

6 TESTDURCHFÜHRUNG

6.1 Hinweise zur Durchführung

- 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 Waschschriffs!
- **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.

1.	Die benötigte Anzahl der Mikrotiter-Wells in der Halterung befestigen.
2.	Je 25 µl Standard, Kontrolle und Probe mit <u>neuen Plastikspitzen</u> in die entsprechenden Wells pipettieren.
3.	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.
4.	60 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
5.	Die Vertiefungen folgendermaßen waschen: Wenn der Waschschrift <u>manuell</u> durchgeführt wird: Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln. Wells 3-mal mit 300 µl verdünnter <i>Wash Solution</i> pro Well waschen. Bei Verwendung eines <u>Waschautomaten</u> : Wells 3-mal mit 400 µl verdünnter <i>Wash Solution</i> pro Well waschen. <u>Am Ende des Waschschriffs die Vertiefungen immer</u> kräftig auf saugfähigem Papier ausklopfen, um verbliebene Flüssigkeit zu entfernen.
6.	100 µl Substrate Solution in jedes Well pipettieren.
7.	15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
8.	Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 50 µl Stop Solution in jedes Well abstoppen.
9.	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 Berechnung der Ergebnisse

1. Die Konzentration der Proben kann direkt von der Standardkurve abgelesen werden.
2. 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 der Hersteller, die Proben erneut zu testen.
3. Proben mit Konzentrationen, die den höchsten Standard überschreiten, können mit *Standard A* 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 A*)
4. 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.
5. 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 A (0,0 ng/ml)	0,03
Standard B (0,4 ng/ml)	0,08
Standard C (1,0 ng/ml)	0,16
Standard D (4,0 ng/ml)	0,55
Standard E (10 ng/ml)	1,27
Standard F (20 ng/ml)	2,28

7 REFERENZWERTE

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

In einer Studie mit dem 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 ≤ 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)

Werte, die über oder unter dem Referenzbereich liegen, sollten als verdächtig angesehen werden und erfordern zusätzliche Untersuchungen.

Die mit diesem Testkit erzielten Ergebnisse sollten niemals als alleinige Grundlage für therapeutische Konsequenzen dienen. 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 dem Hersteller 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 dem Hersteller 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.

12 LITERATUR

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.

Symbole:

	Lagertemperatur		Hersteller		Enthält Testmaterial für <n> Teste
	Verwendbar bis		Chargennummer		In vitro Diagnostikum
	Gebrauchsanweisung beachten		Inhalt		CE-Kennzeichnung
	Achtung		Katalognummer		Vertriebspartner
	Herstellungsdatum				