



# Androstenedione ELISA

***KAPD3265***



DIAsource ImmunoAssays S.A. - Rue du Bosquet, 2 - B-1348 Louvain-la-Neuve – Belgium

---

Version : 230718

# History

---

## Summary of change :

<b>Previous Version :</b>	<b>Current Version :</b>
200224/1	230718
Old DiaSource logo	New DiaSource logo on the front page



# ANDROSTENEDIONE ELISA

en

KAPD3265  
IN VITRO DIAGNOSTIC USE

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 91

## 1 INTRODUCTION

The DIAsource Androstenedione Enzyme Immunoassay Kit provides materials for the quantitative determination of Androstenedione in serum and EDTA plasma.

This assay is intended for in vitro diagnostic use only.

The steroid hormone Androstenedione is one of the main androgens, besides Testosterone and Dehydroepiandrosterone. Testosterone, the most important biological active androgen, is derived from peripheral enzymatic conversion of Androstenedione.

In males, androgens are secreted primarily by the Leydig cells of the testes, to some degree also in the adrenal cortex. In females, the androgens are secreted mainly in the adrenal glands and in the ovary. Around 10% of the androgens are derived from peripheral conversion, mainly of DHEA. Androstenedione and Testosterone show high diurnal variability. The highest levels are measured in the morning. At the age of puberty serum androstenedione levels rise, after menopause they decline again. High androstenedione levels are measured during pregnancy.

In women, high levels of androstenedione (47-100% above normal) are generally found in hirsutism, mostly in combination with other androgens as testosterone and DHEA-S. Androstenedione overproduction is due to ovarian dysfunction or maybe of adrenal origin. High circulating androstenedione levels are found in women with polycystic ovaries and 21-hydroxylase effect. Significant lower androstenedione levels are found in postmenopausal osteoporosis.

## 2 PRINCIPLE OF THE TEST

The DIAsource Androstenedione ELISA Kit is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), based on the principle of competitive binding.

The microtiter wells are coated with a polyclonal (rabbit) antibody directed towards an antigenic site of the androstenedione molecule.

During the first incubation, the androstenedione in the added sample competes with the added enzyme conjugate, which is an androstenedione molecule conjugated to horseradish peroxidase, for binding to the coated antibody.

After a washing step, to remove all unbound substances, the solid phase is incubated with the substrate solution. The reaction is abruptly stopped by addition of stop solution and optical density (OD) of the resulting yellow product is measured. The intensity of colour is inversely proportional to the concentration of the analyte in the sample.

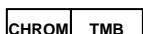
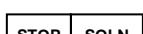
A standard curve is constructed by plotting OD values against concentrations of standards, and concentrations of unknown samples are determined using this standard curve.

## 3 PRECAUTIONS

- This kit is for in vitro diagnostic use only. For professional use only.
- 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. All reagents, however, should be treated as potential biohazards in use and for disposal.
- Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of the package insert provided with the kit. Be sure that everything is understood.
- The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 °C to 8 °C in the sealed foil pouch and used in the frame provided.
- Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step.
- 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 colored. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur.
- Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells.
- Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.
- Allow the reagents to reach room temperature (21-26°C) before starting the test. Temperature will affect the absorbance readings of the assay. However, values for the patient samples will not be affected.
- Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and specimens with skin and mucous membranes.
- Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.
- Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents or specimens may give false results.
- Handling should be done in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.
- Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
- All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiterplate readers.
- Do not mix or use components from kits with different lot numbers. It is advised not to exchange 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.
- Avoid contact with Stop Solution containing 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. It may cause skin irritation and burns.
- Some reagents contain Proclin 300, BND and/or MIT as preservatives. In case of contact with eyes or skin, flush immediately with water.
- TMB substrate has an irritant effect on skin and mucosa. In case of possible contact, wash eyes with an abundant volume of water and skin with soap and abundant water. Wash contaminated objects before reusing them. If inhaled, take the person to open air.
- Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guideline or regulation.
- For information on hazardous substances included in the kit please refer to Material Safety Data Sheets. Material Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from DIAsource.

## 4 KIT COMPONENTS

### 4.1 Contents of the Kit

1.  **Microplate**, 12x8 (break apart) strips, 96 wells  
Wells coated with a polyclonal anti-Androstenedione antibody
2.  **Calibrators N= 0 to 5**, 6 vials, 1 mL, ready to use  
See exact values on vial labels  
Conversion: ng/mL x 3.492 = nmol/l,  
Standards are calibrated against Reference Material of the National Measurement Institute Australia (NMIA-M955)  
contain non-mercury preservative.
3.  **Control Low & High**, 2 vials, 1.0 mL each, ready to use;  
For control values and ranges please refer to vial label or QC-Datasheet.  
Contain non-mercury preservative.
4.  **Enzyme Conjugate**, 1 vial, 25 mL, ready to use  
Androstenedione conjugated to horseradish Peroxidase,  
\* contains non-mercury preservative.
5.  **Substrate Solution**, 1 vial, 25 mL, ready to use  
TMB
6.  **Stop Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use  
contains 0.5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.
7.  **Wash Solution**, 1 vial, 30 mL (40X concentrated)  
see „Preparation of Reagents“

### 4.2 Equipment and material required but not provided

- A microtiter plate calibrated reader (450±10 nm)
- Calibrated variable precision micropipettes.
- Absorbent paper.
- Distilled water.
- Timer
- Semi-logarithmic graph paper or software for data reduction

### 4.3 Storage and stability of the Kit

When stored at 2-8°C unopened reagents will retain reactivity until expiration date. Do not use reagents beyond this date.  
Opened reagents must be stored at 2-8°C. Microtiter wells must be stored at 2-8°C. Once the foil bag has been opened, care should be taken to close it tightly again. Opened kits retain activity for 8 weeks if stored as described above.

### 4.4 Preparation of Reagents

Allow all reagents and required number of strips to reach room temperature prior to use.

#### Wash Solution

Add distilled water to the 40X concentrated Wash Solution  
Dilute 30 mL of concentrated Wash Solution with 1170 mL deionized water to a final volume of 1200 mL.  
*The diluted Wash Solution is stable for 2 weeks at room temperature.*

### 4.5 Disposal of the Kit

The disposal of the kit must be made according to the national regulations. Special information for this product is given in the Material Safety Data Sheets.

### 4.6 Damaged Test Kits

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

## 5 SPECIMEN

Serum or EDTA plasma can be used in this assay.

Do not use heparin or citrate plasma. Heparin plasma leads to slightly reduced values. For citrate plasma the results are significantly increased.

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

In general it should be avoided to use haemolytic, icteric or lipaemic specimens. For further information refer to chapter "Interfering Substances".

### 5.1 Specimen 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 anti coagulant and centrifuged immediately after collection.  
(E.g. Sarstedt Monovette for EDTA plasma)

### 5.2 Specimen Storage

Specimens should be capped and may be stored for up to 5 days at 2-8°C prior to assaying.

Specimens held for a longer time (up to 12 months) should be frozen only once at -20°C prior to assay. Thawed samples should be inverted several times prior to testing.

### 5.3 Specimen Dilution

If in an initial assay, a serum specimen is found to contain more than the highest calibrator, the specimens can be diluted 10-fold or 100 fold with *Calibrator 0* and reassayed as described in Assay Procedure.

For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

#### Example:

- a) dilution 1:10: 10 µL Sample + 90 µL Calibrator 0 (mix thoroughly)
- b) dilution 1:100: 10 µL dilution a) 1:10 + 90 µL Calibrator 0 (mix thoroughly).

## 6 TEST PROCEDURE

### 6.1 General Remarks

- All reagents and specimens must be allowed to come to room temperature before use. All reagents must be mixed without foaming.
- Once the test has been started, all steps should be completed without interruption.
- Use new disposal plastic pipette tips for each calibrator, control or sample in order to avoid cross contamination.
- Absorbance is a function of the incubation time and temperature. 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.
- As a general rule the enzymatic reaction is linearly proportional to time and temperature.

### 6.2 Assay Procedure

Each run must include a calibration curve.

1. Secure the desired number of Microplate in the holder.
  2. Dispense **20 µL** of each Calibrators, controls and samples with new disposable tips into appropriate wells.
  3. Dispense **200 µL** Enzyme Conjugate into each well.  
Thoroughly mix for 10 seconds. It is important to have a complete mixing in this step.
  4. Incubate for **60 minutes** at room temperature.
  5. Briskly shake out the contents of the wells.  
Rinse the wells 4 times with diluted Wash Solution (400 µL per well). Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.
- Important note:**  
The sensitivity and precision of this assay is markedly influenced by the correct performance of the washing procedure!
6. Add **200 µL** of Substrate Solution to each well.
  7. Incubate for **30 minutes** at room temperature.
  8. Stop the enzymatic reaction by adding **100 µL** of **Stop Solution** to each well.
  9. Determine the absorbance (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.

### 6.3 Calculation of Results

1. Calculate the average absorbance values for each set of calibrators, controls and patient samples.
2. Using semi-logarithmic graph paper, construct a calibration curve by plotting the mean absorbance obtained from each calibrator against its concentration with absorbance value on the vertical(Y) axis and concentration on the horizontal (X) axis.
3. Using the mean absorbance value for each sample determine the corresponding concentration from the calibration curve.
4. Automated method: The results in the Instructions for Use have been calculated automatically using a 4-Parameter curve fit. (4 Parameter Rodbard or 4 Parameter Marquardt are the preferred methods.) Other data reduction functions may give slightly different results.
5. The concentration of the samples can be read directly from this calibration curve. Samples with concentrations higher than that of the highest calibrator have to be further diluted. For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

### **6.3.1 Example of Typical Calibration curve**

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

Calibrator	Optical Units (450 nm)
Calibrator 0 (0 ng/mL)	1.93
Calibrator 1 (0.1 ng/mL)	1.76
Calibrator 2 (0.3 ng/mL)	1.39
Calibrator 3 (1.0 ng/mL)	0.87
Calibrator 4 (3.0 ng/mL)	0.47
Calibrator 5 (10.0 ng/mL)	0.23

## **7 EXPECTED VALUES**

It is strongly recommended that each laboratory should determine its own normal and abnormal values.

In a study conducted with apparently normal healthy adults, using the DIAsource Androstenedione ELISA the following values are observed:

### **Females**

Age (years)	n	Mean (ng/mL)	Median (ng/mL)	2.5th Percentile (ng/mL)	97.5th Percentile (ng/mL)	Range (min. - max.) (ng/mL)
0 - 10	29	0.39	0.30	0.02	0.86	0.00 – 0.99
11 - 17	17	1.36	1.18	0.25	2.78	0.10 – 2.83
18 - 53	66	2.19	2.12	0.75	3.89	0.30 – 4.39
54 - 82	26	1.32	1.20	0.35	2.49	0.25 – 2.72

### **Males**

Age (years)	n	Mean (ng/mL)	Median (ng/mL)	2.5th Percentile (ng/mL)	97.5th Percentile (ng/mL)	Range (min. - max.) (ng/mL)
0 - 10	34	0.40	0.26	0.01	1.31	0.00 - 1.54
11 - 17	16	1.75	1.53	0.33	3.30	0.11 - 3.50
18 - 53	36	2.15	2.06	0.45	4.20	0.44 - 4.56
54 - 82	44	1.95	1.96	0.30	3.93	0.26 - 4.26

The results alone should not be the only reason for any therapeutic consequences. The results should be correlated to other clinical observations and diagnostic tests.

## **8 QUALITY CONTROL**

Good laboratory practice 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 values and ranges stated on the QC sheet always refer to the current kit lot and should be used for direct comparison of the results.

It is also recommended to make use of national or international Quality Assessment programs in order to ensure the accuracy of the results.

Employ appropriate statistical methods for analysing control values and trends. If the results of the assay do not fit to 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 DIAsource directly.

## 9 ASSAY CHARACTERISTICS

### 9.1 Assay Dynamic Range

The range of the assay is between 0.021 – 10 ng/mL.

### 9.2 Specificity of Antibodies (Cross Reactivity)

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

Compound	Crossreactivity %
Androstenedione	100.0
Androsterone	< 0.01
Aldosterone	0.0
Cortisol	< 0.2
Dihydrotestosterone	< 0.01
Dihydroepiandrosterone	< 0.01
Estriol	1.8
16-Epiestriol	< 0.01
Estradiol	< 0.01
Estriol-3-glucuronide	< 0.01
Estriol-16-glucuronide	< 0.01
Estriol-16-sulfate	< 0.01
Estrone	< 0.01
17a-Pregnenolone	< 0.01
17OH-Progesterone	< 0.3
Progesterone	< 0.01
Testosterone	0.6

### 9.3 Analytical Sensitivity

The analytical sensitivity was calculated from the mean minus two standard deviations of twenty (20) replicate analyses of *Calibrator0* and was found to be 0.021 ng/mL.

### 9.4 Precision

The within assay variability (Intra Assay) and between assay variability (Inter Assay) are shown below:

#### 9.4.1 Intra Assay Variation

	Intra Assay Variation		
Sample	n	Mean (ng/mL)	CV (%)
1	20	1.2	5.3
2	20	0.7	9.2
3	20	8	6.9

#### 9.4.2 Inter Assay Variation

	Inter Assay Variation		
Sample	n	Mean (ng/mL)	CV (%)
1	40	4.3	8.3
2	40	3.0	8.1
3	40	1.0	8.7

#### 9.4.3 Inter-Lot

The inter-assay (between-lots) variation was determined by measuring each sample 6 times with 3 different kit lots:

Sample	n	Mean (ng/mL)	CV (%)
1	18	3.4	5.2
2	18	5.3	8.7
3	18	7.1	5.6

## 9.5 Recovery

Samples have been spiked by adding Androstenedione solutions with known concentrations.

The % Recovery has been calculated by multiplication of the ratio of the measurements and the expected values with 100.

	Sample 1	Sample 2	Sample 3	
Concentration [ng/mL]	1.5	1.4	2.0	
Average Recovery [%]	106.6	102.6	104.0	
Range of Recovery [%]	from to	96.4 112.9	99.1 108.6	93.3 114.0

## 9.6 Linearity

Samples were measured undiluted and in serial dilutions with standard 0. The recovery (%) was calculated by multiplying the ratio of expected and measured values with 100.

	Sample 1	Sample 2	Sample 3	
Concentration [ng/mL]	6.2	4.7	7.2	
Average Recovery	97.0	96.3	93.4	
Range of Recovery [%]	from to	92.3 102.9	91.6 101.3	86.7 105.6

## 10 LIMITATIONS OF USE

Reliable and reproducible results will be obtained when the assay procedure is performed with a complete understanding of the package insert instruction and with adherence to good laboratory practice.

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

### 10.1 Interfering Substances

Haemoglobin (up to 4 mg/mL), Bilirubin (up to 0.5 mg/mL) and Triglyceride (up to 30 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 to the measurement of Androstenedione in a sample.

### 10.3 High-Dose-Hook Effect

Hook effect was not observed in this test up to a concentration of 186 ng/mL of Androstenedione.

## **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 rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other 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. In case of any doubt or concern please contact DIAsource.

### **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 therapeutical consequences be derived.

The test result itself should never be the sole determinant for deriving any therapeutical 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.

## **12 REFERENCES**

1. Kicman, A. T., Bassindale, T., Cowan, D. A., Dale, S., Hutt, A. J., and Leeds, A. R. Effect of androstenedione ingestion on plasma testosterone in young women; a dietary supplement with potential health risks. *Clin Chem* 2003, 49:167-169.
2. Brown, G.A., Vukovich, M.D., Martini, E.R., Kohut, M.L., Franke, W.D., Jackson, D.A., and King, D.S. Endocrine responses to chronic androstenedione intake in 30- to 56-year-old men. *J Clin Endocrinol Metab* 2000, 85:4074-4080.
3. Erickson GF 1993 Normal regulation of ovarian androgen production. *Seminars in Reproductive Endocrinology* 11:307-312
4. Mango D, Scirpa P, Battaglia F, Tartaglia E, Manna P. Diagnostic significance of steroid hormones in patients with ovarian cancer. *J Endocrinol Invest.* 1986 Aug;9(4):307-14

Other translations of this Instructions for Use can be downloaded from our website: <https://www.diasource-diagnostics.com/>

Revision date : 2023-07-18



# ANDROSTENEDIONE ELISA

es

KAPD3265

IN VITRO DIAGNOSTIC USE

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 91

## 1 INTRODUCCIÓN

El Kit de inmunoensayo enzimático Diasource Androstenedione proporciona los materiales necesarios para la determinación cuantitativa del Androstenodiona en suero y plasma EDTA.

Este ensayo está diseñado solo para diagnóstico *in vitro*.

## 2 FUNDAMENTO DEL ENSAYO

El Kit Diasource Androstenedione ELISA es un ensayo en fase sólida de inmunoadsorción unido a enzimas (ELISA), basado en el principio de unión competitiva.

Los pocos de las placas están recubiertos con un anticuerpo / policlonal dirigido contra un foci antigénico en la molécula Androstenodiona. En las muestras de los pacientes Androstenodiona compite con un conjugado Androstenodiona -peroxidasa de rábano en la unión al anticuerpo inmovilizado. Después de la incubación el conjugado no unido se lava.

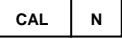
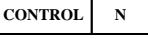
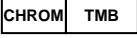
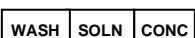
La cantidad de conjugado de peroxidasa unido es inversamente proporcional a la concentración de Androstenodiona en la muestra. Después de la adición de la solución sustrato, la intensidad de color desarrollado es inversamente proporcional a la concentración de Androstenodiona en la muestra del paciente.

## 3 PRECAUCIONES

- Este kit es solamente para diagnóstico *in vitro*.
- Por favor, se usa solo la versión válida de la metodología técnica incluida aquí en el kit.
- Para obtener información de las sustancias peligrosas incluidas en el kit por favor mirar las hojas de los datos de seguridad del material.
- Todos los reactivos en este kit de ensayo que contienen suero o plasma humano se han ensayado y confirmado ser negativos para HIV I/II, HBsAg y HCV mediante procedimientos aprobados por la FDA. Sin embargo, todos los reactivos deben ser tratados tanto en su uso como dispensación como potencialmente biopeligrosos.
- Evitar contacto con *Stop Solution* que contiene  $H_2SO_4$  0,5 M. Puede provocar irritación y quemaduras en la piel.
- Nunca pipetejar con la boca y evitar el contacto de los reactivos y las muestras con la piel y con membranas mucosas.
- No fumar, comer, beber o usar cosméticos en áreas donde las muestras o los reactivos del kit están siendo usados.
- Usar guantes de látex cuando se utilicen las muestras y los reactivos. La contaminación microbiana de los reactivos o las muestras puede dar resultados erróneos.
- El manejo debe realizarse de acuerdo a los procedimientos definidos por las guías o regulación nacionales de seguridad de sustancias biopeligrosas.
- No utilizar los reactivos después de su fecha de caducidad que aparece en las etiquetas del kit.
- Todos los volúmenes indicados han de ser realizados de acuerdo con el protocolo. Los resultados óptimos del ensayo se obtienen solo cuando se utilizan pipetas y lectores de microplacas calibrados.
- No mezclar o usar componentes de kits con distinto número de lote. Se recomienda no intercambiar pocos de distintas placas incluso si son del mismo lote. Los kits pueden haber sido enviados o almacenados bajo diferentes condiciones y las características de unión de las placas pueden resultar diferentes.
- Los compuestos químicos y los reactivos preparados o utilizados han de tratarse como residuos peligrosos de acuerdo con las guías o regulación nacionales de seguridad de sustancias biopeligrosas.
- Las hojas de los datos de seguridad de este producto están disponibles bajo pedido directamente a Diasource.

## 4 KIT COMPONENTS

### 4.1 Contents of the Kit

1.  **Microtiterwells**(placas multipicillo, 12 x 8 tiras separables, 96 pocillos Pocillos recubiertos con anticuerpo anti- Androstenodiona (políclonal).
2.  **Calibradores (Calibrador 0-5)**, 6 viales, 1 mL, listo para usar Concentraciones: 0-0.1-0.3-1.0-3.0-10 ng/ml Conversión: ng/mL x 3.492 = nmol/l, Los calibradores están calibrados según el material de referencia de la National Measurement Institute Australia (NMIA-M955) Contiene conservante sin mercurio.
3.  **Control Low & High**, 2 viales, 1.0 mL each, listo para usar; Referir los valores y rangos del control a la etiqueta del vial o a la Hoja de datos QC. Contiene conservante sin mercurio.
4.  **Enzyme Conjugate (Conjugado enzimático)**, 1 vial, 25 mL, listo para usar Androstenediona conjugado con la Peroxidasa de rábano, Contiene conservante sin mercurio..
5.  **Substrate Solution (Solución de sustrato)** 1 vial, 25 mL, listo para usar Tetrametilbencidina (TMB)
6.  **Stop Solution (Solución de parada)**, 1 vial, 14 mL, listo para usar contiene 0.5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Evitar el contacto con la Solución de parada. Puede causar irritación y quemaduras en el piel
7.  **Wash Solution (Solución de lavado)**, 1 vial, 30 mL concentrado 40x ver "Preparación de los Reactivos"

**Nota:** Se puede solicitar el *Calibrador 0* para la dilución de la muestra.

### 4.2 Equipamiento y material requerido pero no provisto

- Lector de microplacas calibrado (450 ± 10 nm)
- Micropipetas de precisión variable calibradas.
- Papel absorbente.
- Agua destilada.

### 4.3 Almacenamiento y estabilidad del kit

Cuando se almacena a 2 °C - 8 °C, los reactivos sin abrir mantienen su reactividad hasta la fecha de caducidad. No utilizar los reactivos más allá de esta fecha.

Los reactivos abiertos han de almacenarse a 2 °C - 8 °C. Las placas multipicillo han de almacenarse a 2 °C - 8 °C. Una vez se ha abierto la bolsa hay que tener cuidado y cerrarla de nuevo.

Los kits abiertos conservan su actividad durante 8 semanas si se almacenan como se ha descrito arriba.

### 4.4 Preparación de los Reactivos

Dejar que todos los reactivos y el número requerido de tiras alcancen la temperatura ambiente antes de usarse.

#### ***Wash Solution***

Mezclar 30 mL de *Wash Solution* concentrada con 1170 mL de agua desionizada hasta un volumen final de 1200 mL. *La solución del lavado diluida es estable durante 2 semanas a temperatura ambiente.*

### 4.5 Eliminación del Kit

La eliminación del kit debe realizarse de acuerdo con las leyes nacionales. En las hojas de datos de seguridad se proporciona información especial de este producto (ver capítulo 13).

### 4.6 Kits de ensayo dañados

En caso de que exista cualquier daño severo del kit de ensayo o de sus componentes, ha de informarse por escrito a Diasource, no más tarde de una semana después de recibir el kit. No deben utilizarse componentes dañados para llevar a cabo un ensayo. Han de almacenarse hasta que se encuentre una solución. Después de esto, deben ser eliminados de acuerdo con las leyes oficiales.

## 5 MUESTRAS

En este ensayo pueden usarse suero o plasma EDTA.

No usar plasma heparina o plasma citrato. El heparina plasmático sufre disminución de sus valores, el citrato presenta valores muy aumentados.

Tener en cuenta: No deben usarse muestras que contengan acida sódica.

En general, se debe evitar el uso de muestras hemolíticas, ictéricas o lipémicas. Para más información consulte el capítulo "Sustancias que pueden interferir".

### 5.1 Toma de muestras

#### Suero:

Recoger la sangre por punción en la vena (ej. Sarstedt Monovette para el suero), permitir coagulación, y separar el suero por centrifugación a temperatura ambiente. No centrifugar antes de la coagulación completa. Las muestras de pacientes que reciben terapia anticoagulante requieren más tiempo para coagular.

#### Plasma:

Toda la sangre ha de recogerse en tubos de centrífuga que contengan anticoagulante y centrifugar inmediatamente tras la recogida.  
(Ej. Sarstedt Monovette para plasma EDTA)

### 5.2 Almacenamiento de las muestras

Las muestras deben ser tapadas y pueden ser almacenadas hasta 5 días a 2 °C a 8 °C antes del ensayo.

Las muestras almacenadas por un período de tiempo mas largo ((hasta 12 meses) han de congelarse sólo una vez a -20 °C antes del ensayo. Las muestras descongeladas deben invertirse varias veces antes del ensayo.

### 5.3 Dilución de las muestras

Si en un ensayo inicial, se encuentra una muestra que presenta valores mayores que el calibrador más concentrado, ha de diluirse con *Calibrador 0* y volver a ensayarse como se describe en el Procedimiento de Ensayo.

Para el cálculo de las concentraciones habrá que tener en cuenta el factor de dilución.

#### Ejemplo:

- a) dilución 1:10: 10 µL muestra + 90 µL *Calibrador 0* (mezclar totalmente)
- b) dilución 1:100: 10 µL dilución a) 1:10 + 90 µL *Calibrador 0* (mezclar totalmente).

## 6 PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

### 6.1 Consideraciones generales

- Todos los reactivos y muestras han de estar a temperatura ambiente antes de su uso. Todos los reactivos deben mezclarse sin formar espuma.
- Una vez se ha comenzado el ensayo deben completarse todos los pasos sin interrupción.
- Utilizar puntas de pipeta de plástico nuevas para cada calibrador, control o muestra para evitar combinaciones cruzadas.
- La absorbancia es función del tiempo de incubación y la temperatura. Antes de comenzar el ensayo, se recomienda que todos los reactivos estén preparados, tapas removidas, todos los pocillos que se necesiten asegurados en recipiente, etc. Esto asegurará un tiempo similar para cada paso de pipeteo sin que haya interrupciones.
- Como regla general, la reacción enzimática es linealmente proporcional al tiempo y a la temperatura.

### 6.2 Procedimiento de ensayo

Cada uno debe incluir una curva de calibradores.

1. Asegurar el número deseado de pocillos en el recipiente.
2. Dispensar **20 µL** de cada *Calibrador, Control* y muestras con puntas nuevas en los pocillos adecuados.
3. Dispensar **200 µL** de *Enzyme Conjugate* a cada pocillo.  
Mezclar totalmente durante 10 segundos. Es importante mezclar completamente en este paso.
4. Incubar durante **60 minutes** a temperatura ambiente.
5. Sacudir enérgicamente el contenido de los pocillos.  
Lavar los pocillos **4 veces** con *Wash Solution* diluida (400 µL por pocillo). Realizar un golpe seco de los pocillos contra el papel absorbente para eliminar las gotas residuales.  
**Nota importante:**  
La sensibilidad y la precisión de este ensayo se ve marcadamente influenciada por la realización correcta del proceso de lavado!
6. Adicionar **200 µL** de *Substrate Solution* a cada pocillo.
7. Incubar durante **30 minutes** a temperatura ambiente.
8. Parar la reacción enzimática mediante la adición de **100 µL** de *Stop Solution* a cada pocillo.
9. Determinar la absorbancia (OD) de la solución en cada pocillo a 450 nm (lectura) y a 620 nm a 630 nm (se recomienda la sustracción de fondo) con un lector de microplacas. Se recomienda que los pocillos se lean dentro de los 10 minutos siguientes a la adición de la solución de parada (*Stop Solution*).

### 6.3 Cálculo de los Resultados

1. Calcular los valores de absorbancia media para cada conjunto de calibradores, controles y muestras de pacientes.
2. Construir una curva estándar mediante la representación de la absorbancia media obtenida para cada calibrador frente a su concentración con el valor de absorbancia en el eje vertical (Y) y la concentración en el eje horizontal (X).
3. Usando el valor de absorbancia media de cada muestra determinar la concentración correspondiente a partir de la curva estándar.
4. Método automatizado: Los resultados en la IFU se han calculado automáticamente usando una curva de regresión 4 Parámetros (4 Parámetros Rodbard o 4 Parámetros Marquardt son los métodos preferidos.). Otras funciones de regresión darán lugar a resultados sensiblemente diferentes.
5. La concentración de las muestra puede leerse directamente de la curva de calibradores. Las muestras con concentraciones superiores al mayor estándar han de diluirse. Para el cálculo de las concentraciones hay que tener en cuenta el factor de dilución.

#### 6.3.1 Ejemplo de una Curva Estándar Típica

Los siguientes datos son solamente para la explicación y **no** pueden ser utilizados en lugar de los datos generados en el momento del ensayo.

Estándar	Unidades Ópticas (450 nm)
Calibrador 0 (0 ng/mL)	1,93
Calibrador 1 (0,1 ng/mL)	1,76
Calibrador 2 (0,3 ng/mL)	1,39
Calibrador 3 (1,0 ng/mL)	0,87
Calibrador 4 (3,0 ng/mL)	0,47
Calibrador 5 (10,0 ng/mL)	0,23

## 7 VALORES ESPERADOS

Se recomienda encarecidamente que cada laboratorio determine sus valores normales e inusuales.

En un estudio con donantes de sangre aparentemente sanos utilizando el Diasource Androstanedione ELISA se observaron los siguientes valores:

Mujeres (suero)

Edad (años)	n	Media (ng/mL)	Mediana (ng/mL)	Percentil 2,5% (ng/mL)	Percentil 97,5% (ng/mL)	Rango (min. - max.) (ng/mL)
0 - 10	29	0,39	0,30	0,02	0,86	0,00 – 0,99
11 - 17	17	1,36	1,18	0,25	2,78	0,10 – 2,83
18 - 53	66	2,19	2,12	0,75	3,89	0,30 – 4,39
54 - 82	26	1,32	1,20	0,35	2,49	0,25 – 2,72

Hombres (suero)

Edad (años)	n	Media (ng/mL)	Mediana (ng/mL)	Percentil 2,5% (ng/mL)	Percentil 97,5% (ng/mL)	Rango (min. - max.) (ng/mL)
0 - 10	34	0,40	0,26	0,01	1,31	0,00 – 1,54
11 - 17	16	1,75	1,53	0,33	3,30	0,11 – 3,50
18 - 53	36	2,15	2,06	0,45	4,20	0,44 – 4,56
54 - 82	44	1,95	1,96	0,30	3,93	0,26 – 4,26

## 8 CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda usar muestras control de acuerdo con las leyes estatales y federales. El uso de muestras control ser recomienda para asegurar la validez diaria de los resultados. Usar controles tanto a niveles normal como patológico.

Los controles y los correspondientes resultados del Laboratorio de control de calidad están fijados en el certificado de control de calidad que acompaña al kit. Los valores y los rangos fijados en la hoja del control de calidad se refieren siempre al kit actual y deben usarse para la comparación directa de los resultados.

Es recomendable también hacer uso de programas de Aseguramiento de la Calidad nacionales o internacionales para asegurar la exactitud de los resultados.

Utilizar métodos estadísticos apropiados para el análisis de los valores y tendencia de los controles. Si los resultados del ensayo no se ajustan a los rangos aceptables establecidos en los controles, los resultados obtenidos de los pacientes han de considerarse inválidos.

En este caso, por favor comprobar las siguientes áreas técnicas: Pipeteo y tiempo empleado, fotómetro, fecha de caducidad de los reactivos, condiciones de almacenamiento e incubación, métodos de aspiración y lavado.

Después de comprobar los asuntos mencionados arriba sin encontrar ningún error, contactar con su distribuidor o con Diasource directamente.

## **9 CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO**

### **9.1 Rango dinámico del ensayo**

El rango del ensayo se encuentra entre 0,021 – 10 ng/mL.

### **9.2 Especificidad de los Anticuerpos (Reactividad Cruzada)**

Consultar el manual de usuario en inglés.

### **9.3 Sensibilidad Analítica**

La sensibilidad analítica se calculó a partir de la media menos dos desviaciones estándar de veinte (20) réplicas del Calibrador 0 y resultó ser 0,021ng/mL.

### **9.4 Precisión**

Consultar el manual de usuario en inglés.

### **9.5 Recuperación**

Consultar el manual de usuario en inglés.

### **9.6 Linealidad**

Consultar el manual de usuario en inglés.

## **10 LIMITACIONES DE USO**

Cualquier manipulación inadecuada de las muestras o modificaciones del ensayo pueden influenciar los resultados.

### **10.1 Sustancias que pueden interferir**

Hemoglobina (hasta 4 mg/mL), Bilirrubina (hasta 0,5 mg/mL) y Triglicéridos (hasta 30 mg/mL) no influencian los resultados del ensayo.

### **10.2 Interferencias con drogas**

Hasta ahora no se han encontrado sustancias (drogas) conocidas por nosotros, que tengan influencia en la medida de Androstenodiona en una muestra.

### **10.3 Efecto Gancho-Dosis-Elevada**

No se ha observado efecto gancho en este ensayo hasta 186 ng/mL de androstenodiona.

## **11 ASPECTOS LEGALES**

### **11.1 Fiabilidad de los Resultados**

El ensayo debe realizarse exactamente de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Mas aún, el usuario debe ajustarse estrictamente a las reglas BPL (Buenas Prácticas de Laboratorio) o a otros estándares y/o leyes nacionales aplicables. Esto es especialmente relevante para el uso de reactivos control. Es importante incluir siempre, dentro del procedimiento de ensayo, un número suficiente de controles para validar la exactitud y la precisión del ensayo.

Los resultados del ensayo son válidos sólo si todos los controles se encuentran dentro de los rangos especificados y si todos los otros parámetros del ensayo se encuentran dentro de las especificaciones dadas para el ensayo. En caso de alguna duda o inquietud, por favor, contactar con Diasource

### **11.2 Consecuencias Terapéuticas**

Las consecuencias terapéuticas nunca deben basarse sólo en los resultados de laboratorio incluso si todos los resultados del ensayo están de acuerdo con los asuntos fijados en el punto 11.1. Cualquier resultado de laboratorio es solamente una parte del cuadro clínico de un paciente. Solamente en los casos donde los resultados de laboratorio están en acuerdo con todo el cuadro clínico de un paciente, se pueden derivar consecuencias terapéuticas.

Nunca deben derivarse consecuencias terapéuticas a partir de solamente el resultado obtenido en el ensayo

### **11.3 Responsabilidad**

Cualquier modificación del kit y/o cambio o mezcla de cualquier componente procedentes de kits de lotes diferentes puede afectar negativamente a los resultados esperados y en la validez de todo el test. Esas modificaciones y/o cambios invalidan cualquier reclamación de reposición.

Las reclamaciones emitidas debidas a una mala interpretación de los resultados de laboratorio por parte del comprador referidos al punto 11.2 son también inválidas. A pesar de todo, en el caso de cualquier reclamación, la responsabilidad del fabricante no excede el valor del kit.

Cualquier daño provocado al kit durante su transporte no está sujeto a la responsabilidad del fabricante.

## **12 REFERENCIAS / BIBLIOGRAFÍA**

Consultar el manual de usuario en inglés.

Revision date : 2023-07-18



# Androstenediona ELISA

PT

KAPD3265

UTILIZAÇÃO EM DIAGNÓSTICO IN VITRO

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Bélgica - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 91

## 1 INTRODUÇÃO

O Dispositivo de Teste Imunoenzimático de Androstenediona DIAsource fornece materiais para a determinação quantitativa de Androstenediona em soro e plasma EDTA.

Este ensaio destina-se apenas ao uso para diagnóstico *in vitro*.

A hormona esteroide Androstenediona é um dos principais androgénios, além da Testosterona e da Desidroepiandrosterona. A Testosterona, o androgénio ativo biológico mais importante, é derivado da conversão enzimática periférica da Androstenediona.

Nos homens, os androgénios são secretados principalmente pelas células de Leydig dos testículos, assim como, em menor grau, também no córtex adrenal. Nas mulheres, os androgénios são secretados principalmente nas glândulas suprarrenais e nos ovários. Cerca de 10 % dos androgénios são derivados da conversão periférica, principalmente da Desidroepiandrosterona (DHEA). A Androstenediona e a Testosterona mostram uma elevada variabilidade diurna. Os níveis mais elevados são medidos na parte da manhã. Na idade da puberdade os níveis séricos de androstenediona aumentam, sendo que, após a menopausa, diminuem novamente. Níveis elevados de Androstenediona são medidos durante a gravidez.

Em mulheres, são geralmente encontrados níveis elevados de Androstenediona (47% a 100% acima do normal) em casos de hirsutismo, principalmente em combinação com outros androgénios como a Testosterona e o Sulfato de Desidroepiandrosterona (DHEA-S). A superprodução de Androstenediona deve-se a uma disfunção ovárica ou talvez seja de origem suprarrenal. Elevados níveis de Androstenediona circulante são encontrados em mulheres com ovários policísticos e com efeito da enzima 21-hidroxilase. Níveis significativamente mais baixos de Androstenediona são encontrados na osteoporose pós-menopausa.

## 2 PRINCIPIO DO TESTE

O dispositivo de teste Androstenediona ELISA da DIAsource é um ensaio imunoabsorvente ligado a enzimas em fase sólida (ELISA), baseado no princípio da ligação competitiva.

Os poços de microtitulação são revestidos com um anticorpo policlonal (coelho) direcionado para um local antigênico da molécula de androstenediona.

Durante a primeira incubação, a androstenediona na amostra adicionada compete com o conjugado enzimático adicionado, que é uma molécula de androstenediona conjugada à peroxidase de rábano silvestre, pela ligação ao anticorpo revestido.

Após uma etapa de lavagem, para remover todas as substâncias não ligadas, a fase sólida é incubada com a solução de substrato. A reação é parada abruptamente por adição de solução de parada e a densidade óptica (DO) do produto amarelo resultante é medida. A intensidade da cor é inversamente proporcional à concentração do analito na amostra.

Uma curva padrão é construída plotando os valores de OD em relação às concentrações de padrões, e as concentrações de amostras desconhecidas são determinadas usando essa curva padrão.

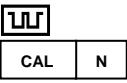
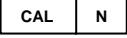
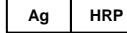
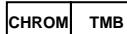
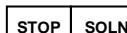
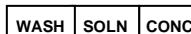
## 3 PRECAUÇÕES

- Este dispositivo de teste destina-se apenas ao uso diagnóstico *in vitro*. Apenas para utilização profissional.
- Todos os reagentes deste dispositivo de teste, que contêm soro ou plasma humano, foram testados e confirmados como negativos para HIV I/II, HBsAg e HCV através de procedimentos aprovados pela FDA. Todos os reagentes, no entanto, devem ser tratados como potenciais riscos biológicos em uso e para eliminação.
- Antes de iniciar o teste, leia atentamente as instruções até ao fim. Use a versão válida do folheto informativo fornecido com o dispositivo de teste. Certifique-se de que tudo é compreendido.
- A microplaca contém tiras destacáveis. Os poços não utilizados devem ser armazenados entre 2 °C e 8 °C na bolsa de alumínio selada e utilizados na estrutura fornecida.
- A pipetagem das amostras e reagentes deve ser feita o mais rapidamente possível e na mesma sequência para cada etapa.
- Use reservatórios apenas para reagentes simples. Isto aplica-se especialmente aos reservatórios de substrato. A utilização de um reservatório para distribuir uma solução de substrato que tenha sido previamente utilizado para a solução de conjugado poderá fazer com que a solução fique corada. Não despeje os reagentes novamente para os frascos, pois poderá ocorrer contaminação devido a tais reagentes.
- Misture muito bem o conteúdo dos poços da microplaca para garantir bons resultados de teste. Não reutilize os micropoços.
- Não deixe os poços secarem durante o teste; adicione os reagentes imediatamente após a conclusão das etapas de lavagem.
- Deixe os reagentes atingirem a temperatura ambiente (21 a 26 °C) antes de iniciar o teste. A temperatura afetará as leituras de absorvância do teste. No entanto, os valores para as amostras do doente não serão afetados.
- Nunca pipete pela boca e evite o contacto de reagentes e amostras com a pele e as membranas mucosas.
- Não fume, não coma, não beba nem aplique cosméticos em áreas onde são manipuladas amostras ou reagentes do dispositivo.
- Use luvas de látex descartáveis ao manusear amostras e reagentes. A contaminação microbiana de reagentes ou amostras poderá causar resultados falsos.
- O manuseamento deve ser feito de acordo com os procedimentos definidos por uma diretriz ou regulamento nacional apropriado em matéria de risco biológico.
- Não utilize reagentes além da data de validade, como indicado nas etiquetas do dispositivo de teste.
- Todos os volumes indicados devem ser realizados de acordo com o protocolo. Só são obtidos resultados de teste ótimos quando se utilizam pipetas calibradas e leitores de placas de microtitulação.
- Não misture nem utilize componentes de dispositivos de teste com números de lote diferentes. É aconselhável não trocar poços de placas diferentes, mesmo do mesmo lote. É possível que os dispositivos de teste tenham sido enviados ou armazenados em condições diferentes, pelo que as características de ligação das placas poderão ser ligeiramente diferentes.
- Evite o contacto com a Solução de Paragem que contém 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Pode causar irritação cutânea e queimaduras.

- Alguns reagentes contêm Proclin 300, BND e/ou MIT como conservantes. Em caso de contacto com os olhos ou a pele, lave imediatamente com água abundante.
- O substrato TMB tem um efeito irritante na pele e nas mucosas. Em caso de possível contacto, lave os olhos com uma quantidade abundante de água e a pele com sabão e água abundante. Lave os objetos contaminados antes de os utilizar novamente. Em caso de inalação, leve a pessoa para o ar livre.
- Os produtos químicos e os reagentes preparados ou usados devem ser tratados como resíduos perigosos de acordo com a diretriz ou regulamento nacional de segurança em matéria de risco biológico.
- Para informações sobre substâncias perigosas incluídas no dispositivo de teste, consulte as Fichas de Dados de Segurança. As Fichas de Dados de Segurança para este produto estão disponíveis mediante solicitação, efetuada diretamente junto da DIAsource.

## 4 COMPONENTES DO DISPOSITIVO DE TESTE

### 4.1 Conteúdo do Dispositivo de Teste

1.  **Poços de microtitulação**, 12 x 8 tiras (destacáveis), 96 poços  
Poços revestidos com um anticorpo policlonal anti Androstenediona
2.  **Calibradores N = 0 a 5**, 6 frascos, 1 ml, pronto a usar  
Ver valores exatos no rótulo dos frascos  
Conversão: ng/ml x 3,492 = nmol/l,  
Os padrões são calibrados em função do Material de Referência do Instituto Nacional de Medição da Austrália (NMIA-M955).  
Contém conservante sem mercúrio.
3.  **Controlo Baixo e Alto**, 2 frascos, 1,0 ml cada um, pronto a usar;  
Para valores e intervalos de controlo, consulte o rótulo do frasco ou a Ficha de Dados de CQ.  
Contém conservante sem mercúrio.
4.  **Conjugado Enzimático**, 1 frasco, 25 ml, pronto a usar  
Androstenediona conjugado a Peroxidase de rábano.  
\* Contém conservante sem mercúrio.
5.  **Solução de substrato**, 1 frasco, 25 ml, pronto a usar  
TMB
6.  **Solução de Paragem**, 1 frasco, 14 ml, pronto a usar  
Contém H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M  
Evitar o contacto com a solução de paragem. Pode causar irritação cutânea e queimaduras.
7.  **Solução de Lavagem**, 1 frasco, 30 ml (40x concentrado)  
Ver "Preparação de Reagentes"

### 4.2 Equipamentos e materiais necessários, mas não fornecidos

- Um leitor calibrado para placa de microtitulação (450±10 nm)
- Micropipetas calibradas de precisão variável.
- Papel absorvente.
- Água destilada ou desionizada.
- Temporizador
- Papel gráfico semi-logarítmico ou software para redução de dados

### 4.3 Armazenamento e estabilidade do Dispositivo de Teste

Quando armazenados entre 2 a 8 °C, os reagentes não abertos conservarão a sua reatividade até à data de validade. Não utilizar reagentes para além desta data.

Os reagentes abertos devem ser armazenados entre 2 a 8 °C. Os poços de microtitulação devem ser armazenados entre 2 a 8 °C. Uma vez aberta a bolsa de alumínio, deve ter-se o cuidado de a fechar novamente de forma hermética. Os dispositivos de teste abertos conservam a sua atividade por 8 semanas se armazenados como descrito acima.

### 4.4 Preparação de Reagentes

Permitir que todos os reagentes e o número necessário de tiras atinjam a temperatura ambiente antes de os usar.

#### Solução de Lavagem

Adicionar água desionizada à Solução de Lavagem concentrada 40X.

Diluir 30 ml de Solução de Lavagem concentrada com 1170 ml de água desionizada até obter um volume final de 1200 ml.

A solução de lavagem diluída permanece estável durante 2 semanas à temperatura ambiente.

### 4.5 Eliminação do Dispositivo de Teste

A eliminação do dispositivo de teste deve ser feita de acordo com as regulamentações nacionais. Informações especiais para este produto são fornecidas nas Fichas de Dados de Segurança dos Materiais.

### 4.6 Dispositivos de Teste danificados

Em caso de danos graves ao dispositivo de teste ou componentes, deve informar a DIAsource ImmunoAssays S.A. por escrito, o mais tardar uma semana após a receção do dispositivo de teste. Componentes isolados seriamente danificados não devem ser utilizados na execução de

um teste. Devem ser armazenados até encontrar-se uma solução final. Após isso, devem ser eliminados de acordo com os regulamentos oficiais.

## 5 AMOSTRA

Soro ou plasma com EDTA podem ser utilizados neste ensaio.

Não use heparina ou plasma de citrato. O plasma de heparina leva a valores ligeiramente reduzidos. Para o plasma de citrato, os resultados são aumentados significativamente.

Nota: As amostras que contêm azida sódica não devem ser utilizadas no ensaio.

Em geral, deve-se evitar o uso de amostras hemolíticas, ictéricas ou lipêmicas. Para mais informações, consulte o capítulo "Interferir Substâncias".

### 5.1 Colheita de Amostras

#### Soro:

Colher sangue através de venopunção (por exemplo, Sarstedt Monovette® para soro), deixar coagular e separar o soro através de centrifugação à temperatura ambiente. Não centrifugar antes que haja coagulação completa. As amostras de doentes sujeitos a terapêutica anticoagulante poderão necessitar de um tempo de coagulação alargado.

#### Plasma:

O sangue total deve ser colhido em tubos de centrifugação que contenham anticoagulante e centrifugado imediatamente após a colheita. (Por exemplo Sarstedt Monovette® para Plasma EDTA)

### 5.2 Armazenamento de Amostras

As amostras devem ser vedadas e armazenadas até 5 dias entre 2 a 8 °C antes da realização do teste.

As amostras armazenadas durante um período de tempo mais longo (até 12 meses) devem ser congeladas apenas uma vez a -20 °C antes do teste. As amostras descongeladas devem ser invertidas várias vezes antes do teste.

### 5.3 Diluição da Amostra

Se, num teste inicial, se verificar que uma amostra de soro tem uma quantidade superior ao calibrador mais elevado, as amostras podem ser diluídas numa diluição 10 ou 100 vezes superior com Calibrador 0 e novamente testadas como descrito no Procedimento de Teste.

Para o cálculo das concentrações este fator de diluição deve ser tido em conta.

#### Exemplo:

- a) diluição 1:10: 10 µL de Amostra + 90 µL de Calibrador 0 (misturar bem)
- b) diluição 1:100: 10 µL de diluição a) 1:10 + 90 µL de Calibrador 0 (misturar bem).

## 6 PROCEDIMENTO DO TESTE

### 6.1 Observações Gerais

- Equilibrar todos os reagentes e amostras à temperatura ambiente antes de os usar. Todos os reagentes devem ser misturados sem espuma.
- Uma vez que o teste tenha sido iniciado, todas as etapas devem ser concluídas sem interrupção.
- Utilizar novas pontas de pipetas de plástico descartáveis para cada calibrador, controlo ou amostra, a fim de evitar uma contaminação cruzada.
- A absorbância é uma função do tempo e da temperatura de incubação. Antes de iniciar o teste, recomenda-se que todos os reagentes estejam prontos, as tampas removidas, todos os poços necessários fixados no suporte, etc. Isto irá assegurar que o tempo decorrido para cada etapa de pipetagem seja o mesmo e ininterrupto.
- Em regra geral, a reação enzimática é linearmente proporcional ao tempo e à temperatura.

## 6.2 Procedimento de Teste

Cada teste realizado deve incluir uma curva de calibração.

1. Garantir o número desejado de Poços de Microtitulação no suporte.
2. Introduzir **20 µL** de cada Calibrador, controlo e amostra com novas pontas descartáveis nos poços apropriados.
3. Introduzir **200 µL** de Conjugado Enzimático em cada poço.  
Misturar cuidadosamente durante 10 segundos. É importante obter uma mistura completa nesta etapa.
4. Incubar durante **60 minutos** à temperatura ambiente.
5. Agitar vigorosamente o conteúdo dos poços.  
Enxaguar os poços 4 vezes com Solução de Lavagem diluída (400 µL por poço). Bater com os poços em papel absorvente para remover as gotículas residuais.  
**Nota importante:**  
A sensibilidade e precisão deste teste é significativamente influenciada pela correta execução do procedimento de lavagem!
6. Adicionar **200 µL** de Solução de Substrato em cada poço.
7. Incubar durante **30 minutos** à temperatura ambiente.
8. Parar a reação enzimática adicionando **100 µL** de Solução de Paragem em cada poço.
9. Determine a absorbância (DO) da solução em cada poço a 450 nm (leitura) e a 620 nm a 630 nm (subtração de fundo, recomendada) com um leitor de placas de microtitulação. Recomenda-se que os poços sejam lidos dentro de 10 minutos após a adição da solução de parada.

## 6.3 Cálculo de Resultados

1. Calcular os valores de absorbância média para cada conjunto de calibradores, controlos e amostras do doente.
2. Utilizando papel semi-logarítmico, construir uma curva de calibração traçando a absorbância média obtida a partir de cada calibrador em relação à sua concentração, com o valor de absorbância no eixo vertical (Y) e a concentração no eixo horizontal (X).
3. Utilizando o valor de absorbância médio para cada amostra, determinar a concentração correspondente a partir da curva de calibração.
4. Método automatizado: Os resultados indicados nas Instruções de Utilização foram calculados automaticamente utilizando-se um ajuste de curva de 4 parâmetros. (O método de Rodbard ou o Método de Marquardt, ambos com 4 Parâmetros, são os métodos preferenciais.) Outras funções de redução de dados podem produzir resultados ligeiramente diferentes.
5. A concentração das amostras pode ser lida diretamente a partir desta curva de calibração. As amostras com concentrações superiores às do calibrador mais elevado têm de ser mais diluídas. Para o cálculo das concentrações este fator de diluição deve ser tido em conta.

### 6.3.1 Exemplo de Curva de Calibração Típica

Os dados a seguir indicados são apenas para demonstração e **não** podem ser usados em vez da geração de dados no momento do teste.

Calibrador	Unidades Óticas (450 nm)
Calibrador 0 (0 ng/mL)	1,93
Calibrador 1 (0,1 ng/mL)	1,76
Calibrador 2 (0,3 ng/mL)	1,39
Calibrador 3 (1,0 ng/mL)	0,87
Calibrador 4 (3,0 ng/mL)	0,47
Calibrador 5 (10,0 ng/mL)	0,23

## 7 VALORES ESPERADOS

Recomenda-se vivamente que cada laboratório determine os seus próprios valores normais e anormais.

Num estudo realizado com adultos saudáveis aparentemente normais, utilizando o dispositivo de teste Androstenediona ELISA da DiaSource, observaram-se os seguintes valores:

### Mulheres

Idade (anos)	n	Média (ng/mL)	Significar (ng/mL)	Percentil 2,5 (ng/mL)	Percentil 97,5 (ng/mL)	Faixa (mín. - máx.) (ng/mL)
0 - 10	29	0.39	0.30	0.02	0.86	0.00 – 0.99
11 - 17	17	1.36	1.18	0.25	2.78	0.10 – 2.83
18 - 53	66	2.19	2.12	0.75	3.89	0.30 – 4.39
54 - 82	26	1.32	1.20	0.35	2.49	0.25 – 2.72

### Homens

Idade (anos)	n	Média (ng/mL)	Significar (ng/mL)	Percentil 2,5 (ng/mL)	Percentil 97,5 (ng/mL)	Faixa (mín. - máx.) (ng/mL)
0 - 10	34	0.40	0.26	0.01	1.31	0.00 - 1.54
11 - 17	16	1.75	1.53	0.33	3.30	0.11 - 3.50
18 - 53	36	2.15	2.06	0.45	4.20	0.44 - 4.56

54 - 82	44	1.95	1.96	0.30	3.93	0.26 - 4.26
---------	----	------	------	------	------	-------------

Os resultados por si só não devem ser a única razão para quaisquer consequências terapêuticas. Os resultados devem ser correlacionados com outras observações clínicas e testes diagnósticos.

## 8 CONTROLO DE QUALIDADE

Boas práticas laboratoriais requerem que os controlos sejam executados com cada curva de calibração. Um número estatisticamente significativo de controlos deve ser testado para estabelecer valores médios e intervalos aceitáveis para assegurar um desempenho adequado. Recomenda-se o uso de amostras de controlo de acordo com os regulamentos estaduais e federais. O uso de amostras de controlo é aconselhado para garantir a validade diária dos resultados. Utilizar os controlos a níveis normais e patológicos.

Os valores e intervalos indicados na ficha de CQ referem-se sempre ao lote atual do dispositivo de teste e devem ser utilizados para comparação direta dos resultados.

Recomenda-se também a utilização de programas nacionais ou internacionais de Avaliação da Qualidade, a fim de garantir a exatidão dos resultados.

Utilize métodos estatísticos adequados para analisar valores e tendências de controlo. Se os resultados do teste não se adequarem aos intervalos aceitáveis estabelecidos dos materiais de controlo, os resultados dos doentes devem ser considerados inválidos.

Neste caso, verifique as seguintes áreas técnicas: Dispositivos de pipetagem e temporização, fotómetro, datas de validade dos reagentes, condições de armazenamento e incubação, métodos de aspiração e lavagem.

Depois de verificar os itens acima mencionados sem encontrar qualquer erro, contacte o seu distribuidor ou diretamente a DIAsource.

## 9 CARACTERÍSTICAS DO TESTE

### 9.1 Intervalo Dinâmico do Teste

O intervalo do teste situa-se entre 0,021 a 10 ng/ml.

### 9.2 Especificidade de Anticorpos (Reatividade Cruzada)

As seguintes substâncias foram testadas quanto à reatividade cruzada do teste:

Composto	Reatividade Cruzada em %
Androstenediona	100,0
Androsterona	< 0,01
Aldosterona	0,0
Cortisol	< 0,2
Dihidrotestosterona	< 0,01
Dihidroepandrosterona	< 0,01
Estriol	1,8
16-Epiestriol	< 0,01
Estradiol	< 0,01
Estriol-3-glucurónido	< 0,01
Estriol-16-glucurónido	< 0,01
Estriol-16-sulfato	< 0,01
Estrona	< 0,01
17a-Pregnenolona	< 0,01
17OH-Progesterona	< 0,3
Progesterona	< 0,01
Testosterona	0,6

### 9.3 Sensibilidade Analítica

A sensibilidade analítica foi calculada a partir da média menos dois desvios-padrão de vinte (20) análises replicadas de Calibrador 0 e constatou-se que esta era de 0,021 ng/ml.

### 9.4 Precisão

A variabilidade dentro do teste (Intra-Ensaio) e a variabilidade entre testes (Inter-Ensaio) são as seguintes:

#### 9.4.1 Variação Intra-Ensaio

	Variação Intra-Ensaio		
Amostra	n	Média (ng/mL)	CV (%)
1	20	1,2	5,3
2	20	0,7	9,2
3	20	8	6,9

#### 9.4.2 Variação Inter-Ensaio

Variação Inter-Ensaio			
Amostra	n	Média (ng/mL)	CV (%)
1	40	4,3	8,3
2	40	3,0	8,1
3	40	1,0	8,7

#### 9.4.3 Inter-Lote

A variação entre ensaios (entre lotes) foi determinada medindo cada amostra 6 vezes com 3 lotes de kits diferentes:

Amostra	n	Média (ng/mL)	CV (%)
1	18	3.4	5.2
2	18	5.3	8.7
3	18	7.1	5.6

### 9.5 Recuperação

As amostras foram aumentadas adicionando soluções de Androstenediona com concentrações conhecidas.

A Percentagem de Recuperação foi calculada através da multiplicação da razão das leituras e dos valores esperados com 100.

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	
Concentração [ng/ml]	1.5	1.4	2.0	
Recuperação Média	106.6	102.6	104.0	
Intervalo de Recuperação [%]	de para	96.4 112.9	99.1 108.6	93.3 114.0

### 9.6 Linearidade

As amostras foram medidas não diluídas e em diluições seriadas com o padrão 0. A recuperação (%) foi calculada multiplicando a razão dos valores esperados e medidos por 100.

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	
Concentração [ng/ml]	6.2	4.7	7.2	
Recuperação Média	97.0	96.3	93.4	
Intervalo de Recuperação [%]	de para	92.3 102.9	91.6 101.3	86.7 105.6

## 10 LIMITAÇÕES DE USO

Serão obtidos resultados fiáveis e reproduutíveis quando o procedimento de teste for realizado com uma compreensão completa das instruções do folheto informativo e com observância das boas práticas laboratoriais.

Qualquer manipulação inadequada de amostras ou 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 triglicerídeos (até 30 mg/ml) não influenciam os resultados do teste.

#### 10.2 Interferências de Fármacos

Presentemente, nenhuma substância (fármaco), tanto quanto é do nosso conhecimento, tem qualquer influência sobre a leitura da Androstenediona numa amostra.

#### 10.3 Fenômeno de prozona

Hook effect was not observed in this test up to a concentration of 186 ng/mL of Androstenedione.

## **11 ASPETOS LEGAIS**

### **11.1 Fiabilidade dos Resultados**

O teste deve ser realizado exatamente de acordo com as instruções de utilização do fabricante. Além disso, o utilizador deve observar estritamente as regras de BPL (Boas Práticas de Laboratório) ou outras normas e/ou leis nacionais aplicáveis. Isto é especialmente relevante para o uso de reagentes de controlo. É importante incluir sempre, dentro do procedimento de teste, um número suficiente de controlos para validar a exatidão e a precisão do teste.

Os resultados do teste são válidos somente se todos os controlos estiverem dentro dos intervalos especificados e se todos os outros parâmetros de teste estiverem também dentro das especificações do teste especificadas. Em caso de dúvida ou preocupação, contacte a DIAsource.

### **11.2 Consequências Terapêuticas**

As consequências terapêuticas nunca devem basear-se apenas nos resultados laboratoriais, mesmo que todos os resultados do teste estejam de acordo com os itens indicados no ponto 11.1. Qualquer resultado de laboratório é apenas uma parte do quadro clínico total de um doente. Somente nos casos em que os resultados laboratoriais estejam em concordância aceitável com o quadro clínico geral do doente devem ser inferidas consequências terapêuticas.

O resultado do teste em si nunca deve ser o único determinante para derivar quaisquer consequências terapêuticas.

### **11.3 Responsabilidade**

Qualquer modificação do dispositivo de teste e/ou troca ou mistura de quaisquer componentes de lotes diferentes de um dispositivo de teste para outro pode afetar negativamente os resultados pretendidos e a validade global do teste. Tais modificações e/ou trocas invalidam qualquer pedido de substituição.

Reclamações apresentadas devido a má interpretação, por parte do cliente, dos resultados laboratoriais sujeitos ao ponto 11.2. também são inválidas. Independentemente disso, no caso de qualquer reclamação, a responsabilidade do fabricante não deve exceder o valor do dispositivo de teste. Qualquer dano causado ao dispositivo de teste durante o transporte não está sujeito à responsabilidade do fabricante.

## **12 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Kicman, A. T., Bassindale, T., Cowan, D. A., Dale, S., Hutt, A. J., and Leeds, A. R. Effect of androstenedione ingestion on plasma testosterone in young women; a dietary supplement with potential health risks. *Clin Chem* 2003, 49:167-169.
2. Brown, G.A., Vukovich, M.D., Martini, E.R., Kohut, M.L., Franke, W.D., Jackson, D.A., and King, D.S. Endocrine responses to chronic androstenedione intake in 30- to 56-year-old men. *J Clin Endocrinol Metab* 2000, 85:4074-4080.
3. Erickson GF 1993 Normal regulation of ovarian androgen production. *Seminars in Reproductive Endocrinology* 11:307-312
4. Mango D, Scirpa P, Battaglia F, Tartaglia E, Manna P. Diagnostic significance of steroid hormones in patients with ovarian cancer. *J Endocrinol Invest.* 1986 Aug;9(4):307-14

Data de revisão: 2023-07-18