



3 α -Diol G-RIA-CT

KIP0151



Read entire protocol before use.

3 α -Diol G-RIA-CT

I. INTENDED USE

Radioimmunoassay for the *in vitro* quantitative measurement of human 5 α -Androstane-3 α -17 β -Diol-Glucuronide (3 α -Diol G) in serum and plasma.

II. GENERAL INFORMATION

- A. **Proprietary name :** DIAsource 3 α -Diol G-RIA-CT Kit
- B. **Catalog number :** KIP0151 : 96 tests
- C. **Manufactured by :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgium.

For technical assistance or ordering information contact :
Tel : +32 (0)67 88.99.99 Fax : +32 (0)67 88.99.96

III. CLINICAL BACKGROUND

5 α -Androstane-3 α -17 β -Diol-Glucuronide (3 α -Diol G) is a C19 steroid. It is produced mainly as a metabolite of testosterone and dihydrotestosterone (DHT). It is largely produced in target peripheral tissues such as the skin, especially around hair follicles. The stimulation by large amounts of the 3 α -Diol G, leads to excessive hair formation – notably conspicuous where hair is not normally present in women.

In recent years the interest in the measurement of this steroid has increased among clinical investigators studying women suffering from idiopathic hirsutism.

Among the steroids known to be precursors for 3 α -Diol G, namely dehydroepiandrosterone (DHEA), dehydroepiandrosterone sulphate (DHEAS), DHT androstenedione and testosterone, only 3 α -Diol G has been shown to increase with hirsutism and decrease with treatment. This correlation has also been demonstrated in patients with polycystic ovaries (PCO).

3 α -Diol G determinations have therefore proved to be useful as an indicator in a variety of ways including monitoring the progress of treatment of idiopathic hirsutism and women with polycystic ovaries.

Furthermore diabetic patients, both men and women under cyclosporine A therapy, have shown 3 α -Diol G levels above normal, a side effect resulting in the appearance of hair in previously hairless areas.

IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

A fixed amount of ^{125}I labelled 3 α -Diol G competes with the 3 α -Diol G to be measured present in the sample or in the calibrator for a fixed amount of antibody sites being immobilized to the wall of a polystyrene tube. Neither extraction nor chromatography are required because of the high specificity of the coated antibodies. After a 2 hours incubation at RT on a shaker, an aspiration step terminates the competition reaction. The tubes are then washed twice with 2 ml of Working Wash Solution and aspirated again. A calibration curve is plotted and the 3 α -Diol G concentrations of the samples are determined by dose interpolation from the calibration curve.

V. REAGENTS PROVIDED

Reagents	96 Test Kit	Colour Code	Reconstitution
 Tubes coated with anti 3 α -Diol G	2 x 48	grey	Ready for use
Ag ^{125}I TRACER: ^{125}I Iodine labelled 3 α -Diol G (HPLC grade) in buffer with bovine casein (1%) and azide (<0.1%)	1 vial 53 ml 185 kBq	Red	Ready for use
CAL 0 Zero calibrator in bovine serum, thymol (<0.1%) and gentamycine (< 0.1%)	1 vial lyophilized	yellow	Add 2 ml distilled water
CAL N Calibrators 3 α -Diol G - N = 1 to 5 (see exact values on vial labels) in bovine serum, thymol (<0.1%) and gentamycine (<0.1%)	5 vials lyophilized	yellow	Add 0.5 ml distilled water
WASH SOLN CONC Wash solution (Phosphate Buffer)	1 vial 50 ml	brown	Dilute 25 x with distilled water (use a magnetic stirrer).
CONTROL N Controls - N = 1 or 2 in human serum and thymol (<0.1%) .	2 vials lyophilized	silver	Add 0.5 ml distilled water

Note : Use the zero calibrator for sample dilutions.

VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

The following material is required but not provided in the kit:

- Distilled water
- Pipettes for delivery of: 100 μl , 500 μl and 2 ml (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
- Vortex mixer
- Magnetic stirrer
- Tubes shaker (700 rpm)
- 5 ml automatic syringe (Cornwall type) for washing
- Aspiration system (optional)
- Any gamma counter capable of measuring ^{125}I may be used (minimal yield 70%).

VII. REAGENT PREPARATION

- Calibrators** : Reconstitute the zero calibrator with 2.0 ml distilled water and other calibrators with 0.5 ml distilled water.
- Controls** : Reconstitute the controls with 0.5 ml distilled water.
- Working Wash solution** : Prepare an adequate volume of Working Wash solution by adding 24 volumes of distilled water to 1 volume of Wash Solution (25x). Use a magnetic stirrer to homogenize. Discard unused Working Wash solution at the end of the day.

VIII. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

- Before opening or reconstitution, all kits components are stable until the expiry date, indicated on the label, if kept at 2 to 8°C.
- After reconstitution, calibrators and controls are stable for one week at 2 to 8°C. For longer storage periods, aliquots should be made and kept at -20°C.
- Freshly prepared Working Wash solution should be used on the same day.
- After its first use, tracer is stable until expiry date, if kept in the original well closed vial at 2 to 8°C.
- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration.

IX. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- Serum or plasma samples must be kept at 2-8°C.
- If the test is not run within 24 hrs., storage at -20°C is recommended.
- Avoid successive freezing and thawing.
- Heparinized plasma yields 15 % lower results than serum :

$$Y (\text{Hep. plasma}) = 0.86 \times (\text{serum}) + 0.52 \quad r = 0.96 \quad n = 13$$
- EDTA plasma yields 25 % lower results than serum :

$$Y (\text{EDTA plasma}) = 0.74 \times (\text{serum}) + 0.52 \quad r = 0.97 \quad n = 13$$

X. PROCEDURE

A. Handling notes

Do not use the kit or components beyond expiry date. Do not mix materials from different kit lots. Bring all the reagents to room temperature prior to use.

Thoroughly mix all reagents and samples by gentle agitation or swirling. In order to avoid cross-contamination, use a clean disposable pipette tip for the addition of each reagent and sample.

High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision. Respect the incubation times.

Prepare a standard curve for each run, do not use data from previous runs.

B. Procedure

- Label coated tubes in duplicate for each calibrator, sample, control. For the determination of total counts, label 2 normal tubes
- Briefly vortex calibrators, samples and controls and dispense 100 μl of each into respective tubes.
- Dispense 0.5 ml of ^{125}I Iodine labelled 3 α -Diol G into each tube, including the uncoated tubes for total counts.
- Shake the tube rack gently.
- Incubate for 2 hours at room temperature with continuous shaking (700 rpm).
- Aspirate the content of each tube (except total counts). Be sure that the plastic tip of the aspirator reaches the bottom of the coated tube in order to remove all the liquid.
- Wash tubes with 2 ml Working Wash solution (except total counts) and aspirate. Avoid foaming during the addition of the Working Wash solution.
- Wash tubes again with 2 ml Working Wash solution (except total counts) and aspirate.
- After the last washing, let the tubes stand upright for two minutes and aspirate the remaining drop of liquid.
- Count tubes in a gamma counter for 60 seconds.

XI. CALCULATION OF RESULTS

- Calculate the mean of duplicate determinations, reject obvious outliers.
- Calculate the bound radioactivity as a percentage of the binding determined at the zero calibrator point (0) according to the following formula :

$$B/B_0(\%) = \frac{\text{Counts (Calibrator or sample)}}{\text{Counts (Zero Calibrator)}} \times 100$$

- Using a 3 cycle semi-logarithmic or logit-log graph paper, plot the (B/B₀(%)) values for each calibrator point as a function of the 3 α -Diol G concentration of each calibrator point.
- Computer assisted methods can also be used to construct the calibration curve. If automatic result processing is to be used with results, "4 parameters" function curve fitting is recommended.
- By interpolation of the sample (B/B₀(%)) values, determine the 3 α -Diol G concentrations of the samples from the reference curve.
- For each assay, the percentage of total tracer bound in the absence of unlabelled 3 α -Diol G (B₀/T) must be checked.

XII. TYPICAL DATA

The following data are for illustration only and should never be used instead of the real time calibration curve.

3α-Diol G	cpm	B/Bo (%)
Total count	35967	
Calibrator		
0.0 ng/ml	13912	100.0
0.2 ng/ml	11443	82.2
1.2 ng/ml	8385	60.3
6.0 ng/ml	4611	33.1
25.0 ng/ml	1796	12.9
75.0 ng/ml	960	6.9

XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

A. Detection limit
Twenty zero calibrators were assayed along with a set of other calibrators.
The detection limit, defined as the apparent concentration two standard deviations below the average counts at zero binding, was 0.05 ng/ml.

B. Specificity

Compound	Cross-Reactivity (%)
5α-Androstane-3α-17β-diolG	100.00
5α-Androstane-3α-17β-diol	10.69
5α-Androstane-3α-17β-diol-3Glucuronide	5.86
5α-Dihydrotestosterone Glucuronide	1.75
Progesterone	0.03
Testosterone glucuronide	0
Testosterone	0
11β-hydroxytestosterone	0
5α-Dihydrotestosterone	0
5β-Dihydrotestosterone	0
Cortisol	0
Dehydroepiandrosterone	0
Estrone	0
Androstenedione	0
5-Androstene-3β-17β-diol	0
17β-Estradiol	0

Note : this table shows the cross-reactivity for the anti 3α-Diol G.

C. Precision

INTRA-ASSAY PRECISION				INTER-ASSAY PRECISION			
Serum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Serum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	20	2.64 ± 0.15	5.7	A	10	2.76 ± 0.17	6.4
B	20	10.11 ± 0.50	4.9	B	10	10.32 ± 0.70	7.2

SD : Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

D. Accuracy

DILUTION TEST			
Sample	Dilution	Theoretical Concent. (ng/ml)	Measured Concent. (ng/ml)
Serum	1/1	50.70	50.70
	1/2	25.35	24.58
	1/4	12.67	11.96
	1/8	6.33	6.49
	1/16	3.16	3.26
	1/32	1.58	1.48
	1/64	0.79	0.62

Samples were diluted with the zero calibrator.

RECOVERY TEST			
Sample	added 3α-Diol G (ng/ml)	Recovered 3α-Diol G (ng/ml)	Recovered (%)
Serum	50	48.4	96.8
	20	21.3	106.0
	10	9.5	95.0
	5	4.9	98.0

E. Time delay between last calibrator and sample dispensing

As shown hereafter, assay results remain accurate even when a sample is dispensed 20 minutes after the calibrator has been added to coated tubes.

TIME DELAY		
Serum (ng/ml)	0'	20'
Serum 1	2.92	2.90
Serum 2	9.60	9.59

XIV. INTERNAL QUALITY CONTROL

- If the results obtained for Control 1 and/or Control 2 are not within the range specified on the vial label, the results cannot be used unless a satisfactory explanation for the discrepancy has been given.
- If desirable, each laboratory can make its own pools of control samples, which should be kept frozen in aliquots. Do not freeze-thaw more than twice.
- To the best of our knowledge, no international reference material exists for this parameter.

XV. REFERENCE INTERVALS

Population		Absolute range (ng/ml)	Median (ng/ml)
Female	Premenopausal	0.3 - 7.9	1.9
	Postmenopausal	0.1 - 5.9	1.5
	Hirsute	1.6 - 9.3	4.6
Male		1.0 - 23.6	6.4

XVI. PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

For in vitro diagnostic use only.
This kit contains ¹²⁵I (half-life: 60 days) ,emitting ionizing X (28 keV) and γ (35.5 keV) radiations. This radioactive product can be transferred to and used only by authorized persons; purchase, storage, use and exchange of radioactive products are subject to the legislation of the end user's country. In no case the product must be administered to humans or animals.

The human blood components included in this kit have been tested by European approved and/or FDA approved methods and found negative for HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 and 2. No known method can offer complete assurance that human blood derivatives will not transmit hepatitis, AIDS or other infections. Therefore, handling of reagents, serum or plasma specimens should be in accordance with local safety procedures.

All animal products and derivatives have been collected from healthy animals. Bovine components originate from countries where BSE has not been reported. Nevertheless, components containing animal substances should be treated as potentially infectious.

Avoid any skin contact with reagents (sodium azide as preservative). Azide in this kit may react with lead and copper in the plumbing and in this way form highly explosive metal azides. During the washing step, flush the drain with a large amount of water to prevent azide build-up.

Do not smoke, drink, eat or apply cosmetics in the working area. Do not pipette by mouth. Use protective clothing and disposable gloves. All radioactive handling should be executed in a designated area, away from regular passage. A log book for receipt and storage of radioactive materials must be kept in the lab. Laboratory equipment and glassware, which could be contaminated with radioactive substances should be segregated to prevent cross contamination of different radioisotopes.

Any radioactive spills must be cleaned immediately in accordance with the radiosafety procedures. The radioactive waste must be disposed of following the local regulations and guidelines of the authorities holding jurisdiction over the laboratory. Adherence to the basic rules of radiation safety provides adequate protection.

XVII. BIBLIOGRAPHY

1. RITTMASER R.S. *et al.* (1988)
Androstenediol Glucuronide Isomers in Normal Men and Women and in Men infused with labelled Dihydrotestosterone.
JCE & M., 66, 1, 212-216.
2. RAO P.N. *et al.* (1987)
Isolation and Identification of Androstenediol Glucuronide from Human Plasma.
J. Steroid Biochem., 28, 5, 565-569.
3. HORTON R. *et al.* (1982)
3 α ,17 β -Androstenediol Glucuronide in plasma.
J. Clin. Invest., 69, 1203-1206.
4. JOURA E.A. *et al.* (1996)
Serum 3 α -androstenediol glucuronide is decreased in nonhirsute women with acne vulgaris.
Fertility and Sterility, 66, 6, 1033-1035.
5. GILAD S. *et al.* (1994)
Assesment of 5 α -reductase activity in hirsute women: comparison of serum androstenediol glucuronide with urinary androsterone and aetiocholanolone excretion.
Clinical Endocrinology, 40, 459-464.
6. THOMPSON D.L. *et al.* (1990)
Androsterone Glucuronide is a marker of adrenal hyperandrogenism in hirsute women.
Clinical Endocrinology, 32, 283-292.

XVIII. SUMMARY OF THE PROTOCOL

	TOTAL COUNTS μl	CALIBRATORS μl	SAMPLE(S) CONTROLS μl
Calibrators (0 to 5)	-	100	-
Samples, controls	-	-	100
Tracer	500	500	500
Incubation	2 hours at RT with continuous shaking (700 rpm)		
Separation	-	aspirate	
Working Wash solution		2.0 ml	
Separation		aspirate	
Working Wash solution		2.0 ml	
Separation		aspirate	
Counting	Count tubes for 60 seconds		

DIAsource Catalogue Nr : KIP0151	P.I. Number : 1701001/en	Revision nr : 110608/1
-------------------------------------	-----------------------------	---------------------------

Revision date : 2011-06-08



Lire entièrement le protocole avant utilisation.

3 α -Diol G-RIA-CT

I. BUT DU DOSAGE

Trousse de dosage radio-immunologique pour la mesure quantitative *in vitro* de la 5 α -Androstane-3 α -17 β -Diol-Glucuronide (3 α -Diol G) dans le sérum et le plasma humain.

II. INFORMATIONS GENERALES

- A. **Nom du produit :** DIAsource 3 α -Diol G-RIA-CT kit
- B. **Numéro de catalogue:** KIP0151 : 96 tests
- C. **Fabriqué par :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgique.

Pour une assistance technique ou une information sur une commande :
Tel : +32 (0)67 88.99.99 Fax : +32 (0)67 88.99.96

III. CONTEXTE CLINIQUE

La 5 α -Androstane-3 α -17 β -Diol-Glucuronide (3 α -Diol G) est un stéroïde C19. Il est produit principalement comme un métabolite de la testostérone et de la dihydrotestostérone (DHT) produit en grande partie par les tissus périphériques comme la peau et spécialement autour des follicules pileux. La stimulation avec des quantités importantes de 3 α -Diol G, conduit à la formation excessive de poils, notamment remarquables, où les poils ne sont normalement pas présents chez la femme.

Depuis quelques années, un intérêt croissant pour la mesure de ce stéroïde a été remarqué au travers de travaux cliniques réalisés par des chercheurs étudiant les femmes souffrant d'hirsutisme idiopathique.

Parmi les stéroïdes connus pour être des précurseurs de la 3 α -Diol G, dont la déhydroépiandrostérone (DHEA), la déhydroépiandrostérone sulfate (DHEAS), la DHT androsténone et la testostérone, seule la 3 α -Diol G est en augmentation quand de l'hirsutisme est détecté et en décroissance lorsqu'un traitement est appliqué. Cette corrélation a été également démontrée chez des patients présentant des ovaires polycystiques (PCO).

Les détections de la 3 α -Diol G ont de cette manière été prouvées être très utiles en tant qu'indicateurs dans différentes circonstances comme le suivi des progrès au cours du traitement de l'hirsutisme idiopathique et pour les femmes présentant des ovaires polycystiques.

De plus, les patients diabétiques, tant les hommes que les femmes en thérapie avec la cyclosporine A, ont montrés des niveaux de 3 α -DIOL G supérieurs à la normale, un effet secondaire induisant l'apparition de poils dans des régions préalablement chauves.

IV. PRINCIPES DU DOSAGE

Une quantité fixe de 3α-Diol G marquée à l’¹²⁵I est en compétition avec la 3α-Diol G à mesurer et présente dans l’échantillon ou dans le calibrateur pour une quantité fixe d’anticorps immobilisés sur les parois du tube en polystyrène. Aucune extraction ni chromatographie n’est requise à cause de la haute spécificité de l’anticorps fixé. Après 2 heures d’incubation à température ambiante sous agitation, le liquide est aspiré pour terminer la réaction de compétition. Les tubes sont lavés avec 2 ml de Solution de Lavage et aspirés à nouveau. L’étape de lavage est réalisée à 2 reprises. Une courbe de calibration est réalisée et la concentration en 3α-DIOL G des échantillons est déterminée par interpolation de la dose sur la courbe de calibration.

V. REACTIFS FOURNIS

Réactifs	96 Tests	Code couleur	Reconstitution			
 Tubes recouverts avec l'anti 3α-Diol G	2 x 48	gris	Prêt à l'emploi			
<table border="1"><tr><td>Ag</td><td>¹²⁵I</td></tr></table> TRACEUR: 3α-Diol G marquée à l' ¹²⁵ Iodine (grade HPLC) dans un tampon avec de la caséine bovine (1%) et de l'azide de sodium (<0,1%)	Ag	¹²⁵ I	1 flacon 53 ml 185 kBq	rouge	Prêt à l'emploi	
Ag	¹²⁵ I					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Calibrateur zéro dans du sérum bovin, thymol (<0,1%) et gentamycine (<0,1%)	CAL	0	1 flacon lyophilisé	jaune	Ajouter 2 ml d'eau distillée	
CAL	0					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Calibrateurs 3α-Diol G - N = 1 à 5 (cfr. valeurs exactes sur chaque flacon) dans du sérum bovin, thymol (<0,1%) et gentamycine (<0,1%)	CAL	N	5 flacons lyophilisés	jaune	Ajouter 0,5 ml d'eau distillée	
CAL	N					
<table border="1"><tr><td>WAS</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Solution de lavage (tampon phosphate)	WAS	SOLN	CONC	1 flacon 50 ml	brun	Diluer 25x avec de l'eau distillée (utiliser un agitateur magnétique).
WAS	SOLN	CONC				
<table border="1"><tr><td>CONTR</td><td>N</td></tr></table> Contrôles - N = 1 ou 2 dans du sérum humain et thymol (<0,1%)	CONTR	N	2 flacons lyophilisés	gris	Ajouter 0,5 ml d'eau distillée	
CONTR	N					

Note : Utiliser le calibrateur “0” pour la dilution des échantillons.

VI. MATERIELS NON FOURNIS

Le matériel mentionné ci-dessous est requis mais non fourni avec la trousse:

- Eau distillée
- Pipettes pour distribuer: 100 µl, 500 µl et 2 ml (l’utilisation de pipettes précises et de pointes en plastique est recommandée)
- Agitateur vortex
- Agitateur magnétique
- Agitateur de tubes (700 rpm)
- Seringue automatique de 5 ml (type Cornwall) pour les lavages
- Système d’aspiration
- Tout compteur gamma capable de mesurer l’¹²⁵I peut être utilisé (rendement minimum 70%).

VII. PREPARATION DES REACTIFS

- A. Calibrateurs : Reconstituer le calibrateur zéro avec 2,0 ml d’eau distillée et les autres calibrateurs avec 0,5 ml d’eau distillée..
- B. Contrôles : Reconstituer les contrôles avec 0,5 ml d’eau distillée.
- C. Solution de Lavage : Préparer un volume adéquat de Solution de Lavage en ajoutant 24 volumes d’eau distillée à 1 volume de Solution de Lavage (25x). Utiliser un agitateur magnétique pour homogénéiser. Eliminer la Solution de Lavage non utilisée à la fin de la journée.

VIII. STOCKAGE ET DATE D’EXPIRATION DES REACTIFS

- Avant l’ouverture ou la reconstitution, tous les composants de la trousse sont stables jusqu’à la date d’expiration, indiquée sur l’étiquette, si la trousse est conservée entre 2 et 8°C.
- Après reconstitution, les calibrateurs et les contrôles sont stables pendant une semaine entre 2 et 8°C. Pour de plus longues périodes de stockage, des aliquots devront être réalisés et ceux-ci seront gardés à –20°C.
- La Solution de Lavage préparée doit être utilisée le jour même.
- Après la première utilisation, le traceur est stable jusqu’à la date d’expiration, si celui-ci est conservé entre 2 et 8°C dans le flacon d’origine correctement fermé.
- Des altérations dans l’apparence physique des réactifs de la trousse peuvent indiquer une instabilité ou une détérioration.

IX. PREPARATION ET STABILITE DE L’ECHANTILLON

- Les échantillons de sérum ou de plasma doivent être gardés entre 2 et 8°C.
- Si le test n’est pas réalisé dans les 24 heures, un stockage à -20°C est recommandé.
- Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.
- Les plasmas héparinés donnent des rendements 15 % inférieurs aux résultats obtenus avec le sérum :
 $Y \text{ (plasma hép.)} = 0,86 \times (\text{sérum}) + 0,52 \quad r = 0,96 \quad n = 13$
- Les plasmas traités avec l’EDTA donnent un rendement de 25 % inférieurs aux résultats obtenus avec le sérum :
 $Y \text{ (plasma EDTA)} = 0,74 \times (\text{sérum}) + 0,52 \quad r = 0,97 \quad n = 13$

X. MODE OPERATOIRE

- A. Notes de manipulation
Ne pas utiliser la trousse ou ses composants après avoir dépassé la date d’expiration. Ne pas mélanger du matériel provenant de trousses de lots différents. Mettre tous les réactifs à température ambiante avant utilisation.
Mélangez à fond tous les réactifs et les échantillons sous agitation douce. Pour éviter toute contamination croisée, utiliser une nouvelle pointe de pipette pour l’addition de chaque réactif et échantillon.
Des pipettes de haute précision ou un équipement de pipetage automatique permettent d’augmenter la précision. Respecter les temps d’incubation. Préparer une courbe d’étalonnage pour chaque nouvelle série d’expériences, ne pas utiliser les données d’expériences précédentes.

- B. Mode opératoire
 - Identifier les tubes recouverts fournis dans la trousse en double pour chaque calibrateur, échantillon, contrôle. Pour la détermination de l’activité totale, identifier 2 tubes non recouverts.
 - Agiter au vortex brièvement les calibrateurs, les échantillons et les contrôles. Puis distribuer 100 µl de chacun d’eux dans leurs tubes respectifs.
 - Distribuer 0,5 ml de 3α-DIOL G marquée à l’¹²⁵Iodine dans chaque tube, y compris les tubes sans anticorps pour la détermination de l’activité totale.
 - Agiter gentiment le portoir de tube pour libérer toute bulle d’air emprisonnée.
 - Incuber pendant 2 heures à température ambiante sous agitation continue (700 rpm).
 - Aspirer le contenu de chaque tube (à l’exception des tubes utilisés pour la détermination de l’activité totale). Assurez-vous que la pointe utilisée pour aspirer le liquide des tubes atteint le fond de chacun d’eux pour éliminer toute trace de liquide.
 - Laver les tubes avec 2 ml de Solution de Lavage (à l’exception des tubes utilisés pour la détermination de l’activité totale) et aspirer. Eviter la formation de mousse pendant l’addition de la Solution de Lavage.
 - Laver les tubes à nouveau avec 2 ml de Solution de Lavage (à l’exception des tubes utilisés pour la détermination de l’activité totale) et aspirer.
 - Après le dernier lavage, laisser les tubes droits pendant 2 minutes et aspirer le reste de liquide.
 - Placer les tubes dans un compteur gamma pendant 60 secondes pour quantifier la radioactivité.

XI. CALCUL DES RESULTATS

- Calculer la moyenne de chaque détermination réalisée en double, écarter les valeurs aberrantes.

2. Calculer la capacité de liaison de l’essai comme un pourcentage de liaison déterminé au point de calibration (0) en suivant la formule ci-dessous :

$$B/B0(\%) = \frac{\text{moyenne des cpm (CAL ou échantillon)}}{\text{moyenne des cpm (CAL 0)}} \times 100$$

2. Utiliser un “3 cycle semi-logarithmic” ou un papier graphique “logit-log”, porter en ordonnée les valeurs exprimées en pourcentage de liaison (B/B0(%)) de chaque point de calibration et en abscisse leur concentration respective en 3α-Diol G.

3. Des méthodes informatiques peuvent aussi être utilisées pour construire la courbe de calibration. i un système d’analyse de traitement informatique des données est utilisé, la fonction “4 paramètres” d’ajustement de courbe est recommandée.

4. L’interpolation des valeurs de chaque échantillon (B/B0(%)) détermine les concentrations en 3α-Diol G à partir de la courbe d’étalonnage.

5. Pour chaque essai, le pourcentage total de traceur lié en absence de 3α-Diol G non marquée (B0/T) doit être vérifié.

XII. DONNEES TYPES

Les données représentées ci-dessous sont données pour information et ne peuvent jamais être utilisées à la place d’une courbe d’étalonnage.

3α-Diol G	cpm	B/Bo (%)
Activité totale	35967	
Calibrateur		
0,0 ng/ml	13912	100,0
0,2 ng/ml	11443	82,2
1,2 ng/ml	8385	60,3
6,0 ng/ml	4611	33,1
25,0 ng/ml	1796	12,9
75,0 ng/ml	960	6,9

XIII. PERFORMANCE ET LIMITATIONS

- A. **Limite de détection**
Vingt calibrateurs zéro ont été testés en parallèle avec un assortiment d’autres calibrateurs.
La limite de détection, définie comme la concentration apparente située 2 déviations standards en-dessous de la moyenne déterminée à la fixation zéro, était de 0,05 ng/ml.
- B. **Spécificité**

Composé	Réactivité Croisée (%)
5αAndrostane-3α,17β-diolG	100,0
5αAndrostane-3α,17β-diol	10,69
5αAndrostane-3α,17β-diol-3Glucuronide	5,86
5αDihydrotestostérone Glucuronide	1,75
Progestérone	0,03
Testostérone glucuronide	0
Testostérone	0
11β-hydroxytestostérone	0
5α-Dihydrotestostérone	0
5β- Dihydrotestostérone	0
Cortisol	0
Déhydroépiandrostérone	0
Estrone	0
Androstènedione	0
5-Androstène-3β,17β-diol	0
17β Estradiol	0

P.S.: ce tableau montre la réactivité croisée de l’anti 3α-Diol G.

- C. **Précision**

INTRA-ESSAI				INTER-ESSAI			
Sérum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Sérum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	20	2,64 ± 0,15	5,7	A	10	2,76 ± 0,17	6,4
B	20	10,11 ± 0,50	4,9	B	10	10,32 ± 0,70	7,2

SD : Déviation Standard; CV: Coefficient de variation

D. Exactitude

TEST DE DILUTION			
Echantillon	Dilution	Concent. Théorique (ng/ml)	Concent. Mesurée (ng/ml)
1	1/1	50,70	50,70
	1/2	25,35	24,58
	1/4	12,67	11,96
	1/8	6,33	6,49
	1/16	3,16	3,26
	1/32	1,58	1,48
	1/64	0,79	0,62

L’échantillon a été dilué avec le calibrateur zéro.

TEST DE RECUPERATION			
Echantillon	3α-Diol G ajouté (ng/ml)	3α-Diol G récupéré (ng/ml)	Recupération (%)
Sérum	50	48,4	96,8
	20	21,3	106,0
	10	9,5	95,0
	5	4,9	98,0

- E. **Délai entre la distribution du dernier calibrateur et celle de l’échantillon**

Comme montré ci-dessous, les résultats d’un essai restent précis même quand un échantillon est distribué 20 minutes après que le calibrateur ait été ajouté aux tubes avec l’anticorps.

DELAÏ		
Sérum (ng/ml)	0'	20'
Sérum 1	2,92	2,90
Sérum 2	9,60	9,59

XIV. CÔNTROLE DE QUALITE INTERNE

- Si les résultats obtenus pour le(s) contrôle(s) 1 et/ou 2 ne sont pas dans l’intervalle spécifié sur l’étiquette du flacon, les résultats ne peuvent pas être utilisés à moins que l’on ait donné une explication satisfaisante de la non-conformité.
- Chaque laboratoire est libre de faire ses propres stocks d’échantillons contrôles, lesquels doivent être congelés aliquotés. Ne pas congeler – décongeler plus de deux fois.
- A notre connaissance, aucun matériel de référence internationale n’existe pour ce paramètre.

XIV. VALEURS ATTENDUES

Population		Intervalle absolu (ng/ml)	Médiane (ng/ml)
Femmes	Pré-ménopauses	0,3 - 7,9	1,9
	Post-ménopauses	0,1 - 5,9	1,5
	Hirsutes	1,6 - 9,3	4,6
Hommes		1,0 - 23,6	6,4

XV. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

Sécurité
Pour utilisation en diagnostic *in vitro* uniquement.
Cette trousse contient de l’¹²⁵I (demi-vie: 60 jours), une matière radioactive émettant des rayonnements ionisants X (28 keV) et γ (35.5 keV). Ce produit radioactif peut uniquement être reçu, acheté, possédé ou utilisé par des personnes autorisées; l’achat, le stockage, l’utilisation et l’échange de produits radioactifs sont soumis à la législation du pays de l'utilisateur final. Ce produit ne peut en aucun cas être administré à l’homme ou aux animaux.
Les composants de sang humain inclus dans ce kit ont été évalués par des méthodes approuvées par l’Europe et/ou la FDA et trouvés négatifs pour HBsAg, l’anti-HCV, l’anti-HIV-1 et 2. Aucune méthode connue ne peut offrir l’assurance complète que des dérivés de sang humain ne transmettront pas d’hépatite, le sida ou toute autre infection. Donc, le traitement des réactifs, du sérum ou des échantillons de plasma devront être conformes aux procédures locales de sécurité.

Tous les produits animaux et leurs dérivés ont été collectés d'animaux sains. Les composants bovins proviennent de pays où l'ESB n'a pas été détectée. Néanmoins, les composants contenant des substances animales devront être traités comme potentiellement infectieux.

L'azide de sodium est nocif s'il est inhalé, avalé ou en contact avec la peau (l'azide de sodium est utilisé comme agent conservateur). L'azide dans cette trousse pouvant réagir avec le plomb et le cuivre dans les canalisations et donner des composés explosifs, il est nécessaire de nettoyer abondamment à l'eau le matériel utilisé.

Ne pas fumer, ni boire, ni manger ni appliquer de produits cosmétiques dans les laboratoires où des produits radioactifs sont utilisés. Ne pas pipeter avec la bouche. Utiliser des vêtements protecteurs et des gants à usage unique. Toutes les manipulations radioactives doivent être exécutées dans un secteur désigné, éloigné de tout passage. Un journal de réception et de stockage des matières radioactives doit être tenu à jour dans le laboratoire. L'équipement de laboratoire et la verrerie, qui pourrait être contaminée avec des substances radioactives, doivent être isolés afin d'éviter la contamination croisée de plusieurs isotopes.

Toute contamination ou perte de substance radioactive doit être réglée conformément aux procédures de radio sécurité. Les déchets radioactifs doivent être placés de manière à respecter les réglementations en vigueur. L'adhésion aux règles de base de sécurité concernant les radiations procure une protection adéquate

XVII. BIBLIOGRAPHIE

1. RITTMASER R.S. *et al.* (1988)
Androstanediol Glucuronide Isomers in Normal Men and Women and in Men infused with labelled Dihydrotestosterone.
JCE & M., 66, 1, 212-216.

2. RAO P.N. *et al.* (1987)
Isolation and Identification of Androstanediol Glucuronide from Human Plasma.
J. Steroid Biochem., 28, 5, 565-569.

3. HORTON R. *et al.* (1982)
3 α ,17 β -Androstanediol Glucuronide in plasma.
J. Clin. Invest., 69, 1203-1206.

4. JOURA E.A. *et al.* (1996)
Serum 3 α -androstanediol glucuronide is decreased in nonhirsute women with acne vulgaris.
Fertility and Sterility, 66, 6, 1033-1035.

5. GILAD S. *et al.* (1994)
Assesment of 5 α -reductase activity in hirsute women: comparison of serum androstanediol glucuronide with urinary androsterone and aetiocholanolone excretion.
Clinical Endocrinology, 40, 459-464.

6. THOMPSON D.L. *et al.* (1990)
Androsterone Glucuronide is a marker of adrenal hyperandrogenism in hirsute women.
Clinical Endocrinology, 32, 283-292.

XVIII. RESUME DU PROTOCOLE

	ACTIVITE TOTALE (µl)	CALIBRA- TEURS (µl)	ECHANTILL ON(S) (µl)
Calibrateurs (0 à 5) Echantillons, contrôles Traceur	- - 500	100 - 500	- 100 500
Incubation	2 heures à température ambiante sous agitation continue (700 rpm)		
Séparation Solution de Lavage Séparation Solution de Lavage Séparation	-	aspiration 2,0 ml aspiration 2,0 ml aspiration	
Comptage (radioactivité)	Temps de comptage des tubes : 60 secondes		

Numéro de catalogue DIASource : KIP0151	Numéro de P.I.: 1701001/fr	Révision n° : 110608/1
--	-------------------------------	---------------------------



Lees het hele protocol vóór gebruik.

3 α -Diol G-RIA-CT

I. BEOOGD GEBRUIK

Radioimmunoassay voor de kwantitatieve bepaling *in vitro* van menselijk 5 α -Androstaan-3 α -17 β -Diol-Glucuronide (3 α -Diol G) in serum en plasma.

II. ALGEMENE INFORMATIE

- A. **Gedeponeerd handelsmerk:** DIASource 3 α -Diol G-RIA-CT kit
- B. **Catalogusnummer:** KIP0151: 96 testen.
- C. **Geproduceerd door:** DIASource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, België.

Voor technische assistentie of voor bestelinformatie

kunt u contact opnemen met :

Tel : +32 (0)67 88.99.99

Fax: +32 (0)67 88.99.96

III. KLINISCHE ACHTERGROND

5 α -Androstaan-3 α -17 β -Diol-Glucuronide (3 α -Diol G) is een C₁₉-steroïde. Het wordt hoofdzakelijk aangemaakt als een metaboliet van testosteron en dihydrotestosteron (DHT). Het wordt grotendeels aangemaakt in perifere doelweefsels zoals de huid en dan voornamelijk rond haarfollikels. De stimulering door grote hoeveelheden 3 α -Diol G leidt tot overmatige haarvorming, wat bijzonder opvallend is op plaatsen waar haargroei niet gebruikelijk is bij vrouwen.

De laatste jaren vertonen klinische onderzoekers een grotere interesse in de bepaling van deze steroïde; zij verrichten onderzoek bij vrouwen die leiden aan idiopathisch hirsutisme.

Van de steroïden die bekend staan als precursors voor 3 α -Diol G – namelijk dehydro-epiandrosteron (DHEA), dehydro-epiandrosteronsulfaat (DHEAS), DHT androstenedion en testosteron – blijkt dat enkel 3 α -Diol G toeneemt ingeval van hirsutisme en afneemt bij een behandeling. Deze correlatie werd ook aangetoond bij patiënten met het polycysteus-ovariumsyndroom (PCOS).

Aan de hand daarvan werd bewezen dat bepalingen van 3 α -Diol G op verschillende manieren nuttig zijn als indicator, inclusief de opvolging van de vooruitgang bij de behandeling van idiopathisch hirsutisme en van vrouwen met het polycysteus-ovariumsyndroom.

Bovendien werden bij diabetici – zowel mannen als vrouwen met een cyclosporine A-therapie – spiegels van 3 α -Diol G aangetoond die hoger waren dan normaal, een bijwerking die leidt tot haargroei op plaatsen die vroeger kaal waren.

IV. BESCHRIJVING VAN DE METHODE

Een vaste hoeveelheid ¹²⁵I gelabeld 3α-Diol G concurreert met 3α-Diol G dat bepaald moet worden en aanwezig is in het monster of in de kalibrator voor een vast aantal plaatsen met antilichamen die geïmmobiliseerd zijn aan de wand van een buisje van polystyreen. Vanwege de hoge specificiteit van de gecoate antilichamen is er geen extractie of chromatografie vereist. Na een incubatieperiode van 2 uur bij kamertemperatuur op een schudder wordt de concurrentiereactie beëindigd door een aspiratiefase. Daarna worden de buisjes twee maal gewassen met 2 ml werk-wasoplossing en opnieuw afgezogen. Een kalibratiecurve wordt uitgezet en de concentraties van 3α-Diol G van de monsters worden bepaald door dosisinterpolatie van de kalibratiecurve.

V. GELEVERDE REAGENTIA

Reagens	Kit voor 96 testen	Kleur-code	Reconstitutie
 Buisjes gecoat met anti 3α-Diol G	2 x 48	grijs	Klaar voor gebruik
Ag ¹²⁵I Tracer : 3α-Diol G gelabeld met ¹²⁵ jood (HPLC-kwaliteit) in buffer met bovien caseïne (1%) en azide (< 0,1%)	1 flacon 53 ml 185 kBq	rood	Klaar voor gebruik
CAL 0 Nulkalibrator : Bovien serum, thymol (< 0,1%) en gentamycine (< 0,1%)	1 flacon, gevries-droogd	geel	2 ml gedestilleerd water toevoegen
CAL N Kalibrators 3α-Diol G : N = 1 tot 5 (zie de exacte waarden op de flaconetiketten) in bovien serum, thymol (< 0,1%) en gentamycine (< 0,1%)	5 flacons, gevries-droogd	geel	0,5 ml gedestilleerd water toevoegen
WAS SOLN CONC Wasoplossing 25x : fosfaatbuffer	1 flacon 50 ml	bruin	25x met gedistilleerd water verdunnen (gebruik een magnetische roerder)
CONTR N Controlles : N = 1 of 2 in humaan serum en thymol (< 0,1%)	2 flacons, gevries-droogd	zilver	0,5 ml gedestilleerd water toevoegen

Opmerking: Gebruik Nulkalibrator voor monsterverdunningen.

VI. NIET MEEGELEVERDE MATERIALEN

De volgende materialen zijn noodzakelijk maar worden niet meegeleverd met de kit:

- Gedestilleerd water.
- Pipetten voor een volume van 100 µl, 500 µl en 2 ml (het gebruik van nauwkeurige pipetten met plastic wegwerptips wordt aanbevolen).
- Vortexmenger.
- Magnetische roerder.
- Schudder voor de buisjes. (700 rpm)
- Automatische spuit van 5 ml (type Cornwall) voor de wasfase.
- Afzuigsysteem (facultatief).
- Een gammateller die geschikt is voor de bepaling van ¹²⁵I. Een maximale telefficiëntie moet worden gegarandeerd.

VII. BEREIDING VAN HET REAGENS

- A. **Kalibrators:** Reconstitueer de nulkalibrator met 2,0 ml gedestilleerd water en andere kalibrators met 0,5 ml gedestilleerd water.
- B. **Controles:** Reconstitueer de controles met 0,5 ml gedestilleerd water.
- C. **Werk-wasoplossing:** Bereid een voldoende hoeveelheid werk-wasoplossing door 24 eenheden gedestilleerd water toe te voegen aan 1 eenheid wasoplossing. Gebruik een magnetische roerder voor de homogenisering. Op het eind van de dag moet de ongebruikte werk-wasoplossing afgevoerd worden.

VIII. OPSLAG EN VERVALDATUM VAN REAGENTIA

- Vóór opening of reconstitutie zijn alle kitcomponenten houdbaar tot de vervaldatum, zoals vermeld op het etiket, indien zij bewaard werden bij 2 tot 8°C.
- Na reconstitutie zijn de kalibrators en controles gedurende één week houdbaar bij 2 tot 8°C. Voor een langere bewaartermijn moeten aliquots gemaakt worden, die bij -20°C bewaard moeten worden.
- Een vers bereide werk-wasoplossing moet op dezelfde dag nog gebruikt worden.
- Na het eerste gebruik is de tracer houdbaar tot de vervaldatum, indien bewaard bij 2 tot 8°C in de oorspronkelijke, goed afgesloten flacon.**
- Wijzigingen in het fysieke aspect van kitreagentia kunnen wijzen op instabiliteit of op een kwaliteitsvermindering.

IX. MONSTERAFFNAME EN MONSTERBEREIDING

- Serum- of plasmamonsters moeten bij 2-8°C bewaard worden.
- Indien de test niet binnen 24 uur uitgevoerd wordt, dan wordt aanbevolen om ze bij -20°C te bewaren.
- Vermijd herhaalde invriezing en ontdooiing.
- Gehepariniseerd plasma geeft resultaten die 15% lager liggen dan die van serum:
 $Y \text{ (gehepariniseerd plasma)} = 0,86 \times (\text{serum}) + 0,52 \quad r = 0,96 \quad n = 13$
- EDTA-plasma geeft resultaten die 25% lager liggen dan die van serum:
 $Y \text{ (EDTA-plasma)} = 0,74 \times (\text{serum}) + 0,52 \quad r = 0,97 \quad n = 13$

X. PROCEDURE

A. Opmerkingen bij de procedure

Gebruik de kit of de componenten niet langer dan de aangegeven vervaldatum. Materialen van kits van verschillende loten mogen niet gemengd worden. Laat alle reagentia op kamertemperatuur komen vóór gebruik. Meng alle reagentia en monsters goed door ze voorzichtig te bewegen of door er voorzichtig mee te draaien. Om kruisbesmetting te vermijden, moet een propere wegwerpbare pipettip gebruikt worden voor toevoeging van elk reagens en monster. Pipetten met een grote precisie of geautomatiseerde pipetteerapparatuur zullen de precisie verhogen. Respecteer de incubatietijden. Bereid een kalibratiecurve voor elke run; men mag geen gegevens gebruiken van voorafgaande runs.

B. Procedure

- Etiketteer de gecoate buisjes in duplo voor elke kalibrator, voor elk monster, voor elke controle. Etiketteer 2 normale buisjes voor de bepaling van de totaal tellingen.
- Vortex de kalibrators, monsters en controles gedurende korte tijd en distribueer 100 µl van elk in het desbetreffende buisje.
- Distribueer 0,5 ml 3α-Diol G dat met ¹²⁵I gelabeld werd in elk buisje, inclusief de niet gecoate buisjes voor de totaal tellingen.
- Schud het rek met de buisjes voorzichtig zodat eventuele ingesloten luchtballen vrijkomen.
- Incubeer gedurende 2 uur bij kamertemperatuur terwijl er voortdurend mee geschud wordt (700 rpm).
- Zuig de inhoud van elk buisje (met uitzondering van de totaal tellingen) op. Zorg ervoor dat de plastic tip van de aspirator tot aan de bodem van het gecoate buisje komt zodat alle vloeistof verwijderd wordt.
- Was de buisjes met 2 ml werk-wasvloeistof (met uitzondering van de totaal tellingen) en zuig op. Vermijd schuimvorming tijdens toevoeging van de werk-wasvloeistof.
- Was de buisjes nogmaals met 2 ml werk-wasvloeistof (met uitzondering van de totaal tellingen) en zuig op.
- Na de laatste wasfase moeten de buisjes gedurende twee minuten rechtop blijven staan en zuig daarna de overblijvende vloeistof op.
- Tel de buisjes in een gammateller gedurende 60 seconden.

XI. BEREKENING VAN DE RESULTATEN

- Bereken het gemiddelde voor de bepalingen in duplo, verwerp hierbij de duidelijke uitschieters.
- Bereken het percentage binding van de gebonden radioactiviteit, bepaald op het punt van de nulkalibrator (0), aan de hand van de volgende formule:

$$B/B0 (\%) = \frac{\text{cpm (Kalibrator of monster)}}{\text{cpm (Nulkalibrator)}} \times 100$$

3. Zet de (B/B0(%)) waarden uit voor elk kalibratorpunt, als een functie van de 3α-Diol G concentratie van elk kalibratorpunt, op 3-cyclisch semi-logaritmisch of dubbellogaritmisch papier.
4. Ook computergestuurde methoden kunnen worden gebruikt om de kalibratiecurve te vormen. Indien de resultaten automatisch verwerkt worden, wordt de “4 parameters”-functie aanbevolen voor de gepaste curve.
5. Bepaal de 3α-Diol G concentraties van de monsters uit de referentiecurve door de monsterwaarden (B/B0(%)) te interpoleren.
6. Voor elke bepaling moet het totaalpercentage van de tracer, gebonden in afwezigheid van ongelabeld 3α-Diol G (B0/T), gecontroleerd worden.

XII. KENMERKENDE GEGEVENS

De volgende gegevens dienen enkel ter illustratie en mogen in geen geval gebruikt worden ter vervanging van de real time kalibratiecurve.

3α-Diol G		cpm	B/Bo (%)
Totaaltelling		35967	
Kalibrator	0,0 ng/ml	13912	100,0
	0,2 ng/ml	11443	82,2
	1,2 ng/ml	8385	60,3
	6,0 ng/ml	4611	33,1
	25,0 ng/ml	1796	12,9
	75,0 ng/ml	960	6,9

XIII. EIGENSCHAPPEN EN GRENZEN

A. Detectielimiet
Twintig nulkalibrators werden bepaald, samen met de serie andere kalibrators. De detectielimiet, omschreven als de schijnbare concentratie van twee standaarddeviaties onder de gemiddelde tellingen bij nulbinding, bedroeg 0,05 ng/ml.

B. Specificiteit

Bestanddeel	Kruisreactiviteit (%)
5αandrostaan-3α,17β-diolG	100,00
5αandrostaan-3α,17β-diol	10,69
5αandrostaan-3α,17β-diol-3glucuronide	5,86
5αdihydrotestosteron glucuronide	1,75
Testosteron glucuronide	0
Testosteron	0
11β-hydroxytestosteron	0
5α-dihydrotestosteron	0
5β- dihydrotestosteron	0
Cortisol	0
Dehydro-epiandrosteron	0
Estron	0
Androsteendion	0
5-androsteen-3β,17β-diol	0
17β oestradiol	0

Opmerking: deze tabel toont de kruisreactiviteit voor anti 3α-Diol G.

C. Precisie

PRECISIE BINNEN EEN TEST				PRECISIE TUSSEN TESTEN			
Serum	N	<X> ± SD (ng/ml)	VC (%)	Serum	N	<X> ± SD (ng/ml)	VC (%)
A	20	2,64 ± 0,15	5,7	A	10	2,76 ± 0,17	6,4
B	20	10,11 ± 0,50	4,9	B	10	10,32 ± 0,70	7,2

SD: standaarddeviatie; VC: variatiecoëfficiënt

D. Nauwkeurigheid

VERDUNNINGSTEST			
Monster	Verdunning	Theoretische concentratie (ng/ml)	Concentratie die bepaald werd (ng/ml)
1	1/1	50,70	50,70
	1/2	25,35	24,58
	1/4	12,67	11,96
	1/8	6,33	6,49
	1/16	3,16	3,26
	1/32	1,58	1,48
	1/64	0,79	0,62

Monsters werden verdund met de nulkalibrator.

RECOVERY-TEST			
Monster	3α-Diol G toegevoegd (ng/ml)	Recovery van 3α-Diol G (ng/ml)	Recovery (%)
Serum	50	48,4	96,8
	20	21,3	106,0
	10	9,5	95,0
	5	4,9	98,0

E. Tijd tussen de laatste kalibrator en distributie van het monster
Zoals hieronder weergegeven wordt, blijven de resultaten van de bepaling nauwkeurig, zelfs wanneer een monster 20 minuten na toevoeging van de kalibrator over de gecoate buisjes gedistribueerd wordt.

TIJDSPANNE		
Serum (ng/ml)	0'	20'
Serum 1	2,92	2,90
Serum 2	9,60	9,59

XIV. INTERNE KWALITEITSCONTROLE

- Indien de resultaten, die verkregen werden voor controle 1 en/of controle 2, niet binnen het bereik vallen zoals vermeld op het flaconetiket, dan mogen de resultaten niet gebruikt worden tenzij een bevredigende uitleg gegeven wordt voor de discrepantie.
- Indien gewenst, kan elk laboratorium zijn eigen pools voor controlemonsters maken, die dan in aliquots bewaard moeten worden in de diepvriezer. Gelieve niet meer dan twee keer in te vriezen en te ontdooien.
- Naar ons beste weten bestaat er geen internationaal referentiemateriaal voor deze parameter.

XV. REFERENTIE-INTERVALS

Populatie		Absoluut bereik (ng/ml)	Mediaan (ng/ml)
Vrouwen	Vóór menopauze	0,3 - 7,9	1,9
	Na menopauze	0,1 - 5,9	1,5
	Hirsuut	1,6 - 9,3	4,6
Mannen		1,0 - 23,6	6,4

XVI. VOORZORGSMAATREGELEN EN WAARSCHUWINGEN

Veiligheid
Uitsluitend voor in vitro diagnostisch gebruik.
Deze kit bevat ¹²⁵I (halfwaardetijd: 60 dagen) , dat ioniserende X- (28 keV) en γ-stralen (35.5 keV) uitzendt. Dit radioactieve product mag enkel overhandigd worden aan en gebruikt worden door bevoegd personeel; ontvangst, opslag, gebruik en overdracht van radioactieve producten zijn onderworpen aan de wetgeving van het land van de eindgebruiker. In geen geval mag het product toegediend worden aan mensen of dieren.
De componenten, afkomstig van menselijk bloed, in deze kit werden getest door in Europa goedgekeurde en/of door de Amerikaanse FDA goedgekeurde methoden op aanwezigheid van HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 en 2 en gaven een negatief resultaat. Geen enkele bekende methode kan echter volledige garantie bieden dat derivaten van menselijk bloed geen hepatitis, aids of andere infecties overdragen. Daarom moet men reagentia, serum- of plasmamonsters behandelen in overeenstemming met de plaatselijke veiligheidsprocedures.
Alle producten en derivaten van dierlijke oorsprong zijn afkomstig van gezonde dieren. Boviene componenten komen uit landen waar BSE niet gerapporteerd werd. Toch moeten componenten die bestanddelen van dierlijke oorsprong bevatten, behandeld worden als potentieel besmettelijk.
Vermijd dat de reagentia (natriumazide als conserveermiddel) in contact komen met de huid. Azide in deze kit kan reageren met lood en koper in de afvoerleidingen en op die manier zeer explosieve metaalaziden vormen. Tijdens de wasfase moeten de afvoerleidingen ruimschoots met water nagespoeld worden om ophoping van azide te vermijden.
Niet roken, drinken, eten of cosmetica aanbrengen in de werkuimte. Niet met de mond pipetteren. Draag beschermende kleding en gebruik wegwerphandschoenen. Alle handelingen met radioactief materiaal moeten plaatsvinden in een daartoe bestemde ruimte, waar uitsluitend bevoegd personeel toegelaten wordt. Een logboek met ontvangst en opslag van radioactieve materialen moet worden bijgehouden in het laboratorium. Laboratoriumapparatuur en glaswerk, dat eventueel gecontamineerd werd met

radioactieve bestanddelen, moeten worden gesegregeerd om kruisbesmetting van verschillende radioisotopen te vermijden. Als radioactief materiaal gemorst werd, dan moet dat onmiddellijk gereinigd worden in overeenstemming met de procedure voor stralingsveiligheid. Het radioactieve afval moet worden weggegooid in overeenstemming met de plaatselijke voorschriften en richtlijnen van de autoriteiten waaronder het laboratorium valt. Naleving van de basisregels van stralingsveiligheid zorgt voor een juiste bescherming.

XVII. BIBLIOGRAFIE

1.

RITTMASER R.S. *et al.* (1988)
Androstanediol Glucuronide Isomers in Normal Men and Women and in Men infused with labelled Dihydrotestosterone.
JCE & M., 66, 1, 212-216.

2.

RAO P.N. *et al.* (1987)
Isolation and Identification of Androstanediol Glucuronide from Human Plasma.
J. Steroid Biochem., 28, 5, 565-569.

3.

HORTON R. *et al.* (1982)
3 α ,17 β -Androstanediol Glucuronide in plasma.
J. Clin. Invest., 69, 1203-1206.

4.

JOURA E.A. *et al.* (1996)
Serum 3 α -androstanediol glucuronide is decreased in nonhirsute women with acne vulgaris.
Fertility and Sterility, 66, 6, 1033-1035.

5.

GILAD S. *et al.* (1994)
Assessment of 5 α -reductase activity in hirsute women: comparison of serum androstanediol glucuronide with urinary androsterone and aetiocholanolone excretion.
Clinical Endocrinology, 40, 459-464.

6.

THOMPSON D.L. *et al.* (1990)
Androsterone Glucuronide is a marker of adrenal hyperandrogenism in hirsute women.
Clinical Endocrinology, 32, 283-292.

XVIII. SAMENVATTING VAN HET PROTOCOL

	TOTAAL- TELLINGEN (µl)	KALIBRATORS (µl)	MONSTER(S) CONTROLES (µl)
Kalibrators (0 tot 5)	-	100	-
Monsters, controles	-	-	100
Tracer	500	500	500
Incubatie	2 uur bij kamertemperatuur terwijl er voortdurend geschud wordt (700 rpm)		
Scheiding	-	opzuigen	
Werk-wasoplossing		2,0 ml	
Scheiding		opzuigen	
Werk-wasoplossing		2,0 ml	
Scheiding		opzuigen	
Telling	Tel buisjes gedurende 60 seconden		

DIAsource catalogusnummer: KIP0151	Bijsluiternummer : 1701001/nl	Revisienummer : 110608/1
---------------------------------------	----------------------------------	-----------------------------



Vor Gebrauch des Kits lesen Sie bitte diese Packungsbeilage.

3 α -Diol G-RIA-CT

I. VERWENDUNGSZWECK

Ein Radio-Immunoassay für die quantitative *in vitro* Bestimmung von humanem 5 α -Androstan-3 α -17 β -Diol-Glucuronid (3 α -Diol G) in Serum und Plasma.

II. ALLGEMEINE INFORMATION

- A. **Handelsbezeichnung :** DIAsource 3 α -Diol G-RIA-CT Kit
- B. **Katalognummer :** KIP0151 : 96 Tests
- C. **Hergestellt von:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgien.

Für technische Unterstützung oder Bestellungen wenden Sie sich bitte an:

Tel : +32 (0)67 88.99.99 Fax : +32 (0)67 88.99.96

Für Deutschland : Kostenfreie Rufnummer : 0800 1 00 85 74 - Kostenfreie Faxnummer : 0800 1 00 85 75

E-mail Ordering : ordering@diasource.be

III. KLINISCHER HINTERGRUND

5 α -Androstan-3 α -17 β -Diol-Glucuronid (3 α -Diol G) ist ein C19-Steroid. Es entsteht hauptsächlich als Metabolit von Testosteron und Dihydrotestosteron (DHT). Zum größten Teil wird es in peripheren Zielgeweben wie der Haut, besonders um die Haarfollikel herum, produziert. Eine Stimulation mit größeren Mengen von 3 α -Diol G führt zu einer exzessiven Haarbildung – dies wird besonders an den Stellen deutlich, an denen Haare bei Frauen normalerweise nicht vorhanden sind.

In den letzten Jahren wuchs bei klinischen Forschern, die an idiopathischem Hirsutismus leidende Patientinnen untersuchten, das Interesse an der Messung dieses Steroids.

Unter den Steroiden, die als Vorläufer für das 3 α -Diol G gelten, wie Dehydroepiandrosteron (DHEA), Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEAS), DHT, Androstendion und Testosteron, wurde nur bei 3 α -Diol G eine Zunahme bei Hirsutismus und eine Abnahme bei Behandlung festgestellt. Diese Korrelation wurde auch bei Patientinnen mit polyzystischen Ovarien (PCO) gezeigt.

Die Bestimmung von 3 α -Diol G hat sich deshalb als nützlicher Indikator bei einer Reihe von Untersuchungsmethoden erweisen, wie bei der Überwachung des Behandlungsfortschritts bei idiopathischem Hirsutismus und von Patientinnen mit polyzystischen Ovarien.

Darüberhinaus hat sich gezeigt, dass Diabetiker, sowohl Männer als auch Frauen, unter Cyclosporin A Therapie einen 3 α -Diol-G-Spiegel über dem Normalwert haben, und als Nebeneffekt Haare auf vorher haarlosen Stellen entstehen.

IV. GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

Eine festgesetzte Menge an ¹²⁵I markiertem 3α-Diol G konkurriert mit dem zu messenden, in der Probe oder in dem Kalibrator vorhandenen 3α-Diol G um eine Menge an Antikörperbindungsstellen, die an der Wand des Polystyren Röhrchens fixiert sind. Aufgrund der hohen Spezifität der beschichteten Antikörper sind weder Extraktion noch Chromatographie erforderlich. Nach einer zweistündigen Inkubation bei RT auf einem Schüttler, beendet das Absaugen die Verdrängungsreaktion. Die Röhrchen werden anschliessend zweimal mit Waschlösung gewaschen, danach wird nochmals abgesaugt. Eine Standardkurve wird gedruckt und die 3α-Diol-G-Konzentrationen der Proben werden über Dosis Interpolation der Kalibrationskurve bestimmt.

V. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

Reagenz	96 Test Kit	Farbcode	Rekonstitution
 Mit anti 3α-Diol G-beschichtete Röhrchen	2 x 48	grau	Gebrauchsfertig
Ag ¹²⁵I Tracer : ¹²⁵ Iod markiertes 3α-Diol G (HPLC grade) in Puffer mit Rinder-casein (1%) und Azid (<0,1%)	1 Gefäß 53 ml 185 kBq	rot	Gebrauchsfertig
CAL 0 Null-Kalibrator. Rinderserum, Thymol (<0,1%) und Gentamycine (<0,1%)	1 Gefäß lyophilisiert	gelb	2 ml dest. Wasser zugeben
CAL N Kalibratoren 3α-Diol G : N = 1 bis 5 (genaue Werte auf Gefäß-Etiketten) in Rinderserum, Thymol (<0,1%) und Gentamycine (<0,1%)	5 Gefäße lyophilisiert	gelb	0,5 ml dest. Wasser zugeben
WASH SOLN CONC Waschlösung (Phosphatpuffer)	1 Gefäß 50 ml	braun	25x mit dest. Wasser (Magnetrührer verwenden) verdünnen .
CONTR N Kontrollen : N = 1 oder 2 in Humanserum und Thymol (<0,1%)	2 Gefäße lyophilisiert	silber	0,5 ml dest. Wasser zugeben

Bemerkung : Benutzen Sie den Null-Kalibrator für Probenverdünnungen.

VI. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

Folgendes Material wird benötigt, aber nicht mit dem Kit mitgeliefert:

- 1. Dest. Wasser
- 2. Pipetten: 100 µl, 500 µl und 2 ml (Verwendung von Präzisionspipetten mit Einwegpipettenspitzen wird empfohlen)
- 3. Vortexmischer
- 4. Magnetrührer
- 5. Schüttler für Röhrchen (700 rpm)
- 6. 5 ml automatische Spritze (Cornwall-Typ) zum Waschen
- 7. Absaugsystem (optional)
- 8. Jeder Gamma-Counter, der ¹²⁵I messen kann, kann verwendet werden. Maximale Messeffizienz sollte gewährleistet sein.

VII. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- A. **Kalibratoren** : Rekonstituieren Sie den Null-Kalibrator mit 2,0 ml dest. Wasser und die anderen Kalibratoren mit 0,5 ml dest. Wasser.
- B. **Kontrollen** : Rekonstituieren Sie die Kontrollen mit 0,5 ml dest. Wasser.
- C. **Waschlösung**: Zur Vorbereitung eines angemessenen Volumens nutzbarer Waschlösung, mischen Sie zu einem Volumen Waschlösung (25x) 24 Volumen destilliertes Wasser. Benutzen Sie einen Magnetrührer. Entsorgen Sie nach jedem Arbeitstag die überflüssige Waschlösung.

VIII. AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Vor dem Öffnen und Rekonstituieren sind alle Kitkomponenten bei 2 bis 8°C bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum haltbar.

- Nach der Rekonstitution sind Kalibratoren und Kontrollen eine Woche bei 2 bis 8 °C stabil. Für eine längere Aufbewahrung sollten diese Reagenzien aliquotiert und bei –20°C eingefroren werden.
- Die Waschlösung sollte frisch hergestellt und am selben Tag aufgebraucht werden.
- Wenn der Tracer nach der ersten Benutzung wieder im gutverschlossenen Originalgefäß bei 2 bis 8°C aufbewahrt wird, ist er bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.
- Veränderungen im Aussehen der Kitkomponenten können auf Instabilität bzw. Zerfall hindeuten.

IX. PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG

- Serum- oder Plasmaproben müssen bei 2-8 °C aufbewahrt werden.
- Falls der Test nicht innerhalb von 24 Std. durchgeführt wird, müssen die Proben bei –20°C aufgehoben werden.
- Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.
- Heparinisiertes Plasma liefert um 15 % niedrigere Ergebnisse als Serum:
Y (Hep. plasma) = 0,86 x (serum) + 0,52 r = 0,96 n = 13
- EDTA Plasma liefert um 25 % niedrigere Ergebnisse als Serum :
Y (EDTA plasma) = 0,74 x (serum) + 0,52 r = 0,97 n = 13

X. DURCHFÜHRUNG

- A. **Bemerkungen zur Durchführung**
Verwenden Sie den Kit oder dessen Komponenten nicht nach dem Ablaufdatum. Vermischen Sie nie Materialien von unterschiedlichen Kit-Chargen. Bringen Sie alle Reagenzien vor der Verwendung auf Raumtemperatur.
Mischen Sie alle Reagenzien und Proben gründlich durch sanftes Schütteln oder Rühren. Verwenden Sie saubere Einwegpipettenspitzen, um Kreuzkontamination zu vermeiden.
Präzisionspipetten oder ein automatisches Pipettiersystem erhöhen die Präzision. Achten Sie auf die Einhaltung der Inkubationszeiten.
Erstellen Sie für jeden Durchlauf eine Kalibrationskurve, verwenden Sie nicht die Daten von früheren Durchläufen.

- B. **Durchführung**
 1. Beschriften Sie je 2 beschichtete Röhrchen für jeden Kalibrator, jede Probe und jede Kontrolle. Zur Bestimmung der Gesamtaktivität, beschriften Sie 2 normale Röhrchen.
 2. Vortexen Sie Kalibratoren, Proben und Kontrollen kurz und geben Sie 100 µl von jedem in ihre Röhrchen.
 3. Geben Sie 0,5 ml des ¹²⁵Iod markierten 3α-Diol G in jedes Röhrchen, einschließlich der unbeschichteten Röhrchen für die Gesamtaktivität.
 4. Schütteln Sie vorsichtig die Halterung mit den Röhrchen um Blasen zu entfernen.
 5. Inkubieren Sie 2 Stunden bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln (700 rpm).
 6. Saugen Sie den Inhalt jedes Röhrchens ab (außer Gesamtaktivität). Vergewissern Sie sich, dass die Plastikspitze des Absaugers den Boden des beschichteten Röhrchens erreicht, um die gesamte Flüssigkeit zu entfernen.
 7. Waschen Sie die Röhrchen mit 2 ml Waschlösung (außer Gesamtaktivität) und saugen Sie ab. Vermeiden Sie Schaumbildung bei Zugabe der Waschlösung.
 8. Waschen Sie die Röhrchen wiederholt mit 2 ml Waschlösung (außer Gesamtaktivität) und saugen Sie ab.
 9. Lassen Sie nach dem letzten Waschen die Röhrchen 2 Minuten aufrecht stehen, und saugen Sie den verbleibenden Flüssigkeitstropfen ab.
 10. Werten Sie die Röhrchen in einem Gamma-Counter über 60 Sekunden aus.

XI. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

- 1. Berechnen Sie den Durchschnitt aus den Doppelbestimmungen, schließen Sie offensichtliche „Ausreißer“ aus.
- 2. Berechnen Sie die gebundene Radioaktivität als Prozentsatz des am Null-Kalibratorpunkt (0) bestimmten Wertes nach folgender Formel:
$$B/B_0 (\%) = \frac{\text{Aktivität (Kalibrator oder Probe)}}{\text{Aktivität (Null-Kalibrator)}} \times 100$$
- 3. Verwenden Sie semi-logarithmisches oder doppelt-logarithmisches Millimeterpapier (über 3 Größenordnungen) drucken Sie die (B/B₀(%)) Werte für jeden Kalibratorpunkt als Funktion der 3α-Diol-G-Konzentration für jeden Kalibratorpunkt
- 4. Computergestützte Methoden können ebenfalls zur Erstellung der Kalibrationskurve verwendet werden. Falls die Ergebnisberechnung mit dem Computer durchgeführt wird, empfehlen wir die Berechnung mit einer “4 Parameter“-Kurvenfunktion.
- 5. Bestimmen Sie die 3α-Diol-G-Konzentrationen der Proben über Interpolation der Probenwerte B/B₀(%) der Referenzkurve.

6. Bei jedem Assay muss der Prozentsatz des gesamten gebundenen Tracers ohne unmarkiertes 3 α -Diol G (B0/T) geprüft werden.

XII. TYPISCHE WERTE

Die folgenden Daten dienen nur zu Demonstrationszwecken und können nicht als Ersatz für die Echtzeitkalibrationekurve verwendet werden.

3 α -Diol G		cpm	B/Bo (%)
Gesamtaktivität		35967	
Kalibrator	0,0 ng/ml	13912	100,0
	0,2 ng/ml	11443	82,2
	1,2 ng/ml	8385	60,3
	6,0 ng/ml	4611	33,1
	25,0 ng/ml	1796	12,9
	75,0 ng/ml	960	6,9

XIII. LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK

- A. Nachweisgrenze
Zwanzig Null-Kalibratoren wurden zusammen mit einem Satz anderer Kalibratoren gemessen.
Die Nachweisgrenze, definiert als die scheinbare Konzentration bei zwei Standardabweichungen unterhalb des gemessenen Durchschnittswerts bei Nullbindung, entsprach 0,05 ng/ml.

B. Spezifität

Substanz	Kreuz-Reaktivität (%)
5 α -Androstan-3 α -17 β -diol G	100,00
5 α -Androstan-3 α -17 β -diol	10,69
5 α -Androstan-3 α -17 β -diol-3Glucuronid	5,86
5 α -Dihydrotestosteron Glucuronid	1,75
Testosteron Glucuronid	0,03
Testosteron	0
11 β -Hydroxytestosteron	0
5 α -Dihydrotestosteron	0
5 β - Dihydrotestosteron	0
Cortisol	0
Dehydroepiandrosteron	0
Estron	0
Androstendion	0
5-Androsten-3 β -17 β -diol	0
17 β -Estradiol	0

Bemerkung : Die Tabelle zeigt Kreuzreaktivitäten für anti 3 α -Diol G.

C. Präzision

INTRA-ASSAY PRÄZISION				INTER-ASSAY PRÄZISION			
Serum	N	<X> $\pm$ SD (ng/ml)	CV (%)	Serum	N	<X> $\pm$ SD (ng/ml)	CV (%)
A	20	2,64 $\pm$ 0,15	5,7	A	10	2,76 $\pm$ 0,17	6,4
B	20	10,11 $\pm$ 0,50	4,9	B	10	10,32 $\pm$ 0,70	7,2

SD : Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

D. Genauigkeit

VERDÜNNUNGSTEST			
Probe	Verdünnung	Theoretische Konzent. (ng/ml)	Gemessene Konzent. (ng/ml)
Serum	1/1	50,70	50,70
	1/2	25,35	24,58
	1/4	12,67	11,96
	1/8	6,33	6,49
	1/16	3,16	3,26
	1/32	1,58	1,48
	1/64	0,79	0,62

Die Proben wurden mit Null-Kalibrator verdünnt.

WIEDERFINDUNGSTEST

Probe	Zugag. 3 α -Diol G (ng/ml)	Wiedergef. 3 α -Diol G (ng/ml)	Wiedergefunden (%)
Serum	50	48,4	96,8
	20	21,3	106,0
	10	9,5	95,0
	5	4,9	98,0

- E. Zeitverzögerung zwischen letzter Kalibrator- und Probenzugabe
Es wird im folgenden gezeigt, dass die Genauigkeit der Tests selbst dann erhalten bleibt, wenn die Probe 20 Minuten nach Zugabe des Kalibrators in die beschichteten Röhrchen zugefügt wird.

ZEITABSTAND

Serum (ng/ml)	0'	20'
Serum 1	2,92	2,90
Serum 2	9,60	9,59

XIV. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

- Entsprechen die Ist-Werte nicht den auf den Fläschchen angegebenen Soll-Werten, können die Werte, ohne treffende Erklärung der Abweichungen, nicht weiterverarbeitet werden.
- Falls Extra-Kontrollen erwünscht sind, kann jedes Labor seinen eigenen Pool herstellen, der in Aliquots eingefroren werden sollte. Erinnern Sie sich, dass zwei Gefrier-Auftau-Zyklen erlaubt sind.
- Laut unserem Wissen, gibt es keine internationale Referenzen zu diesen Parametern.

XV. ZU ERWARTENDER BEREICH

Population		Absolutbereich (ng/ml)	Median (ng/ml)
Frauen	Vor Menopause	0,3 - 7,9	1,9
	Nach Menopause	0,1 - 5,9	1,5
	Hirsutismus	1,6 - 9,3	4,6
Männer		1,0 - 23,6	6,4

XV. VORSICHTMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

Sicherheit

Nur für diagnostische Zwecke.
Dieser Kit enthält ¹²⁵I (Halbwertszeit: 60 Tagen) , das ionisierende X (28 keV) und γ (35.5 keV) Strahlungen emittiert. Dieses radioaktive Produkt kann nur an autorisierte Personen abgegeben und darf nur von diesen angewendet werden; Erwerb, Lagerung, Verwendung und Austausch radioaktiver Produkte sind Gegenstand der Gesetzgebung des Landes des jeweiligen Endverbrauchers. In keinem Fall darf das Produkt an Menschen oder Tieren angewendet werden.
Die menschlichen Blutkomponenten in diesem Kit wurden mit europäischen und in USA erprobten FDA-Methoden getestet, sie waren negativ für HBsAg, anti-HCV und anti-HIV 1 und 2. Keine bekannte Methode kann jedoch vollkommene Sicherheit liefern, dass menschliche Blutbestandteile nicht Hepatitis, AIDS oder andere Infektionen übertragen. Deshalb sollte der Umgang mit Reagenzien, Serum oder Plasmaproben in Übereinstimmung mit den Sicherheitsbestimmungen erfolgen.

Alle tierischen Produkte und deren Derivate wurden von gesunden Tieren gesammelt. Komponenten von Rindern stammen aus Ländern in denen BSE nicht nachgewiesen wurde. Trotzdem sollten Komponenten, die tierische Substanzen enthalten, als potentiell ansteckend behandelt werden.
Vermeiden Sie Hautkontakt mit den Reagenzien (Natriumazid als Konservierungsmittel). Das Azid in diesem Kit kann mit Blei oder Kupfer in den Abflußrohren reagieren und so hochexplosive Metallazide bilden. Spülen Sie während der Waschschrte den Abfluß gründlich mit viel Wasser, um die Metallazidbildung zu verhindern.
Bitte rauchen, trinken, essen oder wenden Sie Kosmetika nicht in Ihrem Arbeitsbereich an. Pipettieren Sie nicht mit dem Mund. Tragen Sie Schutzkleidung und Wegwerfhandschuhe.

Der Umgang mit radioaktiven Substanzen sollte fern von Durchgangsverkehr in einem speziell ausgewiesenen Bereich stattfinden. Ein Logbuch für Protokolle und Aufbewahrung muss im Labor sein. Die Laborausrüstung und die Glasbehälter, die mit radioaktiven Substanzen kontaminiert werden können, müssen ausgesondert werden, um Kreuzkontaminationen mit unterschiedlichen Radioisotopen zu verhindern.

Verschüttete radioaktive Substanzen müssen sofort den Sicherheitsbestimmungen entsprechend entfernt werden. Radioaktive Abfälle müssen entsprechend den lokalen Bestimmungen und Richtlinien der für das Labor zuständigen Behörden gelagert werden. Das Einhalten der Sicherheitsbestimmungen für den Umgang mit radioaktiven Substanzen gewährleistet ausreichenden Schutz.

XVII. LITERATUR

1.

RITTMAS­TER R.S. *et al.* (1988)
Androstanediol Glucuronide isomers in normal men and women and in men infused with labelled Dihydrotestosterone.
JCE & M., 66, 1, 212-216.

2.

RAO P.N. *et al.* (1987)
Isolation and identification of Androstanediol Glucuronide from human plasma.
J. Steroid Biochem., 28, 5, 565-569.

3.

HORTON R. *et al.* (1982)
3 α -17 β -Androstanediol Glucuronide in plasma.
J. Clin. Invest., 69, 1203-1206.

4.

JOURA E.A. *et al.* (1996)
Serum 3 α -androstanediol glucuronide is decreased in nonhirsute women with acne vulgaris.
Fertility and Sterility, 66, 6, 1033-1035.

5.

GILAD S. *et al.* (1994)
Assessment of 5 α -reductase activity in hirsute women: comparison of serum androstanediol glucuronide with urinary androsterone and aetiocholanolone excretion.
Clinical Endocrinology, 40, 459-464.

6.

THOMPSON D.L. *et al.* (1990)
Androsterone Glucuronide is a marker of adrenal hyperandrogenism in hirsute women.
Clinical Endocrinology, 32, 283-292.

XVIII. ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

	GESAMT- AKTIVITÄT (µl)	KALIBRA- TOREN (µl)	PROBE(N)- KONTROLLEN (µl)
Kalibratoren (0 to 5)	-	100	-
Proben, Kontrollen	-	-	100
Tracer	500	500	500
Inkubation	2 Std. bei RT u. ständ. Schütteln (700 rpm)		
Separation	-	absaugen	
Waschlösung	-	2,0 ml	
Separation	-	absaugen	
Waschlösung	-	2,0 ml	
Separation	-	absaugen	
Auswertung	Messen der Röhrchen 60 Sekunden		

DIAsource Katalognummer : KIP0151	Beipackzettell- nummer : 1701001/de	Nummer der Originalausgabe : 110608/1
--------------------------------------	---	---

Revisionsdatum: 2011-06-08



Prima di utilizzare il kit leggere attentamente le istruzioni per l'uso

3 α -Diol G-RIA-CT

I. USO DEL KIT

Kit radioimmunologico per la determinazione quantitativa in vitro del 5 α -Androstan-3 α -17 β -diolo-glicuronide umano (3 α -Diol G) in siero o plasma.

II. INFORMAZIONI DI CARATTERE GENERALE

- A. Nome commerciale:** DIAsource 3 α -Diol G-RIA-CT Kit
- B. Numero di catalogo:** KIP0151: 96 tests
- C. Prodotto da:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgio.

Per informazioni tecniche o su come ordinare il prodotto contattare:
Tel: +32 (0) 67 88.99.99 Fax: +32 (0) 67 88.99.96

III. INFORMAZIONI CLINICHE

Il 5 α -Androstan-3 α -17 β -diolo-glicuronide (3 α -Diolo G) è uno steroide C19 prodotto principalmente dal metabolismo di testosterone e diidrotestosterone (DHT) nei tessuti periferici bersaglio come l'epidermide, in special modo intorno ai follicoli piliferi. Lo stimolo con elevate concentrazioni di 3 α -Diolo G porta, nelle donne, ad una notevole proliferazione di peli, specialmente in aree solitamente glabre. La determinazione delle concentrazioni di questo ormone ha suscitato negli ultimi anni notevole interesse presso i ricercatori clinici che studiano le donne affette da irsutismo idiopatico. Tra gli steroidi precursori del 3 α -Diolo G, deidroepiandrosterone (DHEA), deidroepiandrosterone solfato (DHEAS), DHT, androstenedione e testosterone, è stato dimostrato che solo il 3 α -Diolo G aumenta in caso di irsutismo e diminuisce con il trattamento. La stessa correlazione è stata trovata per pazienti con ovaio policistico. La determinazione del 3 α -Diolo G si è rivelata quindi un utile indicatore dell'efficacia del trattamento dell'irsutismo idiopatico e dell'ovaio policistico.

Inoltre, in pazienti diabetici di entrambi i sessi in trattamento con Ciclosporina A, sono stati trovati valori superiori alla norma di 3 α -Diolo G, per un effetto indesiderato del farmaco che provoca crescita di peli in aree precedentemente glabre.

IV. PRINCIPIO DEL METODO

Una quantità definita di 3α-Diolo G marcata con ¹²⁵I compete con il 3α-Diolo G presente in calibratore e campioni per un numero definito di siti di un anticorpo adsorbito sulla superficie interna di provette di polistirene. Poiché l’anticorpo è altamente specifico, non è necessario eseguire estrazioni o separazioni cromatografiche. Dopo 2 ore di incubazione in agitazione a temperatura ambiente, la reazione di competizione viene interrotta per aspirazione della miscela di reazione. Le provette vengono quindi lavate due volte con tampone di lavaggio diluito e aspirate. La concentrazione di 3α-Diolo G nei campioni viene calcolata per interpolazione sulla curva calibratore.

V. REATTIVI FORNITI

Reattivi	Kit da 96 test	Codice colore	Volume di ricostituzione			
 Provette sensibilizzate con anticorpo anti 3a-Diolo G	2 x 48	grigio	Pronte per l'uso			
<table border="1"><tr><td>Ag</td><td>¹²⁵I</td></tr></table> Marcato: 3a-Diolo G marcato con ¹²⁵ I (grado HPLC), in tampone con caseina bovina (1%) e sodio azide (<0,1%)	Ag	¹²⁵ I	1 flacone 55 ml 185 kBq	rosso	Pronte per l'uso	
Ag	¹²⁵ I					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Calibratore zero in siero bovino, contenente timolo (<0,1%) e gentamicina (<0,1%)	CAL	0	1 flacone liofilizzato	giallo	Aggiungere 2 ml di acqua distillata	
CAL	0					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Calibratore 1-5 di 3a-Diolo G, (le concentrazioni esatte degli calibratore sono riportate sulle etichette dei flaconi), in siero bovino, contenente timolo (<0,1%) e gentamicina (<0,1%)	CAL	N	5 flaconi liofilizzati	giallo	Aggiungere 0,5 ml di acqua distillata	
CAL	N					
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Tampone di lavaggio (tampone fosfato)	WASH	SOLN	CONC	1 flacone 50 ml	bruno	Diluire 25 x con acqua distillata usando un agitatore magnetico
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Controlli: N = 1 o 2, in siero umano contenente timolo (<0,1%)	CONTROL	N	2 flaconi liofilizzati	argento	Aggiungere 0,5 ml di acqua distillata	
CONTROL	N					

Note : Usare lo calibratore zero per diluire i campioni.

VI. REATTIVI NON FORNITI

Il seguente materiale è richiesto per il dosaggio ma non è fornito nel kit.

- 1. Acqua distillata.
- 2. Pipette per dispensare 100 µl, 500 µl e 2 ml (Si raccomanda di utilizzare pipette accurate con puntale in plastica monouso).
- 3. Agitatore tipo vortex.
- 4. Agitatore magnetico.
- 5. Agitatore rotante. (700 rpm)
- 6. Pipetta a ripetizione automatica 5 ml per i lavaggi.
- 7. Sistema di aspirazione dei campioni (facoltativo).
- 8. Contatore gamma con finestra per ¹²⁵I (efficienza minima 70%)

VII. PREPARAZIONE DEI REATTIVI

- A. **Calibratore:** Ricostituire lo calibratore zero con 2 ml di acqua distillata e gli altri calibratore con 0,5 ml di acqua distillata.
- B. **Controlli:** Ricostituire i controlli con 0,5 ml di acqua distillata.
- C. **Soluzione di lavoro del tampone di lavaggio:** Preparare la quantità necessaria di soluzione di lavoro del tampone di lavaggio aggiungendo 24 parti di acqua distillata ad una parte di tampone di lavaggio concentrato (25 x). Usare un agitatore magnetico per rendere la soluzione omogenea. La soluzione di lavoro va scartata al termine della giornata.

VIII. CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI

- I reattivi non utilizzati sono stabili a 2-8°C fino alla data riportata su ciascuna etichetta.
- Dopo ricostituzione, calibratore e controlli sono stabili 1 settimana a 2-8°C e, suddivisi in aliquote a -20°C per periodi più lunghi.
- La soluzione di lavoro del tampone di lavaggio deve essere preparata fresca ogni volta e usata nello stesso giorno della preparazione.
- Dopo apertura del flacone, il marcato è stabile fino alla data di scadenza riportata sull’etichetta, se conservato a 2-8°C nel flacone originale ben tappato.
- Alterazioni dell’aspetto fisico dei reattivi possono indicare una loro instabilità o deterioramento.

IX. RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

- Conservare i campioni di siero o plasma a 2-8°C.
- Se non si desidera eseguire il dosaggio entro 24 ore dal prelievo, si raccomanda di conservare i campioni a -20°C.
- Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelo dei campioni.
- Il plasma da eparina fornisce valori mediamente più bassi del 15% rispetto al siero
y (plasma da eparina) = 0,86 x (siero) + 0,52 r = 0,97 n=13
- Il plasma da EDTA fornisce valori mediamente più bassi del 25% rispetto al siero
y (plasma da EDTA) = 0,74 x (siero) + 0,52 r = 0,97 n=13

X. METODO DEL DOSAGGIO

A. Avvertenze generali

Non usare il kit o suoi componenti oltre la data di scadenza. Non mescolare reattivi di lotti diversi. Prima dell’uso portare tutti i reattivi a temperatura ambiente. Mescolare delicatamente i campioni per inversione o rotazione. Per evitare cross-contaminazioni, cambiare il puntale della pipetta ogni volta che si usi un nuovo reattivo o campione. L’uso di pipette ben tarate e ripetibili o di sistemi di pipettamento automatici migliora la precisione del dosaggio. Rispettare i tempi di incubazione. Allestire una curva di taratura per ogni seduta analitica, in quanto non è possibile utilizzare per un dosaggio curve di taratura di sedute analitiche precedenti.

B. Metodo del dosaggio

- 1. Numerare le provette sensibilizzate necessarie per dosare in duplicato ogni calibratore, campione o controllo. Numerare 2 provette non sensibilizzate per la determinazione dell’attività totale.
- 2. Agitare brevemente su vortex calibratore, campioni e controlli. Dispensare 100 µl di calibratore, campioni e controlli nelle rispettive provette.
- 3. Dispensare 500 µl di 3α-Diolo G marcato con ¹²⁵I in tutte le provette, comprese quelle per l’attività totale.
- 4. Scuotere gentilmente il portaprovette per liberare eventuali bolle d’aria intrappolate nel liquido contenuto nelle provette.
- 5. Incubare 2 ore a temperatura ambiente in agitazione (700 rpm).
- 6. Aspirare il liquido contenuto in tutte le provette, tranne in quelle per l’attività totale, facendo attenzione che il puntale dell’aspiratore raggiunga il fondo delle provette e che aspiri tutto il liquido. Lavare tutte le provette, tranne quelle per l’attività totale, con 2 ml di soluzione di lavoro di tampone di lavaggio, evitando di provocare la formazione di schiuma.
- 7. Lavare nuovamente tutte le provette, tranne quelle per l’attività totale, con 2 ml di soluzione di lavoro di tampone di lavaggio e aspirare.
- 8. Dopo il secondo lavaggio lasciare decantare le provette in posizione verticale per due minuti circa e aspirare eventuali gocce di liquido residue.
- 9. Contare tutte le provette per 1 minuto con il contatore gamma.

XI. CALCOLO DEI RISULTATI

- 1. Calcolare la media delle determinazioni in duplicato, scartando i duplicati palesemente discordanti.
- 2. Calcolare il rapporto (rapporto di competizione) tra radioattività legata alle provette di calibratore 1-5, campioni e controlli (B) e la radioattività legata alle provette dello calibratore zero (B0).

$$B/B0 (\%) = \frac{\text{cpm (Calibratore, campioni o controlli)}}{\text{cpm (Zero Calibratore)}} \times 100$$

- 3. Usando carta semilogaritmica a 3 cicli o logit-log e ponendo in ordinata i rapporti di competizione. B/B0 (%) per ogni calibratore e in ascissa le rispettive concentrazioni di 3α-Diolo G, tracciare la curva di taratura.

4. E' possibile utilizzare un sistema di interpolazione dati automatizzato. Con un sistema automatico di interpolazione dati, utilizzare la curva a 4 parametri.
5. Per interpolazione sulla curva di taratura dei rapporti di competizione di campioni e controlli, determinare le rispettive concentrazioni di 3α-Diolo G. Per ogni dosaggio determinare la capacità legante B0/T.

XII. CARATTERISTICHE TIPICHE

I sotto riportati sono forniti a titolo di esempio e non devono essere utilizzati per calcolare le concentrazioni di 3α-Diolo G in campioni e controlli al posto della curva calibratore eseguita contemporaneamente.

3α-Diolo G		cpm	B/Bo (%)
Attività totale		35967	
Calibratore	0,0 ng/ml	13912	100,0
	0,2 ng/ml	11443	82,2
	1,2 ng/ml	8385	60,3
	6,0 ng/ml	4611	33,1
	25,0 ng/ml	1796	12,9
	75,0 ng/ml	960	6,9

XIII. CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO

A. Sensibilità

La sensibilità, calcolata come concentrazione apparente di un campione con cpm pari alla media meno 2 deviazioni calibratore di 20 replicati dello calibratore zero, è risultata essere 0,05 ng/ml.

B. Specificità

Composto	Cross-Reattività (%)
5α-Androstan-3α-17β-diolo G	100,00
5α-Androstan-3α-17β-diolo	10,69
5α-Androstan-3α-17β-diolo-3Glicuronide	5,86
5α-Diidrotestosterone Glicuronide	1,75
Progesterone	0,03
Testosterone glicuronide	0
Testosterone	0
11β-Idrossotestosterone	0
5α-Diidrotestosterone	0
5β-Diidrotestosterone	0
Cortisolo	0
Deidroepiandrosterone	0
Estrone	0
Androstenedione	0
5-Androstene-3β-17β-diolo	0
17β-Estradiolo	0

Nota: La tabella mostra la cross-reattività dell’anticorpo anti 3α-Diolo G

C. Precisione

INTRA SAGGIO				INTER SAGGIO			
Siero	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Siero	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	20	2,64 ± 0,15	5,7	A	10	2,76 ± 0,17	6,4
B	20	10,11 ± 0,50	4,9	B	10	10,32 ± 0,70	7,2

SD : Deviazione Standard; CV: Coefficiente di Variazione

D. Accuratezza

Campione	Diluizione	Concentrazione teorica (ng/ml)	Concentrazione misurata (ng/ml)
1	1/1	50,70	50,70
	1/2	25,35	24,58
	1/4	12,67	11,96
	1/8	6,33	6,49
	1/16	3,16	3,26
	1/32	1,58	1,48
	1/64	0,79	0,62

I campioni sono stati diluiti con calibratore zero.

TEST DI RECUPERO			
Campione	3α-Diolo G aggiunto (ng/ml)	3α-Diolo G recuperato (ng/ml)	Recupero (%)
Siero	50	48,4	96,8
	20	21,3	106,0
	10	9,5	95,0
	5	4,9	98,0

E. Tempo trascorso tra l’aggiunta dell’ultimo calibratore e il campione

Come mostrato nella seguente tabella, il dosaggio si mantiene accurato anche quando un campione viene aggiunto nelle provette sensibilizzate venti minuti dopo l’aggiunta del calibratore.

TEMPO TRASCORSO		
Siero (ng/ml)	0'	20'
Siero 1	2,92	2,90
Siero 2	9,60	9,59

XIV. CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO

- Se i risultati ottenuti dosando il Controllo 1 e il Controllo 2 non sono all’interno dei limiti riportati sull’etichetta dei flaconi, non è opportuno utilizzare i risultati ottenuti per i campioni, a meno che non si trovi una giustificazione soddisfacente.
- Ogni laboratorio può preparare un proprio pool di sieri da utilizzare come controllo, da conservare congelato in aliquote. Non congelare e scongelare un’aliquota più di due volte.
- Al momento non risulta disponibile uno calibratore di riferimento internazionale per questo parametro.

XV. INTERVALLI DI RIFERIMENTO

Popolazione		Intervallo Assoluto (ng/ml)	Mediana (ng/ml)
Femmina	Pre Menopausa	0,3 - 7,9	1,9
	Post Menopausa	0,1 - 5,9	1,5
	Irsute	1,6 - 9,3	4,6
Maschio		1,0 - 23,6	6,4

XVI. PRECAUZIONI PER L'USO

Sicurezza

Il kit è solo per uso diagnostico in vitro.

Il kit contiene ¹²⁵I (emivita: 60 giorni) emettente raggi X (28 keV) e γ (35.5 keV) ionizzanti.

L’acquisto, la detenzione, l’utilizzo e il trasporto di materiale radioattivo sono soggetti a regolamentazione locale. In nessun caso il prodotto può essere somministrato ad esseri umani o animali. I reattivi di origine umana presenti nel kit sono stati dosati con metodi approvati da organismi di controllo europei o da FDA e si sono rivelati negativi per HBs Ag, anti HCV, anti HIV1 e anti HIV2. Non sono disponibili metodi in grado di offrire la certezza assoluta che derivati da sangue umano non possano provocare epatiti, AIDS o trasmettere altre infezioni. Manipolare questi reattivi o i campioni di siero o plasma secondo le procedure di sicurezza vigenti. Tutti i prodotti di origine animale o loro derivati provengono da animali sani. I componenti di origine bovina provengono da paesi dove non sono stati segnalati casi di BSE. E’ comunque necessario considerare i prodotti di origine animale come potenziali fonti di infezioni. Evitare ogni contatto dell’epidermide con i reattivi contenenti sodio azide come conservante. La sodio azide può reagire con piombo rame o ottone presenti nelle tubature di scarico per formare metallo-azidi esplosive. Smaltire questi reattivi facendo scorrere abbondante acqua negli scarichi. Nei luoghi dove si usano sostanze radioattive non è consentito consumare cibi o bevande, fumare o usare cosmetici. Non pipettare i reattivi con pipette a bocca. Usare sempre guanti e camici da laboratorio quando si manipola materiale radioattivo. Le sostanze radioattive devono essere conservate in propri contenitori in appositi locali che devono essere interdetti alle persone non autorizzate.

Deve essere tenuto un registro di carico e scarico del materiale radioattivo. Il materiale di laboratorio e la vetreria deve essere dedicato all'uso di isotopi specifici per evitare cross-contaminazioni.
In caso di contaminazione o dispersione di materiale radioattivo, fare riferimento alle norme locali di radioprotezione. I rifiuti radioattivi devono essere smaltiti secondo le norme locali di radioprotezione. Lo scrupoloso rispetto delle norme per l'uso di sostanze radioattive fornisce una protezione adeguata agli utilizzatori.

XVII. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1.

RITTMASER R.S. *et al.* (1988)

Androstanediol Glucuronide Isomers in Normal Men and Women and in Men infused with labelled Dihydrotestosterone.

JCE & M., 66, 1, 212-216.

2.

RAO P.N. *et al.* (1987)

Isolation and Identification of Androstanediol Glucuronide from Human Plasma.

J. Steroid Biochem., 28, 5, 565-569.

3.

HORTON R. *et al.* (1982)

3 α ,17 β -Androstanediol Glucuronide in plasma.

J. Clin. Invest., 69, 1203-1206.

4.

JOURA E.A. *et al.* (1996)

Serum 3 α -androstanediol glucuronide is decreased in nonhirsute women with acne vulgaris.

Fertility and Sterility, 66, 6, 1033-1035.

5.

GILAD S. *et al.* (1994)

Assesment of 5 α -reductase activity in hirsute women: comparison of serum androstanediol glucuronide with urinary androsterone and aetiocholanolone excretion.

Clinical Endocrinology, 40, 459-464.

6.

THOMPSON D.L. *et al.* (1990)

Androsterone Glucuronide is a marker of adrenal hyperandrogenism in hirsute women.

Clinical Endocrinology, 32, 283-292.

XVIII. SCHEMA DEL DOSAGGIO

	Attività totale ml	Calibratore ml	Campioni Controlli ml
Calibratore (0 to 5) Campioni, controlli Marcato	- - 500	100 - 500	- 100 500
Incubazione	2 ore a temperatura ambiente in agitazione		
Separazione Soluzione di lavoro tampone di lavaggio Separazione Soluzione di lavoro tampone di lavaggio Separazione		Aspirare 2 ml Aspirare 2 ml Aspirare	
Conteggio	Contare le provette per 1 minuto		

Numero di catalogo di DIAsource : KIP0151	P.I. numero : 1701001/it	Revisione numero : 110608/1
--	-----------------------------	--------------------------------



es

Leer el protocolo completo antes de usar.

3 α -Diol G-RIA-CT

I. INSTRUCCIONES DE USO

Radioinmunoensayo para la determinación cuantitativa in vitro del 5 α -Androstane-3 α -17 β -Diol-Glucoronido (3 α -Diol G) humano en suero y plasma.

II. INFORMACIÓN GENERAL

- A. **Nombre:** DIASource 3 α -Diol G-RIA-CT Kit
- B. **Número de Catálogo:** KIP0151 : 96 tests
- C. **Fabricado por:** DIASource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgium.

Para cuestiones técnicas y información sobre pedidos contactar :

Tel : +32 (0)67 88.99.99

Fax : +32 (0)67 88.99.96

III. INFORMACIÓN CLÍNICA

El 5 α -Androstane-3 α -17 β -Diol-Glucoronido (3 α -Diol G) es un esteroide C19. Es producido principalmente como metabolito de la testosterona y Dihidrotestosterona (DHT). Es ampliamente producido en tejidos periféricos como la piel, especialmente alrededor de los folículos del cabello. La estimulación por cantidades grandes de 3 α -Diol G, ocasiona formación excesiva de cabello notablemente llamativa donde el cabello - normalmente no este presente en la mujer.

Recientemente, el interés por medir éste esteroide ha aumentado considerablemente, por parte de los investigadores clínicos que estudian aquellas mujeres que sufren hirsutismo idiopático.

Entre los esteroides conocidos por ser precursores para el 3 α -Diol G, como dehidroepiandrostenediona (DHEA), dehidroepiandrostenediona sulfato (DHEAS), DHT androstenediona y testosterona, solo el 3 α -Diol G presenta un incremento en los hirsutismos y una disminución con el tratamiento. Esta correlación ha sido también demostrada en pacientes con ovarios policísticos (PCO).

Las determinaciones de 3 α -Diol G, - son útiles como indicador de las diferentes vías, incluyendo la monitorización - del progreso en el tratamiento del hirsutismo idiopático y mujeres con ovarios policísticos.

Además pacientes diabéticos, tanto hombres como mujeres, en tratamiento con ciclosporina A, muestran unos niveles de 3 α -Diol G por encima de la normalidad, con un efecto por otro lado de la aparición de cabello en áreas previamente sin cabello.

IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

Una cantidad fija de 3α-Diol G marcada con I¹²⁵ compite con el 3α-Diol G a medir, presente en la muestra ó en el calibrador, por los puntos de unión del anticuerpo inmovilizado en las paredes de un tubo de poliestireno. No se requiere ni extracción ni cromatografía debido a la alta especificidad de los anticuerpos utilizados. Después de 2 horas de incubación a T.A. con agitación, una aspiración termina con la reacción de competición. Los tubos se lavan dos veces con 2 ml de Solución de lavado y se aspiran otra vez. Se dibuja la curva de calibración y las concentraciones de 3α-Diol G de las muestras se determinan por interpolación de la dosis en la curva de calibración.

V. REACTIVOS SUMINISTRADOS

Reactivos	Kit 96 test	Código de Color	Reconstitución
 Tubos recubiertos con anti 3α-Diol G	2 x 48	gris	Listo para uso
Ao 125I TRAZADOR:3α-DiolG marcado con I125 (grado HPLC) en tampón con caseína bovina (1%) y azida (<0,1%)	1 vial 53 ml 185 kBq	rojo	Listo para uso
CAL 0 Calibrador cero en suero bovino, thymol, (<0,1%)y gentamicina (< 0,1%)	1 vial lío­filizado	amarillo	Añadir 2 ml de agua destilada
CAL N Calibradores 3α-Diol G - N = 1 al 5 (mirar los valores exactos en las etiquetas) en suero bovino, thymol (<0,1%) y gentamicina (<0,1%)	5 viales lío­filizados	amarillo	Añadir 0.5 ml de agua destilada
WAS SOLN CONC Solución de lavado (Tampón Fosfato)	1 vial 50 ml	marrón	Diluir 25 x con agua destilada (utilizar agitador magnético)
CONTR N Controles - N = 1 o 2 en suero humano y thymol (<0,1%)	2 viales lío­filizados	plateado	Añadir 0,5 ml de agua destilada

Nota: Para diluciones de muestras utilizar estandar cero

VI. MATERIAL NO SUMINISTRADO

El material mencionado a continuación es necesario y no esta incluido en el kit

- Agua destilada
- Pipetas de 100µl, 500µl y 2 ml (Se recomienda el uso de pipetas precisas con puntas desechables de plástico)
- Vortex
- Agitador magnético
- Agitador de tubos (700 rpm)
- Jeringa automática 5 ml (tipo Cornwall) para el lavado
- Sistema de aspiración (opcional)
- Contador de radiaciones gamma para medir I¹²⁵ (mínima eficiencia 70%)

VII. PREPARACIÓN REACTIVOS

- A. Calibradores:** Reconstituir el calibrador cero con 2,0 ml de agua destilada y otros calibradores con 0,5 ml de agua destilada.
- B. Controles:** Reconstituir los controles con 0,5 ml de agua destilada.
- C. Solución de lavado de trabajo:** Preparar el volumen necesario de Solución de lavado de trabajo mezclando 24 partes de agua destilada por 1 parte de Solución de lavado (25x). Utilizar un agitador magnético para homogeneizar. Desechar la solución de lavado de trabajo no utilizada al final del día.

VIII. ALMACENAJE Y CADUCIDADES DE LOS REACTIVOS

- Antes de abrir ó reconstituir todos los componentes de los kits son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, si se guardan a 2-8°C.

- Después de su reconstitución los calibradores y controles son estables durante una semana a 2-8°C. Para periodos más largos, alicuotar y guardar a –20°C.
- La solución de lavado de trabajo recién preparada solo debe utilizarse en el mismo día.
- Después del primer uso, el trazador es estable hasta la fecha de caducidad, si se guarda en el vial original cerrado a 2-8°C.
- Las alteraciones de los reactivos en el aspecto físico pueden indicar inestabilidad ó deterioro.

IX. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

- Las muestras de suero ó plasma deben ser guardadas a 2-8°C.
- Si el ensayo no se realiza en 24 hrs., almacenar las muestras a –20°.
- Evitar congelar y descongelar sucesivamente.
- El uso de plasma en heparina produce resultados un 15% más bajos que en suero:
 $Y \text{ (Hep. plasma)} = 0,86 \times (\text{suero}) + 0,52 \quad r = 0,96 \quad n = 13$
- El uso de plasma en EDTA produce resultados un 25% más bajos que en suero:
 $Y \text{ (EDTA plasma)} = 0,74 \times (\text{suero}) + 0,52 \quad r = 0,97 \quad n = 13$

X. PROTOCOLO

- A. Notas de manejo**
No utilizar el kit ó componentes después de la fecha de caducidad. No mezclar reactivos de diferente numero de lote. Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente antes de su uso.
Agitar municiosamente todos los reactivos y muestras, agitándolos o girándolos suavemente. Con el fin de evitar ninguna contaminación utilizar puntas de pipetas desechables y limpias para la adición de cada reactivo y muestra.
El uso de pipetas de precisión ó equipamiento de dispensación automática mejorara la precisión. Respetar los tiempos de incubación.
Preparar la curva de calibración en cada ensayo, no utilizar los datos de un ensayo previo.

- B. Protocolo**
 - Marcar los tubos recubiertos por duplicado para cada unos de los estándares, muestras y controles. Para la determinación de las Cuentas Totales, marcar 2 tubos normales.
 - Agitar brevemente los calibradores, muestras y controles y dispensar 100 µl de cada uno en sus respectivos tubos.
 - Dispensar 0,5 ml de 3α-Diol G marcado con I¹²⁵ en cada tubo, incluyendo los tubos descubiertos a las Cuentas Totales.
 - Agitar suavemente la gradilla de tubos para soltar cualquier burbuja cautiva de las paredes de los tubos.
 - Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación constante (700 rpm).
 - Aspirar el contenido de cada tubo (excepto los de Cuentas Totales). Asegurarse que la punta de la pipeta de aspiración toca el fondo del tubo con el fin de aspirar todo el líquido.
 - Lavar los tubos con 2 ml de Solución de lavado de trabajo (excepto los de Cuentas Totales) y aspirar. Evitar la formación de espuma durante la adición de la Solución de lavado
 - Lavar de nuevo con 2 ml de Solución de lavado de trabajo (excepto los de Cuentas Totales) y aspirar .
 - Después del último lavado, dejar los tubos en posición inversa durante 2 minutos y aspirar el liquido restante.
 - Medir la actividad de cada tubo durante 60 segundos en un Contador Gamma.

XI. CALCULO DE RESULTADOS

- Calcular la media de los duplicados, rechazando aquellos duplicados alejados de la media.
- Calcular la radiactividad enlazada como un porcentaje de la unión con respecto al calibrador cero (0) de acuerdo con la siguiente formula:
$$B/B0(\%) = \frac{\text{Cuentas (Calibrador ó muestra)}}{\text{Cuentas (Calibrador Cero)}} \times 100$$
- Utilizando papel 3 ciclo semilogaritmico ó logit-log, representar los valores de (B/B0%) de cada calibrador frente a las contracciones del 3α-Diol G de cada calibrador, rechazando aquellos duplicados alejados de la media.
- Métodos computarizados de computación de resultados pueden ser utilizados para la construcción de la curva de calibración. Si se utiliza un sistema automático de calculo de resultados, se recomienda usar la representación gráfica “ 4 parámetros”.
- Por interpolación de los valores (B/B%) de las muestras, se determinan los valores de las concentraciones de las mismas desde la curva de calibración.

5. El porcentaje total de enlace del trazador en ausencia de 3 α -Diol G no marcado (B0/T) debe ser calculado en cada ensayo.

XII. EJEMPLO DE RESULTADOS

Los datos mostrados a continuación sirven como ejemplo y nunca deberán ser usados como una calibración real.

3 α -Diol G		Cpm	B/Bo (%)
Cuentas Totales		35967	
Calibrador	0,0 ng/ml	13912	100,0
	0,2 ng/ml	11443	82,2
	1,2 ng/ml	8385	60,3
	6,0 ng/ml	4611	33,1
	25,0 ng/ml	1796	12,9
	75,0 ng/ml	960	6,9

XIII. REALIZACIÓN Y LIMITACIONES

A. **Limite de detección**
Veinte calibradores cero fueron medidos en una curva con otros calibradores.
El limite de detección, definido como la concentración aparente resultante de dos desviaciones estándares debajo de la media de enlace del calibrador cero, fue de 0,05 ng/ml.

B. **Especificidad**

Componente	Reacción-cruzada (%)
5 α -Androstane-3 α -17 β -diolG	100,00
5 α -Androstane-3 α -17 β -diol	10,69
5 α -Androstane-3 α -17 β -diol-3Glucuronide	5,86
5 α -Dihydrotestosterone Glucuronide	1,75
Progesterone	0,03
Testosterone glucuronide	0
Testosterone	0
11 β -hydroxytestosterone	0
5 α -Dihydrotestosterone	0
5 β -Dihydrotestosterone	0
Cortisol	0
Dehydroepiandrosterone	0
Estrone	0
Androstenedione	0
5-Androstene-3 β -17 β -diol	0
17 β -Estradiol	0

Nota: Esta tabla muestra las reacciones cruzadas del anti 3 α -Diol G

C. **Precision**

PRECISION INTRA-ENSAYO				PRECISION INTER-ENSAYO			
Suero	N	<X> $\pm$ SD (ng/ml)	CV (%)	Suero	N	<X> $\pm$ SD (ng/ml)	CV (%)
A	20	2,64 $\pm$ 0,15	5,7	A	10	2,76 $\pm$ 0,17	6,4
B	20	10,11 $\pm$ 0,50	4,9	B	10	10,32 $\pm$ 0,70	7,2

SD : Desviación Estándar; CV: Coeficiente de Variación

D. **Exactitud**

TEST DILUCIÓN			
Muestra	Dilución	Concent. Teórica (ng/ml)	Concent. Medida (ng/ml)
1	1/1	50,70	50,70
	1/2	25,35	24,58
	1/4	12,67	11,96
	1/8	6,33	6,49
	1/16	3,16	3,26
	1/32	1,58	1,48
	1/64	0,79	0,62

Las muestras fueron diluidas con el calibrador cero.

TEST DE RECUPERACIÓN			
Muestra	3 α -Diol G añadido (ng/ml)	3 α -Diol G Recuperado (ng/ml)	Recuperado (%)
Suero	50	48,4	96,8
	20	21,3	106,0
	10	9,5	95,0
	5	4,9	98,0

E. **Tiempo de espera entre la dispensación del último calibrador y la de la muestra**

Como se muestra a continuación la precisión del ensayo se mantiene incluso en el caso de dispensar la muestra 20 minutos después de haberse adicionado el calibrador a los tubos cubiertos.

TIEMPO DE ESPERA		
Suero (ng/ml)	0'	20'
Suero 1	2,92	2,90
Suero 2	9,60	9,59

XIV. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

- Si los resultados obtenidos para el Control 1 y/o Control 2 no están dentro del rango especificado en la etiqueta del vial, los resultados obtenidos no podrán ser utilizados a no ser que se pueda dar una explicación convincente de dicha discrepancia
- Si es conveniente, - cada laboratorio puede utilizar sus propios pools de controles, lo cuales se guardan en alícuotas congeladas. No congelar y descongelar más de dos veces.
- De acuerdo con nuestros conocimientos, no existe ninguna preparación de referencia internacional de este parámetro.

XV. INTERVALOS DE REFERENCIA

Población		Rango Absoluto (ng/ml)	Media (ng/ml)
Mujeres	Premenopausia	0,3 - 7,9	1,9
	Postmenopausia	0,1 - 5,9	1,5
	Hirsutias	1,6 - 9,3	4,6
Hombres		1,0 - 23,6	6,4

XVI. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Seguridad
Para uso solo en diagnóstico in vitro.
Este kit contiene I¹²⁵ (vida media : 60 días) emisor de rayos X (28 keV) y de rayos γ (35.5 keV) ionizantes.
Este producto radiactivo solo puede ser manejado y utilizado por personas autorizadas; la compra, almacenaje, uso y cambio de productos radiactivos están sujetos a la legislación del país del usuario. En ningún caso el producto deberá ser suministrado a humanos y animales.
Los componentes de sangre humana utilizados en este kit han sido testados por métodos aprobados por la CEE y/o la FDA dando negativo a HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 y 2. No se conoce ningún método que asegure que los derivados de la sangre humana no transmitan hepatitis, SIDA ó otras infecciones. Por lo tanto el manejo de los reactivos y muestras se hará de acuerdo con los procedimientos de seguridad locales.
Todos los productos animales y derivados han sido obtenidos a partir de animales sanos. Componentes bovinos originales de países donde BSE no ha sido informado. Sin embargo, los componentes conteniendo sustancias animales deberán ser consideradas como potencialmente infecciosas.
Evitar cualquier contacto de los reactivos con la piel (azida sódica como conservante). La azida en este kit puede reaccionar con el plomo y cobre de las cañerías y producir azidas metálicas altamente explosivas. Durante el proceso de lavado, hacer circular mucha cantidad de agua por el sumidero para evitar el almacenamiento de la azida.

No fumar, beber, comer ó utilizar cosméticos en el área de trabajo. No pipetear con la boca. Utilizar ropa de protección y guantes. Todo el manejo de producto radiactivo se hará en una área señalizada, diferente de la de paso regular. Deberá de utilizarse un libro de registros de productos radiactivos utilizados. El material de laboratorio, vidrio que podría estar contaminado radiactivamente deberá de descontaminarse para evitar la contaminación con otros isótopos. Cualquier derramamiento radiactivo deberá ser limpiado de inmediato de acuerdo con los procedimientos de seguridad. Los desperdicios radiactivos deberán ser almacenados de acuerdo con las regulaciones y normativas vigentes de la legislación a la cual pertenezca el laboratorio. El ajustarse a las normas básicas de seguridad radiológica facilita una protección adecuada.

XVII. BIBLIOGRAFIA

1. RITTMASER R.S. *et al.* (1988)
Androstanediol Glucuronide Isomers in Normal Men and Women and in Men infused with labelled Dihydrotestosterone.
JCE & M., 66, 1, 212-216.

2. RAO P.N. *et al.* (1987)
Isolation and Identification of Androstanediol Glucuronide from Human Plasma.
J. Steroid Biochem., 28, 5, 565-569.

3. HORTON R. *et al.* (1982)
3 α ,17 β -Androstanediol Glucuronide in plasma.
J. Clin. Invest., 69, 1203-1206.

4. JOURA E.A. *et al.* (1996)
Serum 3 α -androstanediol glucuronide is decreased in nonhirsute women with acne vulgaris.
Fertility and Sterility, 66, 6, 1033-1035.

5. GILAD S. *et al.* (1994)
Assesment of 5 α -reductase activity in hirsute women: comparison of serum androstanediol glucuronide with urinary androsterone and aetiocholanolone excretion.
Clinical Endocrinology, 40, 459-464.

6. THOMPSON D.L. *et al.* (1990)
Androsterone Glucuronide is a marker of adrenal hyperandrogenism in hirsute women.
Clinical Endocrinology, 32, 283-292.

XVIII. RESUMO DO PROTOCOLO

	CUENTAS TOTALES (µl)	CALIBRADO RES (µl)	MUESTRA(S) CONTROL(S) (µl)
Calibradores (0 al 5)	-	100	-
Muestras, controles	-	-	100
Trazador	500	500	500
Incubación	2 horas a T.A. con agitación continua		
Separación	-	aspirar	
Solución de Lavado	-	2,0 ml	
Separación	-	aspirar	
Solución de Lavado	-	2,0 ml	
Separación	-	aspirar	
Contaje	Contar los tubos durante 60 segundos		

DIAsource Catalogo Nr : KIP0151	P.I. Numero : 1701001/es	Revisión nr : 110608/1
------------------------------------	-----------------------------	---------------------------



Leia todo o protocolo antes de utilizar.

3 α -Diol G-RIA-CT

I. UTILIZAÇÃO PREVISTA

Radioimunoensaio para adeterminação quantitativa *in vitro* do 5 α -Androstane-3 α -17 β -Diol-Glucuronido (3 α -Diol G) humano no soro e no plasma.

II. INFORMAÇÕES GERAIS

- A. Nome do proprietário : DIAsource-Kit 3 α -Diol G-RIA-CT
- B. Número do catálogo : KIP0151 : 96 testes
- C. Produzido por : DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Bélgica.

Para obter informações sobre aquisição ou assistência técnica , contacte :
Bélgica Tel : +32 (0)67 88.99.99 Fax : +32 (0)67 88.99.96
Ou o representante local

III. SIGNIFICADO CLÍNICO

O 5 α -Androstano-3 α -17 β -Diol-Glucuronido (3 α -Diol G) é um esteroíde C19. É principalmente produzido como um metabolito da testosterona e da dihidrotestosterona (DHT). É largamente produzido nos tecidos alvo periféricos, tais com a pele, especialmente em volta dos folículos pilosos. A estimulação pilosa, por elevadas quantidades de 3 α -Diol G, leva à excessiva formação de pêlo – notória em áreas onde não existem normalmente pêlos nas mulheres.

Nos últimos anos surgiu o interesse pela determinação deste esteroíde, no estudo do hirsutismo idiopático feminino.

De todos os esteroídes precursores do 3 α -Diol G, nomeadamente a dehidroepiandrosterona (DHEA), dehidroepiandrosterona sulfato (DHEAS), DHT androstenediona e testosterona, apenas se demonstrou o aumento do 3 α -Diol G com o hirsutismo e a sua diminuição com o tratamento. Esta correlação foi também demonstrada em doentes com ovários poliquísticos.

As determinações do 3 α -Diol G são então manifestamente úteis, na monitorização do progresso do tratamento do hirsutismo idiopático e em mulheres com ovários poliquísticos.

Em doentes diabéticos, de ambos os sexos com tratamento pela ciclosporina A, têm apresentado valores de 3 α -Diol G acima do normal, um efeito secundário que resulta no aparecimento de pêlo, em áreas onde previamente não existia.

IV. PRINCÍPIO DO MÉTODO

Uma quantidade fixa de 3α-Diol G marcado com ¹²⁵I compete com o 3α-Diol G a ser medido, que esteja presente na amostra ou no calibrador, para uma quantidade fixa de locais de anticorpo, que é imobilizado nas paredes dos tubos de poliestireno. Nem a extracção nem a cromatografia são necessárias, devido à elevada especificidade dos anticorpos revestidos. Após uma incubação de 2 horas à temperatura ambiente (TA), num agitador, a reacção de competição termina com a operação de aspiração. A seguir os tubos são lavados com 2ml de solução de lavagem de trabalho e novamente aspirados. Traça-se uma curva de calibração e as concentrações de 3α-Diol G nas amostras são determinadas por interpolação da dose a partir da curva de calibração.

V. REAGENTES FORNECIDOS

Reagentes	Kit 96 Testes	Código de cor	Reconstituição			
 Tubos revestidos com anti 3α-Diol G	2 x 48	Cinzentos	Pronto para utilizar			
<table border="1"><tr><td>Ag</td><td>¹²⁵I</td></tr></table> Marcador: 3α-Diol G marcado com ¹²⁵ I (grau HPLC) em tampão com caseína bovina (1%) e azida (<0,1%)	Ag	¹²⁵ I	1 recipiente 53 ml 185 kBq	vermelho	Pronto para utilizar	
Ag	¹²⁵ I					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Calibrador Zero em soro bovino, timol (<0,1%) e gentamicina (<0,1%)	CAL	0	1 recipiente liofilizado	amarelo	Adicione 2 ml de água destilada	
CAL	0					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Calibradores 3α-Diol G - N = 1 para 5 (ver os valores exactos nos rótulos do recipiente) no soro bovino, timol (<0,1%) e gentamicina (<0,1%)	CAL	N	5 recipientes liofilizados	amarelo	Adicione 0,5 ml de água destilada	
CAL	N					
<table border="1"><tr><td>WAS</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Solução de lavagem (Tampão fosfato)	WAS	SOLN	CONC	1 recipiente 50 ml	castanho	Dilua 25 x com água destilada (use um agitador magnético).
WAS	SOLN	CONC				
<table border="1"><tr><td>CONTR</td><td>N</td></tr></table> Controlos - N = 1 ou 2 No soro humano e timol (<0,1%)	CONTR	N	2 recipientes liofilizados	prateado	Adicione 0,5 ml de água destilada	
CONTR	N					

Nota : Use o calibrador zero para diluições de amostras.

VI. MATERIAL NÃO FORNECIDO

O seguinte material é necessário, mas não fornecido com o kit:

- 1. Água destilada
- 2. Pipetas automáticas: 100 µl, 500 µl e 2 ml (recomenda-se a utilização de pipetas precisas, com pontas descartáveis)
- 3. Misturador de vortex
- 4. Agitador magnético
- 5. Agitador de tubos (700 rpm)
- 6. Pipeta automática de 5 ml para lavagem (tipo Cornwall)
- 7. Sistema de aspiração (opcional)
- 8. Qualquer contador gamma capaz de medir ¹²⁵I pode ser utilizado (min alcance de 70%).

VII. PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

- A. **Calibradores** : Reconstitua o calibrador zero com 2,0 ml de água destilada e outros calibradores com 0,5 ml.
- B. **Controlos** : Reconstitua os controlos com 0,5 ml de água destilada.
- C. **Solução de lavagem de trabalho** : Prepare um volume adequado de Solução de lavagem de trabalho ao adicionar 24 volumes de água destilada para 1 volume de solução de lavagem (25x). Use um agitador magnético para homogeneizar. Rejeite a solução não utilizada no final do dia.

VIII. ARMAZENAMENTO E PRAZO DE VALIDADE DOS REAGENTES

- Antes de abrir e reconstituir, todos os componentes do kit são estáveis até ao final do prazo de validade, indicado no rótulo desde que mantido entre 2 to 8°C.

- Após reconstituição, os calibradores e os controlos são estáveis durante 1 semana entre 2 a 8°C. Durante períodos de armazenamento mais longos, devem ser feitas alíquotas e mantidas a -20°C.
- A solução de lavagem de trabalho deve ser feita e utilizada no mesmo dia.
- Depois da 1ª utilização o marcador é estável até final do prazo de validade, desde que mantido no recipiente original, bem fechado entre 2 to 8°C.
- Alterações no aspecto dos reagentes do kit podem indicar instabilidade ou degradação.

IX. RECOLHA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

- Amostras de soro ou plasma devem ser mantidas entre 2-8°C.
- Se a análise não for realizada em 24 hrs, recomenda-se conservar a -20°C.
- Evite ciclos de congelamento e descongelamento sucessivos.
- O plasma heparinizado apresenta resultados 15 % mais baixos do que o soro.
Y (plasma Hep.) = 0,86 x (soro) + 0,52 r = 0,96 n = 13
- O plasma com EDTA tem resultados 25 % mais baixos do que o soro :
Y (plasma com EDTA) = 0,74 x (soro) + 0,52 r = 0,97 n = 13

X. PROCEDIMENTO

- A. **Notas de manipulação**
Não utilize o kit ou qualquer componente depois da expiração do prazo de validade. Não misture componentes de diferentes lotes Antes de utilizar todos os componentes devem estar à temperatura ambiente (TA). Misture bem os reagentes e as amostras, por agitação ou rotação suaves. Para evitar contaminações cruzadas utilize uma ponta de pipeta limpa e descartável, para adição de cada componente. Pipetas de alta precisão ou equipamento automático de pipetagem melhoram a precisão. Respeite os períodos de incubação. Prepare uma curva de calibração para cada análise, não utilize dados de análises prévias.
- B. **Procedimento**
 1. Rotule os tubos revestidos em duplicado, para cada calibrador, amostra, controlo. Para a determinação das contagens totais, rotule 2 tubos normais.
 2. Agite ligeiramente no vortex calibradores, amostras e controlos e dispense 100µl de cada, para os tubos respectivos.
 3. Dispense 0,5 ml de 3α-Diol G marcado com I ¹²⁵ para cada tubo, incluindo os tubos normais para as contagens totais.
 4. Agite suavemente o suporte dos tubos, para libertar possíveis bolhas de ar.
 5. Incube durante 2 horas à TA com agitação contínua (700 rpm).
 6. Aspire o conteúdo de cada tubo (excepto os das contagens totais). Assegure-se que a ponta plástica do aspirador atinge o fundo do tubo revestido, para remover todo o líquido.
 7. Lave os tubos com 2 ml de solução de lavagem de trabalho (excepto os das contagens totais) e aspire. Evite formação de espuma quando adiciona a solução de lavagem.
 8. Lave novamente os tubos com 2 ml de solução (excepto os das contagens totais) e aspire.
 9. Depois da última lavagem, deixe os tubos direitos durante 2 minutos e seguidamente aspire a última porção de líquido.
 10. Conte os tubos num contador gamma durante 60 segundos.

XI. CÁLCULO DOS RESULTADOS

- 1. Calcule a média das determinações em duplicado, rejeitando os “outliers” (casos marginais) óbvios.
- 2. Calcule a radioactividade de ligação como uma percentagem da ligação determinada no ponto do calibrador zero (0), de acordo com a fórmula seguinte:

$$B/B0(\%) = \frac{\text{Contagens (Calibrador ou amostra)}}{\text{Contagens (calibrador Zero)}} \times 100$$

- 3. Utilizando um papel de gráfico semi-logarítmico de 3 ciclos ou logit-log trace os valores (B/B0(%)) para cada ponto de calibração como uma função da concentração do 3α-Diol G em cada ponto.
- 4. Os métodos informáticos também podem ser utilizados para construir a curva de calibração. Se o processamento dos resultados for automático, recomenda-se a curva com função de ajuste de “4 parâmetros”.
- 5. Por interpolação dos valores das amostras (B/B0(%)), determine as concentrações de 3α-Diol G das amostras da curva de referência.
- 6. Para cada análise, a percentagem de marcador total ligado na ausência de 3α-Diol G (B0/T) marcado, deve ser verificada.

XII. DADOS TÍPICOS

Os dados seguintes são apenas para exemplificação e nunca devem ser utilizados em detrimento dos dados reais da curva de calibração.

3 α -Diol G		cpm	B/Bo (%)
Contagens total		35967	
Calibrador	0,0 ng/ml	13912	100,0
	0,2 ng/ml	11443	82,2
	1,2 ng/ml	8385	60,3
	6,0 ng/ml	4611	33,1
	25,0 ng/ml	1796	12,9
	75,0 ng/ml	960	6,9

XIII. DESEMPENHO E LIMITES

- A. **Limite de detecção**
Foram analisados 20 calibradores zero , juntamente com um conjunto de outros calibradores.
O limite de detecção, definido como a concentração aparente, 2 DP abaixo das contagens médias com zero ligações, foi de 0,05 ng/ml.
- B. **Especificidade**

Composto	Reactividade-cruzada (%)
5 α -Androstano-3 α -17 β -diolG	100,00
5 α -Androstano-3 α -17 β -diol	10,69
5 α -Androstano-3 α -17 β -diol-3Glucuronido	5,86
5 α -Dihidrotosterona Glucuronido	1,75
Progesterona	0,03
Testosterona glucuronido	0
Testosterona	0
11 β -hidroxitesterona	0
5 α -Dihidrotesterona	0
5 β -Dihidrotesterona	0
Cortisol	0
Dehidroepiandrosterona	0
Estrona	0
Androstenediona	0
5-Androstena-3 β -17 β -diol	0
17 β -Estradiol	0

Nota : Esta tabela mostra a reactividade-cruzada para o anti 3 α -Diol G.

- C. **Precisão**
- PRECISÃO INTRA-ENSAIO

PRECISÃO INTER-ENSAIO

Soro	N	<X> $\pm$ DP (ng/ml)	CV (%)	Soro	N	<X> $\pm$ DP (ng/ml)	CV (%)
A	20	2,64 $\pm$ 0,15	5,7	A	10	2,76 $\pm$ 0,17	6,4
B	20	10,11 $\pm$ 0,50	4,9	B	10	10,32 $\pm$ 0,70	7,2

DP: Desvio Padrão; CV: Coeficiente de variação

- D. **Exactidão**
- TESTE DE DILUIÇÃO

Amostra	Diluição	Conc. teórico. (ng/ml)	Conc. medida (ng/ml)
1	1/1	50,70	50,70
	1/2	25,35	24,58
	1/4	12,67	11,96
	1/8	6,33	6,49
	1/16	3,16	3,26
	1/32	1,58	1,48
	1/64	0,79	0,62

As amostras foram diluídas com calibrador zero.

TESTE DE RECUPERAÇÃO			
Amostra	3 α -Diol G adicionado (ng/ml)	3 α -Diol G recuperado (ng/ml)	Recuperação (%)
Soro	50	48,4	96,8
	20	21,3	106,0
	10	9,5	95,0
	5	4,9	98,0

- E. **Intervalo de atraso de tempo entre o ultimo calibrador e a dispensa de amostra**
Conforme demonstrado a seguir, os resultados das analyses continuam precisos, mesmo quando é dispensada uma amostra 20 minutos depois da adição do calibrador aos tubos revestidos.

INTERVALO DE ATRASO DE TEMPO		
Soro (ng/ml)	0'	20'
Soro 1	2,92	2,90
Soro 2	9,60	9,59

- XIV. **CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO**
- Se os resultados obtidos para o controlo 1 e/ou controlo 2 não estão dentro do intervalo especificado no rótulo do recipiente, os resultados não podem ser utilizados, a menos que seja dada uma explicação satisfatória para a discrepância encontrada.

- Se for desejável, cada laboratório pode fazer os seus próprios conjuntos de amostras de controlo, que podem ser mantidas congeladas em alíquotas. Não faça ciclos de congelação/descongelação mais do que 2 vezes.

- Não existe material de referência internacional para este parâmetro, que seja do nosso conhecimento

XV. INTERVALOS DE REFERÊNCIA

População		Intervalo absoluto (ng/ml)	Média (ng/ml)
Sexo feminino	Pré-menopausa	0,3 - 7,9	1,9
	Pós-menopausa	0,1 - 5,9	1,5
	Hirsutismo	1,6 - 9,3	4,6
Sexo masculino		1,0 - 23,6	6,4

XVI. AVISOS E PRECAUÇÕES

Segurança
Apenas para uso em diagnóstico *in vitro*.
Este kit contém ¹²⁵I (meia-vida: 60 dias), emitindo radiações X (28 keV) e γ (35.5 keV) ionizantes.
Este produto radioactivo pode apenas ser transportado e utilizado por pessoal autorizado: a compra, armazenamento, utilização e troca de produtos radioactivos estão sujeitas à legislação nacional vigente. Em nenhum caso, este produto pode ser administrados a seres humanos ou a animais.
Os componentes de sangue humano incluídos neste kit foram testados por métodos aprovados pela legislação europeia e/ou FDA e dados como negativos para o HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 e 2. Não existe nenhum método, até agora conhecido, que oferece total segurança quanto à impossibilidade de transmissão de hepatite, HIV ou outras infecções, por via do sangue humano. Por isso, deve manipular os reagentes, o soro ou o plasma de acordo com as regras locais de segurança, quanto a materiais potencialmente infecciosos.
Todos os produtos de origem animal e seus derivados foram recolhidos de animias saudáveis. Os componentes bovinos, vieram de países sem casos notificados de BSE. No entanto, todos estes componentes devem ser manipulados como potencialmente infecciosos.
Evite o contacto da pele e mucosas com os reagentes (azida sódica como conservante). A azida pode reagir com o chumbo e o cobre das canalizações e formar compostos explosivos. Rejeitar com abundante quantidade de água corrente para evitar acumulações destes compostos.
Não fume, coma, beba ou aplique cosméticos na area de trabalho. Não pipette com o auxilio da boca. Use vestuário adequado de protecção e luvas. Toda a manipulação readioactiva deve ser efectuada em local próprio e exclusivo para tal. Deve ser mantido no laboratório, um livro de registo para a recepção e armazenamento de material radioactivo. O equipamento do laboratório e equipamento de vidro que possa ser contaminado com radioactividade, deve ser segregado para evitar contaminação cruzada com diferentes isótopos. Qualquer derrame de material radioactivo deve ser imediatamente limpo, de acordo com os procedimentos de radioprotecção. O lixo radioactivo deve ser rejeitado de acordo com a legislação vigente e as regras do laboratório. A adesão às regras básicas da radiosegurança, fornece a protecção adequada.

XVII. BIBLIOGRAFIA

1.

RITTMASER R.S. *et al.* (1988)

Androstanediol Glucuronide Isomers in Normal Men and Women and in Men infused with labelled Dihydrotestosterone.

JCE & M., 66, 1, 212-216.

2.

RAO P.N. *et al.* (1987)

Isolation and Identification of Androstanediol Glucuronide from Human Plasma.

J. Steroid Biochem., 28, 5, 565-569.

3.

HORTON R. *et al.* (1982)

3 α ,17 β -Androstanediol Glucuronide in plasma.

J. Clin. Invest., 69, 1203-1206.

4.

JOURA E.A. *et al.* (1996)

Serum 3 α -androstanediol glucuronide is decreased in nonhirsute women with acne vulgaris.

Fertility and Sterility, 66, 6, 1033-1035.

5.

GILAD S. *et al.* (1994)

Assesment of 5 α -reductase activity in hirsute women: comparison of serum androstanediol glucuronide with urinary androsterone and aetiocholanolone excretion.

Clinical Endocrinology, 40, 459-464.

6.

THOMPSON D.L. *et al.* (1990)

Androsterone Glucuronide is a marker of adrenal hyperandrogenism in hirsute women.

Clinical Endocrinology, 32, 283-292.

XVIII. RESUMO DO PROTOCOLO

	CONTAGENS TOTAIS (µl)	CALIBRA- DORES (µl)	CONTROLO S DAS AMOSTRAS (µl)
Calibradores (0 to 5) Amostras, controlos e marcadores	- - 500	100 - 500	- 100 500
Incubação	2 horas a TA com agitação contínua (700 rpm)		
Separação Solução de lavagem de trabalho Separação Solução de lavagem de trabalho Separação	-	aspirar 2,0 ml aspirar 2,0 ml aspirar	
Contagem	Contar os tubos durante 60 segundos		

Nº do catálogo DIAsource : KIP0151	Nº de P.I.: 1701001/pt	Nº de revisão : 110608/1
---------------------------------------	---------------------------	-----------------------------



Διαβάστε ολόκληρο το πρωτόκολλο πριν από τη χρήση.

3α-Diol G-RIA-CT

I. ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ

Ραδιοανοσοπροσδιορισμός για την *in vitro* ποσοτική μέτρηση του ανθρώπινου 5α-ανδροστένιο-3α-17β-διολ-γλυκουρονιδίου (3α-Diol G) στον ορό και το πλάσμα.

II. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

- A. **Εμπορική ονομασία:** Κιτ 3α-Diol G-RIA-CT της DIASource
- B. **Αριθμός καταλόγου:** KIP0151: 96 προσδιορισμοί
- Γ. **Κατασκευάζεται από την:** DIASource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgium.

Για τεχνική βοήθεια ή πληροφορίες σχετικά με παραγγελίες επικοινωνήστε στα:
Τηλ.: +32 (0)67 88.99.99 Φαξ: +32 (0)67 88.99.96

III. ΚΛΙΝΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

Το 5α-ανδροστένιο-3α-17β-διολ-γλυκουρονίδιο (3α-Diol G) είναι ένα στεροειδές C19. Παράγεται κυρίως ως μεταβολίτης της τεστοστερόνης και της διδροτεστοστερόνης (DHT). Παράγεται σε σημαντικό βαθμό σε περιφερικούς ιστούς-στόχους όπως το δέρμα, ειδικά γύρω από τα τριχοθυλάκια. Η διέγερση από μεγάλες ποσότητες του 3α-Diol G, οδηγεί σε υπερβολικό σχηματισμό τριχών – ιδιαίτερα εμφανή σε σημεία όπου δεν υπάρχουν φυσιολογικά τρίχες σε γυναίκες.

Τα τελευταία έτη το ενδιαφέρον για τη μέτρηση του στεροειδούς αυτού έχει αυξηθεί μεταξύ των κλινικών ερευνητών που μελετούν γυναίκες που πάσχουν από ιδιοπαθή δασυτριχισμό.

Μεταξύ των στεροειδών που είναι γνωστό ότι είναι πρόδρομοι για το 3α-Diol G, δηλαδή της δεϋδροεπιανδροστερόνης (DHEA), της θεικής δεϋδροεπιανδροστερόνης (DHEAS), της DHT ανδροστενοδιόνης και της τεστοστερόνης, μόνο το 3α-Diol G έχει δείχθει ότι αυξάνεται με το δασυτριχισμό και μειώνεται με τη θεραπεία. Η συσχέτιση αυτή έχει επίσης καταδειχθεί σε ασθενείς με πολυκυστικές ωθήκες (PCO).

Οι προσδιορισμοί 3α-Diol G έχουν επομένως αποδειχθεί χρήσιμοι ως δείκτης με διάφορους τρόπους, συμπεριλαμβανομένης της παρακολούθησης της προόδου της θεραπείας του ιδιοπαθούς δασυτριχισμού και γυναικών με πολυκυστικές ωθήκες.

Επιπλέον, διαβητικοί ασθενείς, τόσο άνδρες όσο και γυναίκες που ακολουθούν θεραπεία με κυκλοσπορίνη Α, έχουν εμφανίσει επίπεδα του 3α-Diol G πάνω από το φυσιολογικό, μια παρενέργεια που έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση τριχών σε προηγουμένως άτριχες περιοχές του σώματος.

IV. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Μια σταθερή ποσότητα 3α-Diol G σημασμένου με ¹²⁵I ανταγωνίζεται με το 3α-Diol G που θα μετρηθεί, το οποίο υπάρχει στο δείγμα ή στο βαθμονομητή, για σταθερή ποσότητα θέσεων αντισωμάτων που είναι ακινητοποιημένα στο τοίχωμα ενός σωληναρίου από πολυστυρένιο. Δεν απαιτείται εκχύλιση ή χρωματογραφία λόγω της υψηλής ειδικότητας των επιστρωμένων αντισωμάτων. Μετά από επώαση σε συσκευή ανάδευσης διάρκειας 2 ωρών σε θερμοκρασία δωματίου, η αντίδραση ανταγωνισμού τερματίζεται με ένα βήμα αναρρόφησης. Τα σωληνάρια κατόπιν πλένονται δύο φορές με 2 ml διαλύματος πλύσης εργασίας και αναρροφούνται πάλι. Παριστάνεται γραφικά μια καμπύλη βαθμονόμησης και προσδιορίζονται οι συγκεντρώσεις του 3α-Diol G των δειγμάτων με αναγωγή συγκεντρώσεων από την καμπύλη βαθμονόμησης.

V. ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Αντιδραστήρια	Κιτ 96 προσδιορισ- μών	Χρωμα- τικός κωδικός	Ανασύσταση
Σωληνάρια επιστρωμένα με αντι 3α-Diol G	2 x 48	γκρι	Έτοιμο για χρήση
Ag ¹²⁵I ΙΧΝΗΘΕΤΗΣ: 3α-Diol G σημασμένο με ¹²⁵I (κατηγορίας HPLC) σε ρυθμιστικό διάλυμα με βόεια καζείνη και αζίδιο (<0,1%)	1 φιαλίδιο 53 ml 185 kBq	κόκκινο	Έτοιμο για χρήση
CAL 0 Μηδενικός βαθμονομητής σε βόειο ορό, θυμόλη (<0,1%) και γενταμικίνη (<0,1%)	1 φιαλίδιο λυοφιλοποι- ημένο	κίτρινο	Προσθέστε 2 ml απεσταγμένου νερού
CAL N Βαθμονομητές 3α-Diol G - N = 1 έως 5 (δείτε τις ακριβείς τιμές πάνω στις ετικέτες των φιαλιδίων) σε βόειο ορό, θυμόλη (<0,1%) και γενταμικίνη (<0,1%)	5 φιαλίδια λυοφιλοποι- ημένο	κίτρινο	Προσθέστε 0,5 ml απεσταγμένου νερού
WASH SOLN CONC Διάλυμα πλύσης (Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών)	1 φιαλίδιο 50 ml	καφέ	Αραιώστε 25 x με απεσταγμένο νερό (χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα).
CONTROL N Οροί ελέγχου - N = 1 ή 2 σε ανθρώπινο ορό και θυμόλη (<0,1%)	2 φιαλίδια λυοφιλοποι- ημένο	ασημί	Προσθέστε 0,5 ml απεσταγμένου νερού

Σημείωση: Χρησιμοποιείτε το μηδενικό βαθμονομητή για αραιώσεις δειγμάτων.

VI. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

Τα ακόλουθα υλικά απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται στο κιτ:

1. Απεσταγμένο νερό
2. Πιπέτες για διανομή: 100 μl, 500 μl και 2 ml (συνιστάται η χρήση πιπετών ακριβείας με αναλώσιμα πλαστικά ρύγχη)
3. Αναμεικτής στροβιλισμού (τύπου vortex)
4. Μαγνητικός αναδευτήρας
5. Σύσκευή ανάδευσης σωληναρίων (700 rpm)
6. Αυτόματη σύριγγα των 5 ml (τύπου Cornwall) για πλύση
7. Σύστημα αναρρόφησης (προαιρετικό)
8. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιοσδήποτε μετρητής γ ακτινοβολίας με δυνατότητα μέτρησης της ¹²⁵I (ελάχιστη απόδοση 70%).

VII. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ

- A. **Βαθμονομητές:** Ανασυστήστε το μηδενικό βαθμονομητή με 2,0 ml απεσταγμένου νερού και άλλους βαθμονομητές με 0,5 ml απεσταγμένου νερού.
- B. **Οροί ελέγχου:** Ανασυστήστε τους ορούς ελέγχου με 0,5 ml απεσταγμένου νερού.
- Γ. **Διάλυμα πλύσης εργασίας:** Προετοιμάστε επαρκή όγκο διαλύματος πλύσης εργασίας με προσθήκη 24 όγκων απεσταγμένου νερού σε 1 όγκο διαλύματος πλύσης (25x). Χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα για την ομογενοποίηση. Απορρίψτε το μη χρησιμοποιημένο διάλυμα πλύσης εργασίας στο τέλος της ημέρας.

VIII. ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΛΗΞΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- Πριν από το άνοιγμα ή την ανασύσταση, όλα τα συστατικά του κιτ παραμένουν σταθερά έως την ημερομηνία λήξης, η οποία αναγράφεται στην ετικέτα, εφόσον διατηρούνται σε θερμοκρασία 2 έως 8° C.
- Μετά την ανασύσταση, οι βαθμονομητές και οι οροί ελέγχου παραμένουν σταθεροί για μία εβδομάδα σε θερμοκρασία 2 έως 8° C. Για μεγαλύτερες περιόδους φύλαξης, πρέπει να σχηματίζονται κλάσματα/δόσεις μιας χρήσης και να διατηρούνται στους -20° C.
- Φρέσκο, παρασκευασμένο διάλυμα πλύσης εργασίας θα πρέπει να χρησιμοποιείται την ίδια ημέρα.
- Μετά την πρώτη χρήση του, ο ιχνηθέτης παραμένει σταθερός έως την ημερομηνία λήξης, εφόσον διατηρείται στο αρχικό, ερμητικά κλειστό φιαλίδιο σε θερμοκρασία 2 έως 8° C.
- Τυχόν μεταβολές της φυσικής εμφάνισης των αντιδραστηρίων του κιτ ενδέχεται να υποδηλώνουν αστάθεια ή αλλοίωση.

IX. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

- Τα δείγματα ορού ή πλάσματος πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία 2-8° C.
- Εάν η εξέταση δεν πραγματοποιηθεί εντός 24 ωρών, συνιστάται η φύλαξη στους -20° C.
- Αποφεύγετε τη διαδοχική κατάψυξη και απόψυξη.
- Το ηπαρινισμένο πλάσμα αποδίδει 15% χαμηλότερα αποτελέσματα από τον ορό:
 $Y \text{ (Ηπ. πλάσμα)} = 0,86 \times (\text{ορός}) + 0,52 \quad r = 0,96 \quad n = 13$
- Το πλάσμα με EDTA αποδίδει 25% χαμηλότερα αποτελέσματα από τον ορό:
 $Y \text{ (πλάσμα με EDTA)} = 0,74 \times (\text{ορός}) + 0,52 \quad r = 0,97 \quad n = 13$

X. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- A. **Σημειώσεις σχετικά με το χειρισμό**
Μη χρησιμοποιείτε το κιτ ή τα συστατικά μετά την ημερομηνία λήξης. Μη αναμειγνύετε υλικά από διαφορετικές παρτίδες κιτ. Φέρετε όλα τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση. Αναμειξτε καλά όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα με απαλή ανακίνηση ή ανάδευση. Χρησιμοποιείτε ένα καθαρό αναλώσιμο ρύγχος πιπέτας για την προσθήκη κάθε διαφορετικού αντιδραστηρίου και δείγματος προκειμένου να αποφύγετε την επιμόλυνση. Η ακρίβεια βελτιώνεται με χρήση πιπετών υψηλής ακριβείας ή αυτοματοποιημένου εξοπλισμού διανομής με πιπέτες. Τηρείτε τους χρόνους επώασης. Προετοιμάστε μια πρότυπη καμπύλη για κάθε ανάλυση και μη χρησιμοποιείτε δεδομένα από προηγούμενες αναλύσεις.

- B. **Διαδικασία**
1. Σημάνετε τα επιστρωμένα σωληνάρια εις διπλούν για κάθε βαθμονομητή, δείγμα, ορό ελέγχου. Για τον προσδιορισμό των μετρήσεων του ιχνηθέτη ¹²⁵I ("total"), σημάνετε 2 κοινά (μη επιστρωμένα) σωληνάρια.
 2. Αναμειξτε για λίγο (με αναμεικτή στροβιλισμού τύπου vortex) βαθμονομητές, δείγματα και ορούς ελέγχου και διανείμετε 100 μl από έκαστο σε αντίστοιχα σωληνάρια.
 3. Διανείμετε 0,5 ml 3α-Diol G σημασμένου με ¹²⁵I σε κάθε σωληνάριο, συμπεριλαμβανοντας τα μη επιστρωμένα σωληνάρια που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ¹²⁵I ("total").
 4. Ανακινήστε απαλά τη βάση στήριξης των σωληναρίων.
 5. Επωάστε επί 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου με συνεχή ανάδευση (700 rpm).
 6. Αναρροφήστε το περιεχόμενο κάθε σωληναρίου (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ¹²⁵I ["total"]). Βεβαιωθείτε ότι το πλαστικό ρύγχος του αναρροφητή φθάνει στον πυθμένα του επιστρωμένου σωληναρίου προκειμένου να αφαιρεθεί όλη η ποσότητα του υγρού.
 7. Πλύνετε τα σωληνάρια με 2 ml διαλύματος πλύσης εργασίας (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ¹²⁵I ["total"]) και αναρροφήστε. Αποφύγετε το σχηματισμό αφρού κατά τη διάρκεια της προσθήκης του διαλύματος πλύσης εργασίας.
 8. Πλύνετε πάλι τα σωληνάρια με 2 ml διαλύματος πλύσης εργασίας (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ¹²⁵I ["total"]) και αναρροφήστε.
 9. Μετά την τελευταία πλύση, αφήστε τα σωληνάρια να σταθούν σε όρθια θέση για δύο λεπτά και αναρροφήστε τη σταγόνα υγρού που απομένει. Μετρήστε τα σωληνάρια σε μετρητή γ ακτινοβολίας για 60 δευτερόλεπτα.

XI. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

1. Υπολογίστε τη μέση τιμή των διπλών προσδιορισμών και απορρίψτε τις εμφανείς μη αποδεκτές τιμές.
2. Υπολογίστε τη δεσμευμένη ραδιενέργεια ως ποσοστό της δέσμευσης που προσδιορίζεται στο σημείο μηδενικού βαθμονομητή (0) σύμφωνα με τον ακόλουθο τύπο:

$$B/B0 (\%) = \frac{\text{Μετρήσεις (Βαθμονομητής ή δείγμα)}}{\text{Μετρήσεις (Μηδενικός βαθμονομητής)}} \times 100$$

3. Με χρήση ημιλογαριθμικού χαρτιού γραφήματος ή χαρτιού γραφήματος logit-log 3 κύκλων, παραστήστε γραφικά τις τιμές (B/B0(%)) για κάθε σημείο βαθμονομητή ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του 3α-Diol G για κάθε σημείο βαθμονομητή.
4. Για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν επίσης μέθοδοι με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή. Εάν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί αυτόματη επεξεργασία αποτελεσμάτων, συνιστάται προσαρμογή καμπύλης συνάρτησης “4 παραμέτρων”.
5. Με αναγωγή των τιμών των δειγμάτων (B/B0 (%)), προσδιορίστε τις συγκεντρώσεις 3α-Diol G των δειγμάτων από την καμπύλη αναφοράς.
6. Για κάθε προσδιορισμό, πρέπει να ελέγχεται το ποσοστό του συνολικού ιχνηθέτη που δεσμεύεται εν τη απουσία μη σημασμένου 3α-Diol G (B0/T).

XII. ΤΥΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα ακόλουθα δεδομένα προορίζονται μόνο ως παράδειγμα και δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται ποτέ αντί της καμπύλης βαθμονόμησης πραγματικού χρόνου.

3α-Diol G		cpm	B/B0 (%)
Κρούσεις του ιχνηθέτη ¹²⁵ I ("total")		35967	
Βαθμονομητής	0,0 ng/ml	13912	100,0
	0,2 ng/ml	11443	82,2
	1,2 ng/ml	8385	60,3
	6,0 ng/ml	4611	33,1
	25,0 ng/ml	1796	12,9
	75,0 ng/ml	960	6,9

XIII. ΑΠΟΔΟΣΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

- A. Όριο ανίχνευσης
- Μετρήθηκαν είκοσι μηδενικοί βαθμονομητές μαζί με ένα σύνολο άλλων βαθμονομητών.
- Το όριο ανίχνευσης, οριζόμενο ως η φαινομενική συγκέντρωση δύο τυπικών αποκλίσεων κάτω από τις μέσες μετρήσεις σε μηδενική δέσμευση, ήταν 0,05 ng/ml.

B. Ειδικότητα

Ένωση	Διασταυρούμενη αντιδραστικότητα (%)
5α-ανδροστένιο-3α-17β-διόλη-G	100,00
5α-ανδροστένιο-3α-17β-διόλη	10,69
5α-ανδροστένιο-3α-17β-διόλη-3γλκυκουρονίδιο	5,86
Γλυκουρονίδιο 5α-διυδροτεστοστερόνης	1,75
Προγεστερόνη	0,03
Γλυκουρονίδιο τεστοστερόνης	0
Τεστοστερόνη	0
11β-υδροξυτεστοστερόνη	0
5α-διυδροτεστοστερόνη	0
5β-διυδροτεστοστερόνη	0
Κορτιζόλη	0
Δεϋδροεπιανδροστερόνη	0
Οιστρόνη	0
Ανδροστενοδιόνη	0
5-ανδροστένιο-3β-17β-διόλη	0
17β-Οιστραδιόλη	0

Σημείωση: Στον πίνακα αυτό παρουσιάζεται η διασταυρούμενη αντιδραστικότητα για το αντι-3α-Diol G.

Γ. Ακρίβεια

ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΙΔΙΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ

ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΜΕΤΑΞΥ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΩΝ

Ορός	N	<X> ± T.A. (ng/ml)	Σ.Λ. (%)	Ορός	N	<X> ± T.A. (ng/ml)	Σ.Λ. (%)
A	20	2,64 ± 0,15	5,7	A	10	2,76 ± 0,17	6,4
B	20	10,11 ± 0,50	4,9	B	10	10,32 ± 0,70	7,2

T.A.: Τυπική απόκλιση, Σ.Λ.: Συντελεστής διακύμανσης

Δ. Ορθότητα

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΡΑΙΩΣΗΣ			
Δείγμα	Αραίωση	Θεωρητική συγκέντρωση (ng/ml)	Μετρηθείσα συγκέντρωση (ng/ml)
Ορός	1/1	50,70	50,7
	1/2	25,35	24,58
	1/4	12,67	11,96
	1/8	6,33	6,49
	1/16	3,16	3,26
	1/32	1,58	1,48
	1/64	0,79	0,62

Τα δείγματα αραιώθηκαν με το μηδενικό βαθμονομητή.

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ			
Δείγμα	Προστιθέμενο 3α-Diol G (ng/ml)	Ανακτηθέν 3α-Diol G (ng/ml)	Ανακτηθέν (%)
Ορός	50	48,4	96,8
	20	21,3	106,0
	10	9,5	95,0
	5	4,9	98,0

- E. Μεσοδιάστημα μεταξύ της διανομής τελευταίου βαθμονομητή και δείγματος
- Όπως φαίνεται στη συνέχεια, τα αποτελέσματα του προσδιορισμού παραμένουν αξιόπιστα ακόμα και όταν διανέμεται ένα δείγμα 20 λεπτά μετά την προσθήκη του βαθμονομητή στα επιστρωμένα σωληνάρια.

ΜΕΣΟΔΙΑΣΤΗΜΑ		
Ορός (ng/ml)	0'	20'
Ορός 1	2,92	2,90
Ορός 2	9,60	9,59

XIV. ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΣ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

- Εάν τα αποτελέσματα που λαμβάνονται για τον ορό ελέγχου 1 ή/και τον ορό ελέγχου 2 δε βρίσκονται εντός του πεδίου τιμών που καθορίζεται στην ετικέτα του φιαλιδίου, τα αποτελέσματα δεν είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν, εκτός εάν έχει δοθεί ικανοποιητική εξήγηση για την ασυμφωνία.
- Εάν είναι επιθυμητό, κάθε εργαστήριο μπορεί να δημιουργήσει τα δικά του μείγματα δειγμάτων ελέγχου (pools), τα οποία πρέπει να διατηρούνται κατεψυγμένα σε κλάσματα/δόσεις μιας χρήσης. Μην καταψύχετε-αποψύχετε περισσότερο από δύο φορές.
- Από όσο είναι δυνατό να γνωρίζουμε, δεν υπάρχει διεθνές υλικό αναφοράς για την παράμετρο αυτή.

XV. ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Πληθυσμός		Πεδίο απόλυτων τιμών (ng/ml)	Διάμεσος (ng/ml)
Γυναίκες	Προεμμηνοπαυσιακές	0,3 - 7,9	1,9
	Μετεμμηνοπαυσιακές	0,1 - 5,9	4,6
	Δασύτριχες	1,6 - 9,3	6,4
Ανδρες		1,0 - 23,6	

XVI. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

Ασφάλεια

Μόνο για διαγνωστική χρήση in vitro.
Το κιτ αυτό περιέχει το ¹²⁵I (Χρόνος ημιζωής: 60 ημέρες), μια ραδιενεργή ουσία η οποία εκπέμπει ιονίζουσα ακτινοβολία Χ (28 keV) και γ (35.5 keV). Αυτό το ραδιενεργό προϊόν είναι δυνατό να μεταφερθεί και να χρησιμοποιηθεί μόνο από εξουσιοδοτημένα άτομα. Η αγορά, φύλαξη, χρήση και ανταλλαγή ραδιενεργών προϊόντων υπόκεινται στη νομοθεσία της χώρας του τελικού χρήστη. Σε καμία περίπτωση δεν πρέπει να χορηγείται το προϊόν σε ανθρώπους ή ζώα.
Τα συστατικά ανθρώπινου αίματος που περιλαμβάνονται στο κιτ αυτό έχουν ελεγχθεί με μεθόδους εγκεκριμένες στην Ευρώπη ή/και από τον FDA και έχει διαπιστωθεί ότι είναι αρνητικά ως προς την παρουσία HBsAg, αντι-HCV, αντι-HIV-1 και 2. Καμία γνωστή μέθοδος δεν είναι δυνατό να παρέχει πλήρη διασφάλιση ότι παράγωγα του ανθρώπινου αίματος δε θα μεταδώσουν ηπατίτιδα, AIDS ή άλλες λοιμώξεις. Επομένως, ο χειρισμός αντιδραστηρίων, δειγμάτων ορού ή πλάσματος θα πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τις τοπικές διαδικασίες περί ασφάλειας.
Όλα τα ζωικά προϊόντα και παράγωγα έχουν συλλεχθεί από υγιή ζώα. Τα βόεια συστατικά προέρχονται από χώρες όπου δεν έχει αναφερθεί BSE. Παρ' όλ' αυτά, συστατικά που περιέχουν ζωικές ουσίες θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικώς μολυσματικά.
Αποφεύγετε οποιαδήποτε επαφή του δέρματος με αντιδραστήρια (χρησιμοποιείται αζίδιο του νατρίου ως συντηρητικό). Το αζίδιο στο κιτ αυτό ενδέχεται να αντιδράσει με μόλυβδο και χαλκό των υδραυλικών σωληνώσεων και να σχηματίσει με τον τρόπο αυτό ιδιαίτερα εκρηκτικά αζίδια μετάλλων. Κατά τη διάρκεια του βήματος πλύσης, εκπλύνετε την αποχέτευση με μεγάλη ποσότητα νερού, για την πρόληψη τυχόν συσσωρεύσης αζιδίου.
Μην καπνίζετε, μην πίνετε, μην τρώτε και μη χρησιμοποιείτε καλλυντικά στο χώρο εργασίας. Μην διανέμετε με πιπέτα χρησιμοποιώντας το στόμα σας. Χρησιμοποιείτε προστατευτικό ρουχισμό και γάντια μιας χρήσης. Όλος ο χειρισμός του ραδιενεργού υλικού θα πρέπει να εκτελείται σε καθορισμένο χώρο, μακριά από χώρους τακτικής διέλευσης. Στο εργαστήριο πρέπει να διατηρείται ημερολόγιο για την παραλαβή και τη φύλαξη ραδιενεργών υλικών. Εξοπλισμός και γυάλινα σκεύη του εργαστηρίου, τα οποία θα μπορούσαν να μολυνθούν με ραδιενεργές ουσίες, θα πρέπει να φυλάσσονται σε ξεχωριστό χώρο για την πρόληψη επιμόλυνσης των διαφόρων ραδιοϊσοτόπων.
Τυχόν διαρροές ραδιενεργών υγρών πρέπει να καθαρίζονται αμέσως σύμφωνα με τις διαδικασίες ασφάλειας από ραδιενέργεια. Τα ραδιενεργά απόβλητα πρέπει να απορρίπτονται σύμφωνα με τους τοπικούς κανονισμούς και τις κατευθυντήριες οδηγίες των αρχών που έχουν δικαιοδοσία στο εργαστήριο. Η τήρηση των βασικών κανόνων ασφάλειας από ραδιενέργεια παρέχει επαρκή προστασία.

XVII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. RITTMASER R.S. *et al.* (1988)
Androstanediol Glucuronide Isomers in Normal Men and Women and in Men infused with labelled Dihydrotestosterone.
JCE & M., 66, 1, 212-216.

2. RAO P.N. *et al.* (1987)
Isolation and Identification of Androstanediol Glucuronide from Human Plasma.
J. Steroid Biochem., 28, 5, 565-569.
J. Clin. Invest., 69, 1203-1206.

3. HORTON R. *et al.* (1982)
3α,17β-Androstanediol Glucuronide in plasma.

4. JOURA E.A. *et al.* (1996)
Serum 3α-androstanediol glucuronide is decreased in nonhirsute women with acne vulgaris.
Fertility and Sterility, 66, 6, 1033-1035.

5. GILAD S. *et al.* (1994)
Assesment of 5α-reductase activity in hirsute women: comparison of serum androstanediol glucuronide with urinary androsterone and aetiocholanolone excretion.
Clinical Endocrinology, 40, 459-464.

6. THOMPSON D.L. *et al.* (1990)
Androsterone Glucuronide is a marker of adrenal hyperandrogenism in hirsute women.
Clinical Endocrinology, 32, 283-292.

XVIII. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ

	ΚΡΟΥΣΕΙΣ "TOTAL" μl	ΒΑΘΜΟΝΟΜ ΗΤΕΣ μl	ΔΕΙΓΜΑ(ΤΑ) ΟΡΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ μl
Βαθμονομητές (0 έως 5) Δείγματα, οροί ελέγχου Ιχνηθέτης	- - 500	100 - 500	- 100 500
Επώαση	2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου με συνεχή ανάδευση (700 rpm)		
Διαχωρισμός Διάλυμα πλύσης εργασίας Διαχωρισμός Διάλυμα πλύσης εργασίας Διαχωρισμός	-	αναρρόφηση 2,0 ml αναρρόφηση 2,0 ml αναρρόφηση	
Μέτρηση	Μέτρηση σωληναρίων επί 60 δευτερόλεπτα		

Αρ. καταλόγου DIASource: KIP0151	Αριθμός P.I.: 1701001/el	Αρ. αναθεώρησης: 110608/1
-------------------------------------	-----------------------------	------------------------------

	<u>Used symbols</u>
	Consult instructions for use
	Storage temperature
	Use by
LOT	Batch code
REF	Catalogue number
CONTROL	Control
IVD	In vitro diagnostic medical device
	Manufacturer
	Contains sufficient for <n> tests
WASH SOLN CONC	Wash solution concentrated
CAL 0	Zero calibrator
CAL N	Calibrator #
CONTROL N	Control #
Ag 1251	Tracer
Ab 1251	Tracer
Ag 1251 CONC	Tracer concentrated
Ab 1251 CONC	Tracer concentrated
	Tubes
INC BUF	Incubation buffer
ACETONITRILE	Acetonitrile
SERUM	Serum
DIL SPE	Specimen diluent
DIL BUF	Dilution buffer
ANTISERUM	Antiserum
IMMUNOADSORBENT	Immunoabsorbent
DIL CAL	Calibrator diluent
REC SOLN	Reconstitution solution
PEG	Polyethylene glycol
EXTR SOLN	Extraction solution
ELU SOLN	Elution solution
GEL	Bond Elut Silica cartridges
PRE SOLN	Pre-treatment solution
NEUTR SOLN	Neutralization solution
TRACEUR BUF	Tracer buffer
	Microtiterplate
Ab HRP	HRP Conjugate
Ag HRP	HRP Conjugate
Ab HRP CONC	HRP Conjugate concentrate
Ag HRP CONC	HRP Conjugate concentrate
CONJ BUF	Conjugate buffer
CHROM TMB CONC	Chromogenic TMB concentrate
CHROM TMB	Chromogenic TMB solution
SUB BUF	Substrate buffer
STOP SOLN	Stop solution
INC SER	Incubation serum
BUF	Buffer
Ab AP	AP Conjugate
SUB PNPP	Substrate PNPP
BIOT CONJ CONC	Biotin conjugate concentrate
AVID HRP CONC	Avidine HRP concentrate
ASS BUF	Assay buffer
Ab BIOT	Biotin conjugate
Ab	Specific Antibody
SAV HRP CONC	Streptavidin HRP concentrate
NSB	Non-specific binding
2nd Ab	2nd Antibody
ACID BUF	Acidification Buffer
DIST	Distributor

	<u>Symboles utilisés</u>
	Consulter les instructions d'utilisation
	Température de conservation
	Utiliser jusqu'à
LOT	Numéro de lot
REF	Référence de catalogue
CONTROL	Contrôle
I V D	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Fabricant
	Contenu suffisant pour <n> tests
WASH SOLN CONC	Solution de lavage concentrée
CAL 0	Calibrateur zéro
CAL N	Calibrateur #
CONTROL N	Contrôle #
Ag 125I	Traceur
Ab 125I	Traceur
Ag 125I CONC	Traceur concentré
Ab 125I CONC	Traceur concentré
	Tubes
INC BUF	Tampon d'incubation
ACETONITRILE	Acétonitrile
SERUM	Sérum
DIL SPE	Diluant du spécimen
DIL BUF	Tampon de dilution
ANTISERUM	Antisérum
IMMUNOADSORBENT	Immunoabsorbant
DIL CAL	Diluant de calibrateur
REC SOLN	Solution de reconstitution
PEG	Glycol Polyéthylène
EXTR SOLN	Solution d'extraction
ELU SOLN	Solution d'élution
GEL	Cartouches Bond Elut Silica
PRE SOLN	Solution de pré-traitement
NEUTR SOLN	Solution de neutralisation
TRACEUR BUF	Tampon traceur
TIT	Microplaque de titration
Ab HRP	HRP Conjugué
Ag HRP	HRP Conjugué
Ab HRP CONC	HRP Conjugué concentré
Ag HRP CONC	HRP Conjugué concentré
CONJ BUF	Tampon conjugué
CHROM TMB CONC	Chromogène TMB concentré
CHROM TMB	Solution chromogène TMB
SUB BUF	Tampon substrat
STOP SOLN	Solution d'arrêt
INC SER	Sérum d'incubation
BUF	Tampon
Ab AP	AP Conjugué
SUB PNPP	Tampon PNPP
BIOT CONJ CONC	Biotine conjugué concentré
AVID HRP CONC	Avidine HRP concentré
ASS BUF	Tampon de test
Ab BIOT	Biotine conjugué
Ab	Anticorps spécifique
SAV HRP CONC	Concentré streptavidine HRP
NSB	Liant non spécifique
2nd Ab	Second anticorps
ACID BUF	Tampon d'acidification

	<u>Gebruikte symbolen</u>
	Raadpleeg de gebruiksaanwijzing
	Bewaartemperatuur
	Houdbaar tot
LOT	Lotnummer
REF	Catalogusnummer
CONTROL	Controle
IVD	Medisch hulpmiddel voor in-vitro diagnostiek
	Fabrikant
	Inhoud voldoende voor <n> testen
WASH SOLN CONC	Wasoplossing, geconcentreerd
CAL 0	Nulkalibrator
CAL N	Kalibrator #
CONTROL N	Controle #
Ag 125I	Tracer
Ab 125I	Tracer
Ag 125I CONC	Tracer geconcentreerd
Ab 125I CONC	Tracer geconcentreerd
	Buisjes
INC BUF	Incubatiebuffer
ACETONITRILE	Acetonitrile
SERUM	Serum
DIL SPE	Specimen diluent
DIL BUF	Verdunningsbuffer
ANTISERUM	Antiserum
IMMUNOADSORBENT	Immunoabsorbent
DIL CAL	Kalibratorverdunner
REC SOLN	Reconstitutieoplossing
PEG	Polyethyleen glycol
EXTR SOLN	Extractieoplossing
ELU SOLN	Elutieoplossing
GEL	Bond Elut Silica kolom
PRE SOLN	Pre-behandelingsoplossing
NEUTR SOLN	Neutralisatieoplossing
TRACEUR BUF	Tracerbuffer
	Microtiterplaat
Ab HRP	HRP Conjugaat
Ag HRP	HRP Conjugaat
Ab HRP CONC	HRP Conjugaat geconcentreerd
Ag HRP CONC	HRP Conjugaat geconcentreerd
CONJ BUF	Conjugaat buffer
CHROM TMB CONC	Chromogene TMB geconcentreerd
CHROM TMB	Chromogene Oplossing TMB
SUB BUF	Substraatbuffer
STOP SOLN	Stopoplossing
INC SER	Incubatieserum
BUF	Buffer
Ab AP	AP Conjugaat
SUB PNPP	Substraat PNPP
BIOT CONJ CONC	Geconcentreerd Biotine conjugaat
AVID HRP CONC	Geconcentreerd Avidine-HRP conjugaat
ASS BUF	Assay buffer
Ab BIOT	Biotine conjugaat
Ab	Specifiek antilichaam
SAV HRP CONC	Streptavidine-HRP concentraat
NSB	Aspecifieke binding
2nd Ab	2de antilichaam
ACID BUF	Verzurringsbuffer

	<u>Gebrauchte Symbolen</u>
	Gebrauchsanweisung beachten
	Lagern bei
	Verwendbar bis
LOT	Chargenbezeichnung
REF	Bestellnummer
CONTROL	Kontrolle
I V D	In Vitro Diagnostikum
	Hersteller
	Ausreichend für <n> Ansätze
WASH SOLN CONC	Waschlösung-Konzentrat
CAL 0	Null kalibrator
CAL N	Kalibrator #
CONTROL N	Kontrolle #
Ag 125I	Tracer
Ab 125I	Tracer
Ag 125I CONC	Tracer Konzentrat
Ab 125I CONC	Tracer Konzentrat
	Röhrchen
INC BUF	Inkubationspuffer
ACETONITRILE	Azetonitril
SERUM	Humanserum
DIL SPE	Probenverdünner
DIL BUF	Verdünnungspuffer
ANTISERUM	Antiserum
IMMUNOADSORBENT	Immunadsorbens
DIL CAL	Kalibratorverdünnung
REC SOLN	Rekonstitutionslösung
PEG	Polyethylenglykol
EXTR SOLN	Extraktionslösung
ELU SOLN	Eluierungslösung
GEL	Bond Elut Silikakartuschen
PRE SOLN	Vorbehandlungslösung
NEUTR SOLN	Neutralisierungslösung
TRACEUR BUF	Tracer-Puffer
	Mikrotiterplatte
Ab HRP	HRP Konjugat
Ag HRP	HRP Konjugat
Ab HRP CONC	HRP Konjugat Konzentrat
Ag HRP CONC	HRP Konjugat Konzentrat
CONJ BUF	Konjugatpuffer
CHROM TMB CONC	Chromogenes TMB Konzentrat
CHROM TMB	Farblösung TMB
SUB BUF	Substratpuffer
STOP SOLN	Stopplösung
INC SER	Inkubationsserum
BUF	Puffer
Ab AP	AP Konjugat
SUB PNPP	Substrat PNPP
BIOT CONJ CONC	Biotin-Konjugat-Konzentrat
AVID HRP CONC	Avidin-HRP-Konzentrat
ASS BUF	Assaypuffer
Ab BIOT	Biotin-Konjugat
Ab	Spezifischer Antikörper
SAV HRP CONC	HRP Streptavidinkonzentrat
NSB	Unspezifische Bindung
2nd Ab	Sekundärer Antikörper
ACID BUF	Ansäuerungspuffer

	<u>Simboli utilizzati</u>
	Consultare le istruzioni per l'uso
	Limitazioni di temperatura
	Utilizzare entro
LOT	Numero di lotto
REF	Numero di catalogo
CONTROL	Controllo
I V D	Dispositivo medico-diagnostico in vitro
	Fabbricante
	Contenuto sufficiente per <n> saggi
WASH SOLN CONC	Tampone di lavaggio concentrato
CAL 0	Calibratore zero
CAL N	Standard #
CONTROL N	Controllo #
Ag 125I	Marcato
Ab 125I	Marcato
Ag 125I CONC	Marcato concentrato
Ab 125I CONC	Marcato concentrato
	Provette
INC BUF	Tampone incubazione
ACETONITRILE	Acetonitrile
SERUM	Siero
DIL SPE	Diluente campione
DIL BUF	Tampone diluizione
ANTISERUM	Antisiero
IMMUNOADSORBENT	Immunoassorbente
DIL CAL	Diluente calibratore
REC SOLN	Soluzione di ricostituzione
PEG	Polietilenglicole
EXTR SOLN	Soluzione di estrazione
ELU SOLN	Soluzione di eluizione
GEL	Cartucce di silice bond elut
PRE SOLN	Soluzione di pretrattamento
NEUTR SOLN	Soluzione di neutralizzazione
TRACEUR BUF	Tracer Buffer
	Piastra di microtitolazione
Ab HRP	HRP Coniugato
Ag HRP	HRP Coniugato
Ab HRP CONC	HRP Coniugato concentrato
Ag HRP CONC	HRP Coniugato concentrato
CONJ BUF	Buffer coniugato
CHROM TMB CONC	Cromogena TMB concentrato
CHROM TMB	Soluzione cromogena TMB
SUB BUF	Tampone substrato
STOP SOLN	Soluzione di arresto
INC SER	Incubazione con siero
BUF	Buffer
Ab AP	AP Coniugato
SUB PNPP	Substrato PNPP
BIOT CONJ CONC	Concentrato coniugato con biotina
AVID HRP CONC	Concentrato avidina HRP
ASS BUF	Soluzione tampone per test
Ab BIOT	Coniugato con biotina
Ab	Anticorpo Specifico
SAV HRP CONC	Streptavidina-HRP concentrata
NSB	Legame non-specifico
2nd Ab	2° Anticorpo
ACID BUF	Tampone Acidificante

	<u>Símbolos utilizados</u>
	Consultar las instrucciones de uso
	Limitación de temperatura
	Fecha de caducidad
LOT	Código de lote
REF	Número de catálogo
CONTROL	Control
I V D	Producto sanitario para diagnóstico in vitro
	Fabricante
	Contenido suficiente para <n> ensayos
WASH SOLN CONC	Solución de lavado concentrada
CAL 0	Calibrador cero
CAL N	Calibrador #
CONTROL N	Control #
Ag 125I	Trazador
Ab 125I	Trazador
Ag 125I CONC	Trazador concentrada
Ab 125I CONC	Trazador concentrada
	Tubos
INC BUF	Tampón de incubación
ACETONITRILE	Acetonitrilo
SERUM	Suero
DIL SPE	Diluyente de Muestra
DIL BUF	Tampón de dilución
ANTISERUM	Antisuero
IMMUNOADSORBENT	Inmunoadsorbente
DIL CAL	Diluyente de calibrador
REC SOLN	Solución de Reconstitución
PEG	Glicol Polietileno
EXTR SOLN	Solución de extracción
ELU SOLN	Solución de elución
GEL	Cartuchos Bond Elut Silica
PRE SOLN	Solución de Pre-tratamiento
NEUTR SOLN	Solución de Neutralización
TRACEUR BUF	Tampón de trazador
UJ	Placa de microvaloración
Ab HRP	HRP Conjugado
Ag HRP	HRP Conjugado
Ab HRP CONC	HRP Conjugado concentrada
Ag HRP CONC	HRP Conjugado concentrada
CONJ BUF	Tampón de Conjugado
CHROM TMB CONC	Cromógena TMB concentrada
CHROM TMB	Solución Cromógena TMB
SUB BUF	Tampón de sustrato
STOP SOLN	Solución de Parada
INC SER	Suero de Incubación
BUF	Tampón
Ab AP	AP Conjugado
SUB PNPP	Sustrato PNPP
BIOT CONJ CONC	Concentrado de conjugado de biotina
AVID HRP CONC	Concentrado avidina-HRP
ASS BUF	Tampón de ensayo
Ab BIOT	Conjugado de biotina
Ab	Anticuerpo específico
SAV HRP CONC	Estreptavidina-HRP Concentrado
NSB	Unión no específica
2nd Ab	Segundo anticuerpo
ACID BUF	Tampón de Acidificación

	<u>Símbolos utilizados</u>
	Consulte instruções de utilização
	Temperatura de conservação
	Utilizar antes de
LOT	Código de lote
REF	Número de catálogo
CONTROL	Controlo
I V D	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro
	Fabricante
	Conteúdo suficiente para <n> testes
WASH SOLN CONC	Solução de lavagem concentrada
CAL 0	Calibrador zero
CAL N	Calibrador #
CONTROL N	Controlo #
Ag 125I	Marcador
Ab 125I	Marcador
Ag 125I CONC	Marcador concentrada
Ab 125I CONC	Marcador concentrada
	Tubos
INC BUF	Tampão de incubação
ACETONITRILE	Acetonitrilo
SERUM	Soro
DIL SPE	Diluidor de espécimes
DIL BUF	Tampão de diluição
ANTISERUM	Anti-soro
IMMUNOADSORBENT	Imunoabsorvente
DIL CAL	Diluyente do calibrador
REC SOLN	Solução de Reconstituição
PEG	Polietileno-glicol
EXTR SOLN	Solução de Extracção
ELU SOLN	Solução de Eluição
GEL	Cartuchos de sílica Bond Elut
PRE SOLN	Solução de pré-tratamento
NEUTR SOLN	Solução de neutralização
TRACEUR BUF	Tampão Marcador
TIT	Placa de micro titulação
Ab HRP	HRP Conjugação
Ag HRP	HRP Conjugação
Ab HRP CONC	HRP Conjugação concentrada
Ag HRP CONC	HRP Conjugação concentrada
CONJ BUF	Conjuge o tampão
CHROM TMB CONC	Cromogénica TMB concentrada
CHROM TMB	Solução Cromogénica TMB
SUB BUF	Tampão de substrato
STOP SOLN	Solução de Paragem
INC SER	Soro de incubação
BUF	Tampão
Ab AP	AP Conjugação
SUB PNPP	Substrato PNPP
BIOT CONJ CONC	Concentrado conjugado de biotina
AVID HRP CONC	Concentrado HRP de avidina
ASS BUF	Tampão de ensaio
Ab BIOT	Conjugado de biotina
Ab	Anticorpo específico
SAV HRP CONC	Estreptavidina HRP concentrado
NSB	Ligações não específicas
2nd Ab	Anticorpo secundário
ACID BUF	Tampão de acidificação

	<u>Επεξήγηση συμβόλων</u>
	Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης
	Θερμοκρασία αποθήκευσης
	Ημερομηνία λήξης
LOT	Αριθμός παρτίδας
REF	Αριθμός καταλόγου
CONTROL	Πρότυπο ελέγχου
I V D	In Vitro Διαγνωστικό Ιατροτεχνολογικό προϊόν
	Κατασκευαστής
	Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις
WASH SOLN CONC	Συμπυκνωμένο διάλυμα έκπλυσης
CAL 0	Μηδενικός βαθμονομητής
CAL N	Βαθμονομητής #
CONTROL N	Ορός ελέγχου #
Ag 125I	Ιχνηθέτης
Ab 125I	Ιχνηθέτης
Ag 125I CONC	Χρωμογόνος Ιχνηθέτης
Ab 125I CONC	Χρωμογόνος Ιχνηθέτης
	Σώληνάρια
INC BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα επώασης
ACETONITRILE	Ακετονιτρίλιο
SERUM	Ορός
DIL SPE	Διάλυμα αραίωσης δειγμάτων
DIL BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης
ANTISERUM	Αντιορός
IMMUNOADSORBENT	Ανοσοπροσροφητικό
DIL CAL	Αραιωτικό βαθμονομητών
REC SOLN	Διάλυμα ανασύστασης
PEG	Πολυαιθυλενογλυκόλη
EXTR SOLN	Διάλυμα εκχύλισης
ELU SOLN	Διάλυμα έκλουσης
GEL	Φύσιγγες πυριτίου Bond Elut
PRE SOLN	Διάλυμα προεπεξεργασίας
NEUTR SOLN	Διάλυμα εξουδετέρωσης
TRACEUR BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα
	Πλάκα μικροτιτλοδότησης
Ab HRP	HRP Σύζευγμα
Ag HRP	HRP Σύζευγμα
Ab HRP CONC	Χρωμογόνος HRP Σύζευγμα
Ag HRP CONC	Χρωμογόνος HRP Σύζευγμα
CONJ BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα συζεύγματος
CHROM TMB CONC	Χρωμογόνος TMB
CHROM TMB	Διάλυμα χρωμογόνου TMB
SUB BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος
STOP SOLN	Ανασχετικό αντιδραστήριο
INC SER	Ορός επώασης
BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα
Ab AP	AP Σύζευγμα
SUB PNPP	PNPP υποστρώματος
BIOT CONJ CONC	Συμπυκνωμένο αντιδραστήριο συζευγμένο με βιοτίνη
AVID HRP CONC	Συμπυκνωμένο διάλυμα αβιδίνης-HRP
ASS BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα προσδιορισμού
Ab BIOT	αντιδραστήριο συζευγμένο με βιοτίνη
Ab	Ειδικό Αντίσωμα
SAV HRP CONC	Συμπυκνωμένη στρεπταβιδίνη συνεξευγμένη με HRP
NSB	μη-ειδική δέσμευση
2nd Ab	2ο Αντίσωμα
ACID BUF	Ρυθμιστικό Διάλυμα όξινο