancho en concentraciones elevadas

No se aprecia ningún efecto gancho en concentraciones elevadas de hasta 400 ng/mL de AMH.

11 CUESTIONES LEGALES

Fiabilidad de los resultados

La prueba se debe realizar siguiendo exactamente las instrucciones de uso del fabricante. Es más, el usuario debe cumplir estrictamente las directrices de garantía de calidad del laboratorio y las normas y/o legislaciones nacionales aplicables. Esto es especialmente relevante al usar reactivos de control. Es importante incluir siempre en el procedimiento de la prueba una cantidad suficiente de controles que validen la precisión de la prueba.

Los resultados de la prueba serán válidos únicamente si todos los controles están dentro de los intervalos especificados y si todos los demás parámetros de la prueba están dentro también de las especificaciones del ensayo pertinentes. Si existe alguna duda o reparo en relación con un resultado, póngase en contacto con DEMEDITEC.

Aplicación de terapias

La aplicación de una terapia no debe estar justificada únicamente por los resultados de laboratorio, aun cuando todos los resultados de la prueba coincidan con lo establecido en el punto 11.1. Un resultado de laboratorio es solo una parte del cuadro clínico total de un paciente. La aplicación de una terapia solo estará justificada en aquellos casos en los que los resultados de laboratorio coincidan con el cuadro clínico general del paciente.

El resultado de la prueba en sí no debe tomarse como único factor determinante de la aplicación de una terapia.

Responsabilidad

Cualquier alteración del kit de prueba y/o intercambio o mezcla de componentes de lotes distintos entre un kit de prueba y otro podría afectar negativamente a los resultados previstos y a la validez de la prueba en general. Tal alteración o intercambio invalidará cualquier reclamación de sustitución.

Tampoco serán válidas las reclamaciones enviadas con motivo de una mala interpretación por parte del cliente de los resultados de laboratorio según el punto 11.2. Con independencia de todo esto, en caso de reclamación, la responsabilidad del fabricante no superará el valor del kit de prueba. Cualquier daño causado al kit de prueba durante su transporte quedará fuera de la responsabilidad del fabricante.

Información de incidentes graves

Cualquier incidente grave relacionado con el producto deberá comunicarse al fabricante y a la autoridad competente del Estado miembro en el que estén establecidos el usuario y/o el paciente.

1 DESTINATION DU DISPOSITIF

Le **DEMEDIATEC AMH ELISA** est un dosage immunoenzymatique manuel pour la mesure **quantitative** de l'hormone anti-müllérienne (Anti-Müllerian Hormone, AMH) dans le sérum ou le plasma humain (plasma EDTA ou avec héparine de lithium).

Destiné à une utilisation de diagnostic *in vitro*. Destiné à un usage professionnel en laboratoire.

Pour de plus amples informations sur l'usage prévu, veuillez vous reporter à la version anglaise du mode d'emploi.

2 PRINCIPE DU TEST

Le DEMEDIATEC AMH ELISA est un dosage d'immunoabsorption par enzyme (ELISA) en phase solide reposant sur le **principe de sandwich**. Les puits de microtitration sont recouverts d'un anticorps monoclonal (souris) dirigé vers un site antigénique unique de la molécule de AMH. Pendant la première incubation, l'AMH dans l'échantillon ajouté se lie à l'anticorps immobilisé. Le conjugué enzymatique ajouté simultanément, qui contient un anticorps dirigé contre AMH conjugué à de la peroxydase de raifort, se lie au AMH en formant un complexe en sandwich. Après une étape de lavage pour éliminer toutes les substances non liées, la phase solide est incubée avec la solution de substrat. La réaction colorimétrique est arrêtée par l'ajout d'une solution d'arrêt, et la densité optique (DO) du produit jaune résultant est mesurée. L'intensité de couleur est proportionnelle à la concentration de l'analyte dans l'échantillon. Une courbe standard est construite en traçant les valeurs de DO en fonction des concentrations des standards, et les concentrations des échantillons inconnus sont déterminées en utilisant cette courbe standard.

3 AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS

- Ce kit est destiné exclusivement à une utilisation de diagnostic *in vitro*. Destiné uniquement à un usage professionnel en laboratoire.
- Lire attentivement toutes les instructions avant de commencer le dosage. Utiliser la version valide de la notice d'utilisation fournie avec la trousse. S'assurer que tout a bien été compris.
- Ne pas mélanger les composants des trousse et ne pas utiliser de composants de trousse portant des numéros de lot différents. Il est recommandé de ne pas intervertir les puits de différentes plaques, même s'ils appartiennent au même lot. Les trousse ont peut-être été expédiés ou conservés dans des conditions différentes et les caractéristiques de liaison des plaques peuvent légèrement différer.
- Ne pas utiliser de réactifs au-delà de la date d'expiration indiquée sur les étiquettes de la trousse.
- Ne pas réutiliser les puits de microtitration.
- Les réactifs d'autres fabricants ne doivent pas être utilisés avec les réactifs de cette trousse de test.
- Tous les réactifs de cette trousse sont des liquides clairs, la solution de substrat est claire et incolore. Des variations dans son apparence peuvent affecter la performance du test. Dans un tel cas, contactez DEMEDIATEC.
- La contamination microbienne des réactifs ou des échantillons peut entraîner des résultats erronés.
- Laisser les réactifs atteindre la température ambiante (20 °C à 26 °C) avant de commencer le test. La température affecte la lecture de la densité optique du test. Cependant, les valeurs des échantillons de patients ne seront pas affectées.
- Tous les volumes indiqués doivent être réalisés conformément au protocole. Des résultats de tests optimaux ne sont possibles qu'avec des pipettes et des lecteurs de microplaques calibrés.
- N'utilisez les réservoirs que pour des réactifs uniques. Ceci s'applique particulièrement aux réservoirs de substrat. L'utilisation d'un réservoir pour distribuer une solution de substrat qui avait été précédemment utilisé pour la solution de conjugué peut colorer la solution. Ne pas verser les réactifs dans les flacons d'origine, car cela pourrait contaminer les réactifs.

Précautions générales

- Suivre les directives relatives à l'assurance qualité et à la sécurité au laboratoire.
- Ne jamais les pipeter à la bouche et éviter tout contact des réactifs et des échantillons avec la peau ou les muqueuses.
- Ne pas fumer, boire, manger ni utiliser des cosmétiques dans les zones de manipulation des échantillons ou de réactifs de la trousse.

- Porter des blouses de laboratoire et des gants en latex jetables lors de la manipulation des échantillons et des réactifs et, si nécessaire, des lunettes de sécurité.

Informations sur les risques biologiques

- Tous les réactifs de cette trousse de test contenant du sérum ou du plasma humain ont été testés et confirmés négatifs pour le VIH I/II, le HBsAg et le VHC par les procédures approuvées par la FDA. Cependant, aucune méthode d'essai connue ne peut offrir une garantie totale qu'aucun agent infectieux n'est présent.
- Le dispositif contient des matières d'origine animale, qui sont certifiées apparemment exemptes de maladies infectieuses ou contagieuses et de parasites nuisibles.
- Les composants bovins proviennent de pays où l'ESB (encéphalopathie spongiforme bovine) n'a pas été signalée.
- Tous les matériaux et échantillons d'origine humaine ou animale doivent être manipulés comme susceptibles de transmettre des maladies infectieuses.
- La manipulation doit être conforme aux procédures définies par les directives ou règlements nationaux concernant la sécurité et les déchets à risque biologique. Les déchets doivent être mis au rebut conformément aux règles et réglementations locales.

Informations sur les risques chimiques et classification des risques

- Certains réactifs contiennent des agents de conservation à des concentrations non soumises à une obligation de déclaration. Toutefois, en cas de contact avec les yeux ou la peau, rincer immédiatement à l'eau.
- La solution de substrat contient un ingrédient à des concentrations non soumises à une obligation de déclaration, qui provoque une grave irritation des yeux. En cas de contact possible avec les yeux, rincer immédiatement et soigneusement au moyen d'une douche oculaire ou à l'eau. En cas de contact avec la peau, rincer abondamment à l'eau. Enlever les vêtements contaminés et les laver avant de les porter de nouveau.
- Éviter le contact avec la solution d'arrêt, qui contient < 5 % de H₂SO₄. Elle pourrait provoquer une irritation de la peau et des brûlures.
- Les produits chimiques et les réactifs préparés ou utilisés doivent être considérés comme des déchets dangereux conformément à la réglementation ou aux directives de sécurité nationales.
- Ce produit ne contient pas de substances ayant des propriétés cancérigènes, mutagènes ou toxiques pour la reproduction (CMR).

AUCUN des réactifs de cette trousse de test ne contient de substances dangereuses à des concentrations soumises à une obligation de déclaration; une classification et un étiquetage n'est pas requis.

Pour des informations détaillées, veuillez consulter la fiche de données de sécurité, disponible sur demande directement auprès de DEMEDITEC Diagnostics GmbH.

4 MATÉRIAUX

Matériaux fournis avec la trousse

10. **SORB** **MT** **Microtiterwells** 12 x 8 puits (divisibles), Microplaque Recouvert d'un anticorps anti-AMH (monoclonal); Prêt à l'emploi.
11. **CAL** **0** – **5** **Standard (Standard 0 - 5)**, 6 x 1 mL, Standards *
Concentrations: 0,0 – 0,4 – 1,0 – 4,0 – 10 – 20 ng/mL
Conversion: 1 ng/mL = 7,14 pmol/L
Calibré par rapport au matériau de référence suivant: 1st WHO International Reference Reagent, Mullerian Inhibiting Substance/Anti-Mullerian Hormone, NIBSC code: 16/190; Prêt à l'emploi.
12. **CONTROL** **low** & **high** **Control Low & High** 2 x 1 mL, Contrôles * *Pour les valeurs de contrôle et les plages de valeurs, veuillez vous référer à l'étiquette du flacon ou au certificat d'analyse (CoA); Prêt à l'emploi.*
13. **ENZ** **CONJ** **Enzyme Conjugate** 1 x 14 mL, Conjugué enzymatique * Anticorps dirigé contre l'AMH conjugué à de la peroxydase de raifort; Coloré en rouge; Prêt à l'emploi.
14. **SUB** **TMB** **Substrate Solution** 1 x 14 mL, Solution de substrat Contient du 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB). *Tenir à l'écart de la lumière directe du soleil; Prêt à l'emploi.*
15. **STOP** **SOLN** **Stop Solution** 1 x 14 mL, Solution d'arrêt Contient < 5 % de H₂SO₄. *Eviter les contacts avec la solution stop. Cela pourrait engendrer des irritations ou brûlures de la peau; Prêt à l'emploi.*
16. **WASH** **SOLN** **40x** **Wash Solution** 1 x 30 mL, Solution de lavage, concentré 40X *; *Voir « Préparation des réactifs ».*

Notice d'utilisation (IFU), 1x

Certificat d'analyse (CoA), 1x

* Contient un agent de conservation sans mercure.

Matériel nécessaire mais non fourni

- Un lecteur de microplaques calibré (450 nm, avec une longueur d'onde de référence de 620 nm à 630 nm)
- Micropipettes calibrées à précision variable
- Équipement manuel ou automatique pour le rinçage des puits de microplaques
- Papier absorbant
- Eau distillée
- Minuterie
- Papier graphique ou logiciel pour la réduction des données

Stockage et stabilité du kit

Les kits et réactifs non ouverts ainsi que **les réactifs ouverts** doivent être conservés à une température entre 2 °C et 8 °C.

La microplaque doit toujours être conservée dans une poche en aluminium scellée contenant un absorbeur d'humidité. Ne pas ouvrir la poche avant qu'elle n'ait atteint la température ambiante. La microplaque est composée de 12 bandes individuelles. Chaque bande peut être divisée en 8 puits individuels. Les puits non utilisés doivent être immédiatement replacés dans la poche en aluminium contenant l'absorbeur d'humidité, scellés hermétiquement et conservés à une température comprise entre 2 °C et 8 °C.

Une fois ouverts, les flacons de réactifs doivent être refermés hermétiquement.

	Température de stockage	Stabilité
Kit non ouvert et réactifs non ouverts	2 °C à 8 °C	Jusqu'à la date d'expiration imprimée sur l'étiquette. Ne pas utiliser les réactifs au-delà de cette date !
Kit ouvert	2 °C à 8 °C	8 semaines

Préparation des réactifs

Amener tous les réactifs et le nombre requis de bandes à température ambiante (20 °C à 26 °C) avant de les utiliser.

Solution de lavage

Ajouter l'eau distillée à la solution de lavage concentrée à 40x (*Wash Solution*).

Diluer 30 mL de solution de lavage concentrée avec 1170 mL d'eau distillée pour un volume final de 1200 mL.

Stabilité après dilution:	entre 20 °C et 26 °C	1 semaine
---------------------------	----------------------	-----------

Élimination du kit

L'élimination du kit et de tout le matériel/tous les réactifs doit être conforme aux réglementations nationales. Des informations spécifiques au produit sont indiquées dans la fiche de données de sécurité, section 13.

Kits de tests endommagés

En cas de dommage du kit de tests ou de ses composants, DEMEDITEC doit en être informé par écrit, au plus tard une semaine après réception du kit. Les composants endommagés ne doivent pas être utilisés pour le test. Ils doivent être stockés jusqu'à ce qu'une solution adaptée ait été trouvée. Après cela, ils doivent être éliminés conformément à la réglementation en vigueur.

5 PRÉLÈVEMENT, STOCKAGE ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Le matériau d'échantillon suivant peut être utilisé dans ce test:

Sérum ou plasma humain (plasma EDTA ou plasma avec héparine de lithium)

Les échantillons contenant de l'azoture de sodium ne doivent pas être utilisés dans le test.

En général, il faut éviter d'utiliser des échantillons hémolytiques, ictériques ou lipémiques. Pour de plus amples informations, se reporter au chapitre « *Substances interférentes* ».

Prélèvement des échantillons

Sérum: Prélever le sang par ponction veineuse (ex. Sarstedt Monovette pour le sérum), laisser coaguler et extraire le sérum par centrifugation à température ambiante. Ne pas centrifuger avant la coagulation complète. Le temps de coagulation peut être plus long chez les patients sous traitement anticoagulant.

Plasma: Prélever le sang total dans des tubes de centrifugation contenant un anticoagulant (ex. Sarstedt Monovette avec la préparation de plasma adéquate) et centrifuger immédiatement après le prélèvement.

Le sang total ne doit pas être congelé avant la centrifugation.

Stockage des échantillons

Les échantillons doivent être conservés hermétiquement fermés avant d'effectuer le dosage. S'ils sont conservés au congélateur, ne les congeler qu'une seule fois. Les échantillons décongelés doivent être retournés plusieurs fois avant le test.

Stabilité:	entre 2 °C et 8 °C	7 jours
	à -20 °C (en aliquotes)	jusqu'à 3 mois

Préparation des échantillons

Les échantillons peuvent être dosés sans préparation supplémentaire.

6 PROCÉDURE DE DOSAGE**Notes de procédure**

- Tous les réactifs et échantillons doivent être amenés à température ambiante (entre 20 °C et 26 °C) avant d'être utilisés.
- Tous les réactifs et échantillons doivent être mélangés sans mousse.
- Ne pas interchanger les bouchons des flacons de réactifs pour éviter toute contamination croisée.
- Utiliser des embouts de pipette en plastique neufs pour chaque standard, contrôle ou échantillon afin d'éviter tout transfert.

- Pour éviter la contamination croisée et des résultats faussement élevés, pipeter les échantillons du patient et distribuer le conjugué sans éclabousser précisément le fond des puits.
- Mélanger soigneusement le contenu des puits de la microplaque pour garantir de bons résultats.
- Ne pas laisser les puits sécher pendant le dosage ; ajouter les réactifs immédiatement après avoir terminé les étapes de rinçage.
- Une fois le test lancé, toutes les étapes doivent être réalisées sans interruption et dans le même ordre pour chaque étape.
- La réaction enzymatique est linéairement proportionnelle au temps et à la température.
- La densité optique dépend du temps d'incubation et de la température. Respecter les temps et températures d'incubation indiqués dans le chapitre « Procédure de test ».
- Avant de commencer le dosage, il est recommandé que tous les réactifs soient prêts, les bouchons retirés, tous les puits nécessaires fixés dans le support, etc. Cela permet de garantir un temps égal pour chaque étape de pipetage sans interruption.
- **Remarque importante pour la procédure de lavage:**
Le lavage est essentiel. Des puits mal lavés donneront des résultats erronés. La sensibilité et la précision de ce dosage sont fortement influencées par l'exécution correcte de la procédure de lavage!
- **Réalisation de tests avec des dispositifs d'analyse entièrement automatisés:**
Il est possible d'effectuer des tests automatisés au moyen de dispositifs d'analyse entièrement ouverts automatisés. Toutefois, la combinaison doit être validée par l'utilisateur.

Procédure de test

Chaque cycle doit inclure une courbe standard.

Les contrôles servent de contrôles internes pour la fiabilité de la procédure de test. Ils doivent être dosés lors de chaque cycle de tests.

La procédure de test décrite correspond à un traitement manuel.

17. Fixer le nombre souhaité de puits de microtitration dans le support du cadre.
18. Pipeter **25 µL** de chaque standard (**Standard**), contrôle (**Control**) et échantillon avec de nouveaux embouts jetables dans les puits correspondants.
19. Ajouter **100 µL** de conjugué enzymatique (**Enzyme Conjugate**) dans chaque puits.
Bien mélanger pendant 10 secondes. Il est important d'avoir un mélange complet à cette étape.
20. Incuber pendant **60 minutes** à température ambiante.
21. Laver les puits comme suit:
Si l'étape de lavage est effectuée à la main:
Agiter énergiquement le contenu des puits.
Rincer les puits à **3 reprises** avec **300 µL** de solution de lavage diluée par puits.
Si un laveur de plaques automatique est utilisé:
Rincer les puits à **3 reprises** avec **400 µL** de solution de lavage diluée par puits.
À la fin de l'étape de lavage, toujours frapper énergiquement les puits sur du papier absorbant pour éliminer les gouttelettes résiduelles.
22. Pipeter **100 µL** de solution de substrat (**Substrate Solution**) dans chaque puits.
23. Incuber pendant **15 minutes** à température ambiante.
24. Arrêter la réaction enzymatique en ajoutant **50 µL** de solution d'arrêt (**Stop Solution**) dans chaque puits.
25. Mesurer la densité optique (DO) de la solution dans chaque puits à **450 nm (lecture) et à 620 nm à 630 nm (soustraction des bruits de fond, recommandé)** avec un lecteur de microplaques.
Il est recommandé de lire les puits dans un délai de **10 minutes** après l'ajout de la solution d'arrêt.

Calcul des résultats

1. La concentration des échantillons peut être lue directement à partir de la courbe standard.
2. Pour les déterminations en double, prendre la moyenne des deux valeurs de densité optique (DO) pour chaque standard, contrôle et échantillon de patient. Si les deux valeurs s'écartent considérablement l'une de l'autre, DEMEDITEC recommande de tester à nouveau les échantillons.

3. Les échantillons dont la concentration est supérieure à l'étalon le plus élevé peuvent être dilués davantage avec *Standard 0* et dosés à nouveau comme décrit dans la section « Procédure de test » ou doivent être signalés comme > 20 ng/mL. Pour le calcul des concentrations, ce facteur de dilution doit être pris en compte.
(Exemple: Dilution 1:10: 10 µL de l'échantillon + 90 µL *Standard 0*)
4. Méthode automatisée:
Les résultats figurant dans les instructions d'utilisation ont été calculés automatiquement en utilisant un ajustement de la courbe logistique à quatre paramètres (4 PL). (Les méthodes privilégiées sont les modèles logistiques à quatre paramètres [4 PL] de Rodbard ou de Marquardt.) D'autres fonctions de réduction des données peuvent donner des résultats légèrement différents.
5. Méthode manuelle:
Avec du papier graphique linéaire ou semi-logarithmique, construire une courbe standard en traçant la DO (moyenne) obtenue à partir de chaque standard en fonction de sa concentration avec la valeur de la DO sur l'axe vertical (Y) et la concentration sur l'axe horizontal (X). Déterminer la concentration correspondante de l'échantillon à partir de la courbe standard en utilisant la valeur (moyenne) de la DO pour chaque échantillon.

Exemple de courbe standard caractéristique

Les données suivantes ont uniquement une fin de démonstration et **ne peuvent pas** être utilisées à la place des générations de données au moment du dosage.

Standard	Densité optique (450 nm)
<i>Standard 0</i> (0,0 ng/mL)	0,03
<i>Standard 1</i> (0,4 ng/mL)	0,08
<i>Standard 2</i> (1,0 ng/mL)	0,16
<i>Standard 3</i> (4,0 ng/mL)	0,55
<i>Standard 4</i> (10 ng/mL)	1,27
<i>Standard 5</i> (20 ng/mL)	2,28

7 VALEURS DE RÉFÉRENCE

Il est fortement recommandé à chaque laboratoire de déterminer ses propres valeurs de référence.

Dans une étude menée sur des adultes apparemment sains, à l'aide du test AMH ELISA de DEMEDITEC, les valeurs suivantes ont été observées :

Population	n	Moyenne (ng/mL)	Médiane (ng/mL)	2,5 ^e - 97,5 ^e percentile (ng/mL)	Portée (min. - max.) (ng/mL)
Hommes	30	3,99	3,69	0,32 - 7,36	0,06 - 7,75
Femmes (20 - 29 ans)	30	2,71	2,38	0,69 - 6,23	0,66 - 6,37
Femmes (30 - 39 ans)	30	2,42	1,85	0,51 - 6,72	0,48 - 8,39
Femmes (40 - 49 ans)	30	0,61	0,29	< 0,06 - 4,09	< 0,06 - 4,37

Les valeurs médianes de l'AMH pour les femmes diagnostiquées avec le syndrome des ovaires polykystiques (SOPK) étaient deux à quatre fois plus élevées que pour les femmes en bonne santé et n'ont pas diminué de manière significative avec l'âge. Chez les femmes diagnostiquées avec SOPK, une médiane de 7,19 ng/mL a été observée chez les sujets âgés de 20 à 24 ans et une médiane de 6,46 ng/mL chez les sujets âgés de 35 à 39 ans. (11)

Chez les femmes avec AMH ≤ 0,681 ng/mL, la probabilité d'un petit nombre des follicules antraux (antral follicle count, AFC 0-7) est de 63 %, la probabilité d'appartenir au groupe AFC moyen (8-15) est d'environ 32 % et la probabilité d'AFC > 15 n'est que de 4,4 %. (12, 13)

Les valeurs supérieures ou inférieures à la plage de référence doivent être considérées comme suspectes et nécessitent des examens complémentaires.

Les résultats ne doivent pas être utilisés seuls pour déterminer les décisions thérapeutiques. Ils doivent être corrélés avec d'autres observations cliniques et tests diagnostiques.

8 CONTRÔLE DE QUALITÉ

Une bonne assurance qualité au laboratoire exige que des contrôles soient effectués avec chaque courbe standard. Un nombre statistiquement significatif de contrôles doit être analysé afin d'établir les valeurs moyennes et les plages acceptables pour garantir une bonne performance. Il est recommandé d'utiliser les échantillons de contrôle conformément aux réglementations locales et nationales. L'utilisation d'échantillons de contrôle est conseillée pour assurer la validité jour par jour des résultats. Utiliser les contrôles au niveau normal et au niveau pathologique. Les contrôles et les résultats correspondants du laboratoire de contrôle de la qualité sont indiqués dans le certificat d'analyse (CoA) joint au kit. Les valeurs et les plages indiquées sur le « CoA » se rapportent toujours au lot actuel du kit et doivent être utilisées pour une comparaison directe des résultats. En cas de disponibilité, il est également recommandé de participer à des programmes nationaux ou internationaux d'évaluation de la qualité afin d'assurer l'exactitude des résultats. Appliquer les méthodes statistiques appropriées pour l'analyse des valeurs de contrôle et des tendances. Si les résultats du dosage ne concordent pas avec les intervalles acceptables établis du matériel de contrôle, les résultats de patient doivent être considérés comme invalides. Dans ce cas, veuillez vérifier les domaines techniques suivants: Dispositifs de pipetage et de chronométrage; photomètre, dates d'expiration des réactifs, conditions de stockage et d'incubation, méthodes d'aspiration et de lavage. Si aucune erreur n'est révélée par l'examen des éléments susmentionnés, veuillez contacter votre distributeur ou DEMEDITEC directement.

9 CARACTERISTIQUES EN MATIERE DE PERFORMANCES

Spécificité des anticorps (des réactions croisées)

Des informations détaillées sur les substances testées sont disponibles dans la version anglaise du mode d'emploi de la notice d'utilisation.

Sensibilité

La limite du blanc (LoB)	0,044 ng/mL
La limite de détection (LoD)	0,052 ng/mL
La limite de quantification (LoQ)	0,062 ng/mL
Plage de mesure	0,052 ng/mL – 20,0 ng/mL
Plage linéaire	0,19 ng/mL – 20 ng/mL

Les données pour:

Reproductibilité (précision)

Récupération

Linéarité

Comparaison des méthodes

se trouvent dans la version anglaise détaillée du mode d'emploi.

10 LIMITES DE LA PROCÉDURE

Les résultats seront fiables et reproductibles si la procédure de dosage est effectuée dans le respect le plus strict de la notice d'utilisation et des directives relatives à l'assurance qualité en laboratoire.

Toute manipulation incorrecte des échantillons ou toute modification de ce test peut affecter les résultats.

Substances interférentes

L'hémoglobine (jusqu'à 4 mg/mL), la bilirubine (jusqu'à 0,5 mg/mL) et les triglycérides (jusqu'à 7,5 mg/mL) n'ont aucune influence sur les résultats du dosage.

Interférences médicamenteuses

Jusqu'à présent, aucune substance (médicament) n'a d'influence connue sur la mesure de AMH dans un échantillon.

Effet crochet

Aucun effet crochet n'a été observé pour ce test jusqu'à une concentration de 400 ng/mL de AMH.

11 ASPECTS JURIDIQUES

Fiabilité des résultats

Le test doit être effectué exactement selon la notice d'utilisation du fabricant. En outre, l'utilisateur doit adhérer strictement aux directives d'assurance qualité en laboratoire et aux normes et/ou lois nationales applicables. Ceci s'applique en particulier dans le cadre de l'utilisation des réactifs de contrôle. Il est important de toujours inclure dans la procédure de test un nombre suffisant de contrôles pour valider l'exactitude et la précision du test.

Les résultats de tests ne sont valides que si tous les contrôles se situent dans l'intervalle spécifié et que tous les autres paramètres de test correspondent également aux spécifications du dosage. En cas de doute ou de préoccupation relative à un résultat, veuillez contacter DEMEDITEC.

Décisions thérapeutiques

Les décisions thérapeutiques ne doivent jamais s'appuyer uniquement sur les résultats de laboratoire, même si tous les résultats de tests sont conformes aux critères définis au point 11.1. Tout résultat de laboratoire ne représente qu'une partie du tableau clinique global d'un patient. Des décisions thérapeutiques ne peuvent être prises que dans les cas où les résultats de laboratoire sont en accord avec le tableau clinique global du patient.

Le résultat de test lui-même ne doit jamais être le seul critère déterminant la prise de décisions thérapeutiques.

Responsabilité

Toute modification du kit de test et/ou échange ou mélange de composants de différents lots de kits pourrait avoir un impact négatif sur les résultats escomptés et sur la validité du test global. De telles modifications et/ou de tels échanges invalident toute demande de remplacement.

Les réclamations dues à une mauvaise interprétation des résultats de laboratoire par le client selon le point 11.2 sont également invalides.

Quoi qu'il en soit, en cas de réclamation, la responsabilité du fabricant ne doit pas excéder la valeur du kit de test. Tout dommage causé au kit de test lors du transport ne relève pas de la responsabilité du fabricant.

Notification des incidents graves

Tout incident grave survenu en lien avec le dispositif fait l'objet d'une notification au fabricant et à l'autorité compétente de l'État membre dans lequel l'utilisateur et/ou le patient est établi.

1 FINALIDADE PREVISTA

O **AMH ELISA da DEMEDITEC** é um imunoensaio enzimático manual para a medição **quantitativa** de Hormônio antimülleriano (Anti-Müllerian Hormone (AMH) em soro ou plasma humano (plasma EDTA ou plasma de heparina de lítio).

Para utilização em diagnóstico *in vitro*. Para utilização profissional de laboratório.

Para mais informações sobre a utilização prevista, consulte a versão em inglês das Instruções de Utilização.

2 PRINCÍPIO DO TESTE

O AMH ELISA da DEMEDITEC é um teste de imunoabsorção enzimática (ELISA) em fase sólida baseado no **princípio “sandwich”**. Os poços de microtitulação são revestidos com um anticorpo monoclonal (rato) direcionado a um sítio antigénico único da molécula de AMH. Durante a primeira incubação, o AMH na amostra adicionada liga-se ao anticorpo imobilizado. O conjugado enzimático adicionado simultaneamente, que contém um anticorpo anti-AMH conjugado com a peroxidase de rábano silvestre, liga-se ao AMH formando um complexo “sandwich”. Depois de um passo de lavagem para remover todas as substâncias não ligadas, a fase sólida é incubada com a solução de substrato. A reação colorimétrica é parada pela adição de solução de paragem, e é medida a densidade ótica (DO) do produto amarelo resultante. A intensidade da cor é proporcional à concentração do analito na amostra. É construída uma curva padrão representando graficamente os valores da DO em relação às concentrações dos padrões, e as concentrações de amostras desconhecidas são determinadas utilizando esta curva padrão.

3 ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

1. Este kit destina-se apenas para diagnóstico *in vitro*. Apenas para utilização profissional de laboratório.
2. Antes de iniciar o teste, leia atenta e integralmente as instruções de utilização fornecidas. Utilize a versão válida das instruções de utilização fornecidas com o kit. Assegure-se de que tudo foi compreendido.
3. Não misture ou utilize componentes de kits com números de lote diferentes. É aconselhável não intercambiar poços de placas diferentes, mesmo do mesmo lote. Os kits podem ter sido expedidos ou armazenados em condições diferentes e as características de ligação das placas podem ter ficado ligeiramente diferentes.
4. Não utilize reagentes para além do prazo de validade indicado nas etiquetas do kit.
5. Não reutilize poços de microtitulação.
6. Reagentes de outros fabricantes não devem ser utilizados juntamente com os reagentes deste kit de teste.
7. Todos os reagentes neste kit são líquidos transparentes e a solução de substrato é transparente e incolor. Alterações na sua aparência podem afetar o desempenho do teste. Neste caso, contacte a DEMEDITEC.
8. Uma contaminação microbiana de reagentes ou de amostras pode dar origem a resultados falsos.
9. Antes de iniciar o teste, deixe que os reagentes atinjam a temperatura ambiente (20 °C a 26 °C). A temperatura afeta as leituras da densidade ótica do teste. No entanto, os valores das amostras de pacientes não serão afetados.
10. Todos os volumes indicados devem ser executados de acordo com o protocolo.
11. Só são obtidos resultados de teste ótimos quando são utilizados leitores de placas de microtitulação e pipetas calibradas.
12. Utilize os reservatórios apenas para reagentes individuais. Isto aplica-se especialmente a reservatórios de substratos. Se para dispensar uma solução de substrato, for utilizado um reservatório que já foi usado anteriormente para a solução conjugada, pode tornar a solução colorida. Não ponha de volta reagentes nos frascos originais, pois pode ocorrer contaminação do reagente.

Precauções gerais

1. Siga as diretrizes para a garantia de qualidade e segurança no laboratório.
2. Nunca pipete utilizando a boca e evite o contacto de reagentes e amostras com a pele e as mucosas.
3. Não fume, coma, beba ou utilize cosméticos em áreas onde são manuseadas amostras ou reagentes do kit.
4. Quando manusear amostras e reagentes, use batas de laboratório e luvas de látex descartáveis e, sempre que necessário, óculos de segurança.

Informações sobre riscos biológicos

1. Todos os reagentes deste kit de teste que contêm soro ou plasma humanos foram testados e confirmados como negativos para o VIH I/II, HBsAg e HCV através de procedimentos aprovados pela FDA. No entanto, nenhum método de teste conhecido pode oferecer total garantia de que não está presente nenhum agente infeccioso.
2. O dispositivo contém material de origem animal, que está certificado como aparentemente isento de doenças infecciosas ou contagiosas e de parasitas nocivos.
3. Os componentes bovinos têm origem em países onde não foi denunciada a EEB (Encefalopatia Espongiforme Bovina).
4. Todos os materiais e amostras de origem humana ou animal devem ser manuseados como sendo capazes de transmitir doenças infecciosas.
5. O manuseamento deve ser efetuado em conformidade com os procedimentos definidos pelos regulamentos e diretrizes nacionais de segurança e de risco biológico. Os resíduos devem ser eliminados de acordo com a legislação e os regulamentos locais.

Informações sobre perigos químicos e classificação de perigos

1. Alguns reagentes contêm conservantes em concentrações que não têm de ser declaradas. No entanto, em caso de contacto com os olhos ou com a pele, lave imediatamente com água em abundância.
2. A solução de substrato contém um ingrediente numa concentração que não tem de ser declarada que causa irritação grave dos olhos. Em caso de um possível contacto com os olhos, lave de imediato, cuidadosa e atentamente, com um sistema de lavagem ocular ou com água. Em caso de contacto com a pele, lave com água em abundância. Retire a roupa contaminada e lave-a antes de voltar a usar.
3. Evite o contacto com Solução de Paragem que contenha < 5 % H₂SO₄. Pode causar irritação da pele e queimaduras.
4. Agentes químicos e reagentes preparados ou usados devem ser tratados como resíduos perigosos de acordo com os regulamentos e diretrizes nacionais de segurança.
5. Este produto não contém substâncias com propriedades cancerígenas, mutagénicas ou tóxicas para a reprodução (CMR).

NENHUM reagente deste kit de teste contém substâncias perigosas em concentrações que têm de ser declaradas, pelo que não é necessária uma classificação e etiquetagem.

Para informações detalhadas, consulte a Folha de Dados de Segurança, que está disponível a pedido diretamente à DEMEDITEC.

4 MATERIAIS

4.1 Materiais fornecidos no kit

- SORB MT** Microtiterwells 12 × 8 poços (separáveis), Placa de microtitulação Revestida com anticorpo anti-AMH (monoclonal); Pronto para uso.
- CAL 0 – 5** Standard (Standard 0 - 5), 6 x 1 mL, Padrões *
Concentrações: 0,0 – 0,4 – 1,0 – 4,0 – 10 – 20 ng/mL
Conversão: 1 ng/mL = 7,14 pmol/L
Calibrado com base no seguinte material de referência: 1st WHO International Reference Reagent, Mullerian Inhibiting Substance/Anti-Mullerian Hormone, NIBSC code: 16/190; Pronto para uso.
- CONTROL low & high** Control Low & High 2 x 1 mL, Controlos * *Para intervalos e valores de controlo, consulte a etiqueta do frasco ou o Certificado de Análise (CoA); Pronto para uso.*
- ENZ CONJ** Enzyme Conjugate 1 x 14 mL, Conjugado Enzimático * Anticorpo anti-AMH conjugado com peroxidase de rábano silvestre. De cor vermelha; Pronto para uso.
- SUB TMB** Substrate Solution 1 x 14 mL, Solução de Substrato Contém 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). *Proteger da luz direta do sol; Pronto para uso.*
- STOP SOLN** Stop Solution 1 x 14 mL, Solução de Paragem Contém < 5 % H₂SO₄. *Evite o contacto com a solução de paragem. Pode causar irritações na pele e queimaduras; Pronto para uso.*
- WASH SOLN 40x** Wash Solution 1 x 30 mL, Solução de Lavagem, 40X concentrado *; *Consulte "Preparação de reagentes".*

Instruções de Uso (IFU), 1x

Certificado de Análise (CoA), 1x

* Contém conservante sem mercúrio.

4.2 Materiais necessários mas não fornecidos

- Um leitor calibrado de placas de microtitulação (450 nm, com comprimento de onda de referência de 620 nm a 630 nm)
- Micropipetas de precisão variável calibradas
- Equipamento manual ou automático para lavagem de poços de placas de microtitulação
- Papel absorvente
- Água destilada
- Temporizador
- Papel gráfico ou software para redução de dados

4.3 Armazenamento e estabilidade do kit

Reagentes e kits não abertos assim como **reagentes abertos** devem ser armazenados entre 2 °C e 8 °C.

A microplaca deve ser sempre armazenada na bolsa de alumínio com fecho de vedar que contém um dessecante. Não abra a bolsa até ser atingida a temperatura ambiente. A placa de microtitulação é constituída por 12 tiras individuais. Cada tira pode ser dividida em 8 poços individuais. Os poços não utilizados devem ser repostos imediatamente na bolsa de alumínio com dessecante, que deve ser bem vedada novamente e armazenada a uma temperatura entre 2 °C e 8 °C.

Uma vez abertos, os frascos de reagente devem ser de novo fechados firmemente.

	Temperatura de armazenamento	Estabilidade
Kit não aberto e reagentes não abertos	2 °C a 8 °C	Até ao prazo de validade impresso na etiqueta. Não utilize reagentes para além desta data!
Kit aberto	2 °C a 8 °C	8 semanas

4.4 Preparação de reagentes

Antes de serem utilizados, estabilize todos os reagentes e as tiras-teste necessárias para a temperatura ambiente (20 °C a 26 °C).

Wash Solution

Adicione água destilada à Solução de Lavagem concentrada a 40X (*Wash Solution*).

Dilua 30 mL de Solução de Lavagem concentrada com 1170 mL de água destilada para obter um volume final de 1200 mL.

Estabilidade após diluição:	a 20 °C a 26 °C	1 semana
-----------------------------	-----------------	----------

4.5 Eliminação do kit

A eliminação do kit e de todos os materiais/reagentes usados deve ser efetuada de acordo com os regulamentos nacionais. Informações especiais para este produto são indicadas na Folha de Dados de Segurança, secção 13.

4.6 Kits de teste danificados

Em caso de existirem quaisquer danos no kit de teste ou nos componentes, a DEMEDITEC deve ser informada por escrito, o mais tardar uma semana depois da receção do kit. Numa corrida de teste não devem ser utilizados quaisquer componentes individuais danificados. Os mesmos têm de ser postos de parte até que seja encontrada uma solução final. Em seguida, devem ser eliminados de acordo com os regulamentos oficiais.

5 COLHEITA, ARMAZENAMENTO E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

Neste teste podem ser utilizados os seguintes materiais de amostra:

Soro ou plasma humano (plasma EDTA ou plasma de heparina de lítio)

Não devem ser utilizadas no teste amostras ou controlos externos que contenham azida de sódio. De um modo geral, deve ser evitada a utilização de amostras hemolíticas, ictericas ou lipémicas. Para mais informações, consulte o capítulo "*Substâncias interferentes*".

5.1 Colheita de amostras

Soro: Colha sangue por venipunctura (por ex., Sarstedt Monovette para soro), deixe coagular e separe o soro por centrifugação à temperatura ambiente. Não centrifugue antes de ter ocorrido a coagulação completa. Amostras de pacientes que estão a receber terapêutica anticoagulante podem necessitar de um tempo de coagulação mais prolongado.

Plasma: O sangue total deve ser colhido em tubos de centrifugação que contêm anticoagulante (por ex. Sarstedt Monovette com a preparação plasmática apropriada) e centrifugado imediatamente após a colheita.

O sangue total não deve ser congelado antes da centrifugação.

5.2 Armazenamento de amostras

As amostras devem ser armazenadas com a tampa firmemente colocada antes de um teste ser executado. Se armazenadas congeladas, congele apenas uma vez. Amostras descongeladas devem ser invertidas várias vezes antes dos testes.

Estabilidade	a 2 °C a 8 °C	7 dias
	a -20 °C (em alíquotas)	até 3 meses

5.3 Preparação de amostras

As amostras podem ser testadas sem preparação adicional.

6 PROCEDIMENTO DE TESTE**6.1 Notas sobre o procedimento**

- Antes da utilização, todos os reagentes e amostras devem ser estabilizados para a temperatura ambiente (20 °C a 26 °C).
- Todos os reagentes devem ser misturados sem formação de espuma.
- Para evitar contaminação cruzada, não troque as tampas dos frascos de reagentes.
- Para evitar carryover, utilize novas pontas de pipeta de plástico descartáveis para cada padrão, controlo ou amostra.
- Para evitar contaminação cruzada e resultados falsamente elevados, pipete as amostras de paciente e dispense o conjugado para o fundo dos poços, sem salpicar e com precisão.

- Para garantir bons resultados de teste, misture bem o conteúdo dos poços da placa de microtitulação.
- Não deixe que os poços sequem durante o teste; adicione os reagentes imediatamente depois de concluir os passos de enxaguamento.
- Uma vez iniciado o teste, todos os passos devem ser efetuados sem interrupção e na mesma sequência para cada passo.
- A reação enzimática é linearmente proporcional ao tempo e à temperatura.
- A densidade ótica varia em função do tempo de incubação e da temperatura. Respeite os tempos de incubação e as temperaturas, conforme indicado no capítulo “Procedimentos de ensaio”.
- Antes de iniciar o teste, recomenda-se que todos os reagentes estejam preparados, com as tampas retiradas, todos os poços necessários alojados no suporte, etc. Isto assegura um tempo de duração igual para cada passo de pipetagem, sem interrupção.
- **Importante nota sobre o procedimento de lavagem:**
A lavagem é crítica. Poços lavados incorretamente produzirão resultados erróneos. A sensibilidade e precisão deste teste é significativamente influenciada pelo desempenho correto do procedimento de lavagem!
- **Desempenho do teste utilizando dispositivos de análise totalmente automatizados:**
É possível um desempenho de teste automatizado utilizando dispositivos de análise de sistema aberto totalmente automatizados. No entanto, a combinação deve ser validada pelo utilizador.

6.2 Procedimento de ensaio

Cada corrida deve incluir uma curva padrão.

Os controlos são utilizados como controlos internos para a fiabilidade do procedimento de teste. Têm de ser testados em cada corrida de teste.

O procedimento de teste indicado descreve o processamento manual.

1. Assegure-se do número pretendido de poços de microtitulação no suporte da estrutura.
2. Pipete **25 µL** de cada padrão (**Standard**), controlo (**Control**) e **amostra com novas pontas descartáveis** nos poços apropriados.
3. Adicione **100 µL** de Conjugado Enzimático (**Enzyme Conjugate**) em cada poço. Misture bem durante 10 segundos. É importante efetuar uma mistura completa neste passo.
4. Incubar durante **60 minutos** à temperatura ambiente.
5. Lave os poços da maneira que se segue:
Se o passo de lavagem for executado manualmente:
Sacuda com firmeza o conteúdo dos poços.
Enxague os poços **3 vezes** com **300 µL** de Solução de Lavagem diluída por poço.
Se for utilizado um lavador de placas automatizado:
Enxague os poços **3 vezes** com **400 µL** de Solução de Lavagem diluída por poço.
No final do passo de lavagem, sacuda sempre os poços com firmeza sobre papel absorvente para remover gotículas residuais!
6. Pipete **100 µL** de Solução de Substrato (**Substrate Solution**) para cada poço.
7. Incubar durante **15 minutos** à temperatura ambiente.
8. Pare a reação enzimática adicionando **50 µL** de Solução de Paragem (**Stop Solution**) em cada poço.
9. Meça a densidade ótica (DO) da solução em cada poço **a 450 nm (leitura) e entre 620 nm e 630 nm (subtração de segundo plano recomendada)** com um leitor de placas de microtitulação.
Recomenda-se que os poços sejam lidos **no prazo de 10 minutos** após a adição de Solução de Paragem.

6.3 Cálculo de resultados

1. A concentração das amostras pode ser lida diretamente a partir da curva padrão.
2. Para determinações duplicadas, deve ser considerada a média dos dois valores de densidade ótica (DO) para cada padrão, controlo e amostra de paciente. Se os dois valores forem substancialmente diferentes um do outro, a DEMEDITEC recomenda a repetição das amostras.

3. As amostras com concentrações que excedam o padrão mais alto podem ser diluídas ainda mais com *Standard 0* e testadas novamente conforme descrito no “Procedimento de ensaio”, ou devem ser indicadas como > 20 ng/mL. Para o cálculo das concentrações, deve ser considerado este fator de diluição.
(Exemplo: Diluição 1:10: 10 µL amostra + 90 µL *Standard 0*)
4. Método automatizado:
Os resultados nas instruções de utilização foram calculados automaticamente utilizando um ajuste de curva logística (4PL) de 4 parâmetros. (4PL Rodbard ou 4PL Marquardt são os métodos preferidos.) Outras funções de redução de dados podem produzir resultados ligeiramente diferentes.
5. Método manual:
Utilizando papel gráfico linear ou semi-logarítmico, desenhe uma curva-padrão representando graficamente o valor médio da DO obtido de cada padrão em relação à respectiva concentração, com o valor de DO no eixo vertical (Y) e o da concentração no eixo horizontal (X). Determine a concentração de amostra correspondente a partir da curva padrão utilizando o valor médio da DO de cada amostra.

6.3.1 Exemplo de curva padrão típica

Os seguintes dados são apenas para demonstração e **não podem** ser utilizados em lugar dos dados gerados na altura do teste.

Padrões	Densidade óptica (450 nm)
<i>Standard 0</i> (0,0 ng/mL)	0,03
<i>Standard 1</i> (0,4 ng/mL)	0,08
<i>Standard 2</i> (1,0 ng/mL)	0,16
<i>Standard 3</i> (4,0 ng/mL)	0,55
<i>Standard 4</i> (10 ng/mL)	1,27
<i>Standard 5</i> (20 ng/mL)	2,28

7 VALORES DE REFERÊNCIA

Recomenda-se vivamente que cada laboratório determine os seus próprios valores de referência.

Num estudo efetuado com adultos aparentemente saudáveis, ao utilizar o DEMEDITEC AMH ELISA, foram observados os seguintes dados:

População	n	Média (ng/mL)	Mediana (ng/mL)	Percentil 2,5º a 97,5º (ng/mL)	Intervalo (mín. - máx.) (ng/mL)
Homens	30	3,99	3,69	0,32 - 7,36	0,06 - 7,75
Mulheres (20 - 29 anos)	30	2,71	2,38	0,69 - 6,23	0,66 - 6,37
Mulheres (30 - 39 anos)	30	2,42	1,85	0,51 - 6,72	0,48 - 8,39
Mulheres (40 - 49 anos)	30	0,61	0,29	< 0,06 - 4,09	< 0,06 - 4,37

Os valores medianos de AMH em mulheres diagnosticadas com síndrome do ovário policístico (PCOS) foram duas a quatro vezes mais elevados em comparação com mulheres saudáveis e não diminuíram acentuadamente com o aumento da idade. Em mulheres diagnosticadas com PCOS, foi observada uma mediana de 7,19 ng/mL em indivíduos de 20 - 24 anos de idade, e uma mediana de 6,46 ng/mL em indivíduos de 35 - 39 anos de idade. (11)

Para mulheres com valores de AMH ≤ 0,681 ng/mL, a probabilidade de uma baixa contagem de folículos anormais (AFC 0 - 7) é de 63 %, a probabilidade de pertencer ao grupo AFC médio (8 - 15) é de aproximadamente 32 %, e a probabilidade de AFC > 15 é de apenas 4,4 %. (12, 13)

Valores acima ou abaixo do intervalo de referência devem ser considerados como suspeitos e requerem testes adicionais.

Os resultados por si só não devem ser o único motivo para quaisquer decisões terapêuticas. Os resultados devem ser correlacionados com outros dados clínicos e testes de diagnóstico.

8 CONTROLE DE QUALIDADE

A garantia de boa qualidade no laboratório exige que sejam executados controlos com cada curva padrão. Para assegurar um desempenho adequado, deve ser testado um número estatisticamente significativo de controlos para poderem ser estabelecidos valores médios e intervalos aceitáveis. Recomenda-se a utilização de amostras de controlo de acordo com os regulamentos estaduais e federais. Para assegurar a validade dos resultados quotidianos, aconselha-se a utilização de amostras de controlo. Utilize controlos tanto a níveis normais como a níveis patológicos. Os controlos e os resultados correspondentes do Laboratório de Controlo de Qualidade estão indicados no Certificado de Análise (CoA) adicionado ao kit. Os valores e os intervalos indicados no CoA referem-se sempre ao lote atual do kit e devem ser utilizados para comparação direta dos resultados. A fim de garantir a exatidão dos resultados, recomenda-se também a participação em programas de Avaliação da Qualidade nacionais ou internacionais, se disponíveis. Aplique métodos estatísticos apropriados para analisar valores e tendências dos controlos. Se os resultados do teste não concordarem com os intervalos aceitáveis estabelecidos dos materiais de controlo, os resultados do paciente devem ser considerados inválidos. Neste caso, verifique as seguintes áreas técnicas: Dispositivos de pipetagem e de temporização; fotómetro, prazos de validade dos reagentes, condições de armazenamento e de incubação, métodos de lavagem e de aspiração. Depois de verificados os itens atrás mencionados, se não for encontrado nenhum erro, entre em contacto com o seu distribuidor ou diretamente com a DEMEDITEC.

9 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

9.1 Especificidade dos anticorpos (reatividade cruzada)

Informações detalhadas sobre as substâncias testadas encontram-se na versão inglesa das instruções de utilização.

9.2 Sensibilidade

Limite do Branco (LoB)	0,044 ng/mL
Limite de Detecção (LoD)	0,052 ng/mL
Limite de Quantificação (LoQ)	0,062 ng/mL
Intervalo de medição	0,052 ng/mL – 20,0 ng/mL
Intervalo linear	0,19 ng/mL – 20 ng/mL

Os dados referentes a:

9.3 Reprodutibilidade (Precisão)

9.4 Recuperação

9.5 Linearidade

9.6 Comparação de métodos

encontram-se na versão inglesa detalhada das instruções de utilização.

10 LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Resultados fiáveis e reprodutíveis são obtidos quando o procedimento de teste é realizado com uma compreensão completa das instruções de utilização e em conformidade com as directrizes de garantia de qualidade do laboratório.

Qualquer manuseamento incorreto das amostras ou a modificação deste teste poderá influenciar os resultados.

10.1 Substâncias interferentes

A hemoglobina (até 4 mg/mL), a bilirrubina (até 0,5 mg/mL) e os triglicéridos (até 7,5 mg/mL) não têm nenhuma influência nos resultados do teste.

10.2 Interferências de fármacos

Até ao presente, não conhecemos nenhuma substância (fármaco) que tenha influência na medição do AMH numa amostra.

10.3 Efeito gancho de dose elevada

Não é detetado nenhum “Efeito gancho de dose elevada” até 400 ng/mL de AMH.

11 ASPETOS LEGAIS

11.1 Fiabilidade dos resultados

O teste deve ser executado exatamente conforme as instruções de utilização do fabricante. Além disso, o utilizador deve cumprir estritamente as directrizes de garantia de qualidade do laboratório e as normas e/ou leis nacionais aplicáveis. Isto é especialmente relevante na utilização de reagentes de controlo. Para validar a precisão e a exatidão do teste, é importante incluir sempre no procedimento de teste um número suficiente de controlos.

Os resultados do teste só são válidos se todos os controlos estiverem dentro dos intervalos especificados e se todos os outros parâmetros do teste estiverem também dentro das especificações do teste. Se houver alguma dúvida ou preocupação relativamente a um resultado, entre em contato com a DEMEDITEC.

11.2 Decisões terapêuticas

As decisões terapêuticas nunca devem basear-se apenas em resultados laboratoriais, mesmo que todos os resultados de teste estiverem de acordo com os itens indicados no ponto 11.1. Qualquer resultado laboratorial é apenas uma parte do quadro clínico total de um paciente. Só devem ser tomadas decisões terapêuticas nos casos em que os resultados laboratoriais estejam de acordo aceitável com o quadro clínico global do paciente.

O resultado do teste por si só nunca deve ser o único determinante para tomar quaisquer decisões terapêuticas.

11.3 Fiabilidade

Qualquer modificação ao kit de teste e/ou qualquer troca ou mistura de quaisquer componentes de lotes diferentes de um kit de teste para outro, poderá afetar negativamente os resultados pretendidos e a validade do teste global. Tais modificações e/ou trocas invalidam qualquer solicitação de substituição. Também serão inválidas as reclamações submetidas devido a má interpretação do cliente dos resultados laboratoriais sujeitos ao ponto 11.2.

Em todo o caso, em caso de qualquer reclamação, a responsabilidade do fabricante não excederá o valor do kit de teste. Quaisquer danos causados ao kit de teste durante o transporte não são da responsabilidade do fabricante.


11.4 Comunicação de incidentes graves

Quaisquer incidentes graves ocorridos em relação ao dispositivo devem ser comunicados ao fabricante e às autoridades competentes do estado membro em que o utilizador e/ou o paciente estão estabelecidos

REFERENCES / LITERATURE

1. Jopling H, Yates A, Burgoyne N, Hayden K, Chaloner C, Tetlow L. Paediatric Anti-Müllerian Hormone measurement: Male and female reference intervals established using the automated Beckman Coulter Access AMH assay. *Endocrinol Diabetes Metab.* 2018;1(4):e00021.
2. Hampl R, Šnajderová, M, Mardešić T. Antimüllerian Hormone (AMH) Not Only a Marker for Prediction of Ovarian Reserve. *Physiol. Res.* 60: 217-223, 2011.
3. Matuszczak E, Hermanowicz A, Komarowska M, Debek W. Serum AMH in Physiology and Pathology of Male Gonads. *Int J Endocrinol.* 2013:128907.
4. Victoria M, Labrosse J, Krief F, Cédric-Durnerin I, Comtet M, Grynberg M. Anti Müllerian Hormone: More than a biomarker of female reproductive function. *J Gynecol Obstet Hum Reprod.* 2019 Jan;48(1):19-24.
5. Broer S, Broekmans F, Laven J, Fauser B. Anti-Müllerian hormone: ovarian reserve testing and its potential clinical implications. *Hum Reprod Update.* 2014 Sep-Oct;20(5):688-701.
6. Broer S, Eijkemans M, Scheffer G, van Rooij I, de Vet A, Themmen A, Laven J, de Jong F, te Velde E, Fauser B, Broekmans F. Anti-Müllerian Hormone Predicts Menopause: A Long-Term Follow-Up Study in Normoovulatory Women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011 Aug;96(8):2532-9.
7. Visser J, de Jong F, Laven, J, Themmen A. Anti-Müllerian hormone: a new marker for ovarian function. *Reproduction.* 2006 Jan;131(1):1-9.
8. Broer S, van Disseldorp J, Broeze K, Dolleman M, Opmeer B, Bossuyt P, Eijkemans M, Mol B, Broekmans F; IMPORT study group. Added value of ovarian reserve testing on patient characteristics in the prediction of ovarian response and ongoing pregnancy: an individual patient data approach. *Hum Reprod Update.* 2013 Jan-Feb;19(1):26-36.
9. Ebner T, Sommergruber M, Moser M, Shebl O, Schreier-Lechner E, Tews G. Basal level of anti-Müllerian hormone is associated with oocyte quality in stimulated cycles. *Hum Reprod.* 2006 Aug;21(8):2022-6.
10. Sun H, Mao H, Cai J, Zhao Y. Research progress on anti-müllerian hormone clinical applications and immunoassay development. *Frontiers in Laboratory Medicine.* 2018 2(1):14-18.
11. Anckaert E, Öktem M, Thies A, Cohen-Bacrie M, Daan NM, Schiettecatte J, Müller C, Topcu D, Gröning A, Ternaux F, Engel C, Engelmann S, Milczynski C. Multicenter analytical performance evaluation of a fully automated anti-Müllerian hormone assay and reference interval determination. *Clinical biochemistry* 2016, 49(3), 260–267.
12. Anderson R A, Anckaert E, Bosch E, Dewailly D, Dunlop CE, Fehr D, Nardo L, Smitz J, Tremellen K, Denk B, Geistanger A, Hund M. Prospective study into the value of the automated Elecsys antimüllerian hormone assay for the assessment of the ovarian growing follicle pool. *Fertility and sterility* 2015, 103(4), 1074–1080.e4.
13. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Testing and interpreting measures of ovarian reserve: a committee opinion. *Fertility and sterility* 2012, 98(6), 1407–1415.

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Française	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	utilisation Diagnostic in vitro	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.	Référence	Número de catálogo	No. di catalogo
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta advertencias y precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	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
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertrieb durch	Distribution par	Distribución por	Distribuzione da parte di
	Version	Version	Version	Versión	Versione
	Single-use	Einmalverwendung	À usage unique	Uso único	Uso una volta