



CBG-RIA-CT

KIP1809

LOT : 101109/3

Read entire protocol before use.

CBG-RIA-CT

I. INTENDED USE

Radioimmunoassay for the *in vitro* quantitative measurement of human Transcortine or Corticosteroid Binding Globulin (CBG) in serum.

II. GENERAL INFORMATION

- A. **Proprietary name :** DIAsource CBG-RIA-CT Kit
- B. **Catalog number :** KIP1809 : 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

A. Biological activity

Transcortin or corticosteroid-binding globulin (CBG) is a plasma α_1 -glycoprotein with a molecular weight of approximately 52000 Dalton. It contains a single steroid-binding site with an affinity (at 37°C) for cortisol of $3 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ and a somewhat lower affinity for progesterone. Since the plasma concentration of transcortin varies between 0.4 and $2.5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, the major fraction of cortisol in plasma is bound to this protein. This transcortin-bound cortisol is considered to be biologically inactive, whereas the unbound cortisol constitutes the active form of cortisol. The active fraction of plasma cortisol will thus depend on the concentration of transcortin.

B. Clinical applications


The plasma concentration of transcortin shows little or no diurnal variation and no marked differences are observed in adult subjects according to age, sex or menstrual cycle. In umbilical cord blood, however, transcortin is present at half of the normal adult level and prepubertal children have somewhat higher levels than adults. Estrogen therapy or estrogen impregnation during pregnancy causes a very marked increase of the transcortin concentration. Decreased levels of transcortin are observed in several conditions : hypoproteinemia, Cushing's syndrome or corticoid treatment and in some cases of vitamin B₁₂ deficiency. Extremely low levels of transcortin have been reported in a few patients with septic shock. Furthermore, a rare inherited form of hypotranscortinemia has been described.

The most important clinical application of transcortin measurements consists of the interpretation of cortisol levels, since it allows to assess the unbound cortisol concentration, which is biologically active. Indeed, the concentration of unbound cortisol can be calculated from the concentration of total cortisol and that of transcortin on the basis of mass action. The results of this method correlate well with those obtained by centrifuged ultrafiltrations.

IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

A fixed amount of ^{125}I labelled CBG competes with the CBG to be measured present in the sample or in the calibrator for a fixed amount of anti-CBG antibody sites, which are bound to the goat anti mouse (GAM) antibodies immobilized to the wall of a polystyrene tube. After 2 hours incubation at room temperature, an aspiration step terminates the competition reaction. The tubes are then washed with 2 ml of working wash solution and aspirated again. A calibration curve is plotted and the CBG 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 GAM (Goat anti Mouse)	2 x 48	black	Ready for use			
<table border="1" data-bbox="119 582 255 638"><tr><td>Ag</td><td>^{125}I</td></tr></table> TRACER: ^{125}I iodine labelled CBG in phosphate buffer with bovine serum albumin and azide (<0.1%)	Ag	^{125}I	1 vial 10.5 ml 89 kBq	red	Ready for use	
Ag	^{125}I					
<table border="1" data-bbox="119 728 255 784"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Zero Calibrator in phosphate buffer with bovine serum albumin and azide (<0.1%)	CAL	0	1 vial lyophilised	yellow	Add 3 ml distilled water	
CAL	0					
<table border="1" data-bbox="119 862 255 918"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Calibrators - N = 1 to 6 (see exact values on vial labels) in phosphate buffer with bovine serum albumin and azide (<0.1%)	CAL	N	6 vials lyophilised	yellow	Add 1ml distilled water	
CAL	N					
<table border="1" data-bbox="79 1019 279 1075"><tr><td>ANTISERUM</td></tr></table> CBG Antiserum in phosphate buffer with bovine serum albumin and azide (<0.1%)	ANTISERUM	1 vial 10.5 ml	blue	Ready for use		
ANTISERUM						
<table border="1" data-bbox="103 1153 263 1209"><tr><td>DIL</td><td>BUF</td></tr></table> Dilution Buffer: phosphate buffer with bovine serum albumin and azide (<0.1%)	DIL	BUF	1 vial 110 ml	black	Ready for use	
DIL	BUF					
<table border="1" data-bbox="71 1288 327 1344"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Wash solution (TRIS-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 vial 10 ml	brown	Dilute 70 x with distilled water (use a magnetic stirrer).
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1" data-bbox="127 1400 319 1456"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Controls - N = 1 or 2: phosphate buffer with human serum (diluted 25x), bovine serum albumin and azide (<0.1%)	CONTROL	N	2 vials lyophilised	silver	Add 0.5 ml distilled water	
CONTROL	N					

To the best of our knowledge, no international reference material exists for this parameter.

VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

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

1. Distilled water
2. Pipettes for delivery of: 100 μl , 500 μl , 1 ml, 3 ml and 5 ml (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
3. Disposable polystyrene tubes (12 x 75 mm)
4. Vortex mixer
5. Tube shaker (400 rpm)
6. Magnetic stirrer
7. 5 ml automatic syringe (Cornwall type) for washing
8. Aspiration system (optional)
9. Any gamma counter capable of measuring ^{125}I may be used (minimal yield 70%).

VII. REAGENT PREPARATION

- Calibrators:** Reconstitute the zero calibrator with 3 ml distilled water and the other calibrators with 1 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 69 volumes of distilled water to 1 volume of Wash Solution (70x). 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 7 days at 2-8°C. For longer storage periods, aliquots should be made and kept at -20°C for maximum 3 months. Avoid subsequent freeze-thaw cycles.
- 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 samples must be kept at 2-8°C.
- If the test is not run within 48 hrs, storage at -20°C is recommended.
- Avoid subsequent freeze-thaw cycles.
- After thawing, the samples should be mixed and centrifuged.
- **The samples have to be diluted 25 times in Dilution Buffer. Recommended procedure: 100 μl serum + 2.4 ml Dilution Buffer.**

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.
- Use a clean disposable pipette tip for addition of each different reagent and sample in order to avoid cross-contamination. High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision.
- Respect the incubation times.
- Prepare a calibration curve for each run, do not use data from previous runs.

B. Procedure

1. Label coated tubes in duplicate for each calibrator, control and sample. For the determination of total counts, label 2 normal tubes.
2. Briefly vortex calibrators, controls and diluted samples and dispense 100 μl of each into the respective tubes.
3. Dispense 100 μl of ^{125}I iodine labelled CBG into each tube, including the tubes for total counts.
4. Dispense 100 μl of CBG antiserum into each tube (except total counts).
5. Shake the tube rack gently by hand to liberate any trapped air bubbles.
6. Incubate for 2 hour at room temperature with continuous shaking at 400 rpm.
7. Aspirate (or decant) 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.
8. Wash tubes with 2 ml Working Wash solution (except total counts) and aspirate. Avoid foaming during the addition of the Working Wash solution.
9. Let the tubes stand upright for two minutes and aspirate the remaining drop of liquid.
10. Count tubes in a gamma counter for 60 seconds.

XI. CALCULATION OF RESULTS

1. Calculate the mean of duplicate determinations.
2. 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 CBG concentration of each calibrator point. Reject obvious outliers.
3. Computer assisted methods can also be used to construct the calibration curve. If automatic result processing is used, a 4-parameter logistic function curve fitting is recommended.
4. By interpolation of the sample (B/B0 (%)) values, determine the CBG concentrations of the samples from the calibration curve.
5. The concentrations read on the calibration curve for the samples and controls must be multiplied by 25 (dilution factor).
6. For each assay, the percentage of total tracer bound in the absence of unlabelled CBG (B0/T) must be checked.

Calculation of unbound cortisol

In human serum cortisol is bound to transcortin, and, in addition there is some weak non-saturable binding to albumin. These simultaneous binding equilibrium can be represented by the following equation :

$$U^2K(1+N) + U(1+N+K(T-C)) - C = 0$$

In this equation, U represents the molar concentration of unbound cortisol, C the molar concentration of total cortisol and T the concentration of transcortin. K corresponds to the affinity of transcortin for cortisol at 37°C and N to the proportion of albumin-bound to unbound cortisol. This equation can be solved for U in the following way :

$$U = \sqrt{Z^2 + \frac{C}{(1+N)K}} - ZM$$

where in : $Z = \frac{1}{2K} + \frac{T-C}{2(1+N)}M$

or quantitatively, assuming a value for K of $3 \times 10^{-7} M^{-1}$ and a value for N of 1.74 and expressing U, C and T as μM .

$$U = \sqrt{Z^2 + 0.0122C} - Z^{\mu M}$$

where in : $Z = 0.0167 + 0.182(T-C)\mu M$

To convert concentrations of cortisol in $\mu g\%$ or in ng/ml to μM values, divide respectively by 36.2 or 362 to convert concentrations of transcortin in $\mu g/ml$ to μM values, divide by 52. The obtained value of U (in μM) can be converted to $\mu g\%$ by multiplication with 36.2 or ng/ml by multiplication with 362.

Example of calculation : let's suppose that the obtained transcortin and total cortisol levels are respectively of 40 $\mu g/ml$ and 130 ng/ml

· Transcortin levels in μM : $\frac{40}{52} = 0.77\mu M$

· Total cortisol levels in μM : $\frac{130}{362} = 0.36\mu M$

· $Z = 0.0167 + 0.182(0.77-0.36) = 0.09 \mu M$

· $U = \sqrt{0.09^2 + (0.0122 \times 0.36)} - 0.09 = 0.021\mu M$

· Concentration of unbound cortisol in ng/ml : $0.021 \times 362 = 7.8 ng/ml$.

XII. TYPICAL DATA

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

CBG	cpm	B/B ₀ (%)
Total count	42523	
Calibrator		
0.00 $\mu g/ml$	17216	100.0
0.44 $\mu g/ml$	15282	89.6
0.81 $\mu g/ml$	13081	80.3
1.50 $\mu g/ml$	10162	61.6
2.20 $\mu g/ml$	8292	48.6
4.00 $\mu g/ml$	4429	21.2
8.00 $\mu g/ml$	2633	11.3

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 0.26 $\mu g/ml$.

C. Precision

INTRA-ASSAY PRECISION

INTER-ASSAY PRECISION

Serum	N	<X> ± SD ($\mu g/ml$)	CV (%)	Serum	N	<X> ± SD ($\mu g/ml$)	CV (%)
A	20	23.1 ± 2.0	8.6	A	14	24.7 ± 2.7	10.8
B	20	83.3 ± 3.2	3.9	B	14	113.8 ± 5.5	4.8

SD: Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

D. Accuracy

DILUTION TEST

Sample	Dilution	Theoretical Concent. ($\mu g/ml$)	Measured Concent. ($\mu g/ml$)
A	1/8	-	5.5
	1/16	2.75	3.2
	1/32	1.38	1.5
	1/64	0.69	0.69
	1/128	0.34	0.44

Samples were diluted with zero calibrator.

RECOVERY TEST

Sample	added CBG ($\mu g/ml$)	Recovered CBG ($\mu g/ml$)	Recovered (%)
1	0.46	0.4	87.0%
	0.88	1	113.6%
	1.4	1.3	92.9%
	2.1	2.2	104.8%
	4.3	4.1	95.3%
	8.7	9.4	108.0%

E. Time delay between last calibrator and sample dispensing

As shown hereafter, assay results remain accurate even when a sample is dispensed 30 minutes after the calibrator has been added to the tubes.

TIME DELAY

Serum $\mu g/ml$	0'	10'	20'	30'
C 1	25.3	30.3	28.8	29.3
C 2	101.8	105.8	106.3	101.5

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.
- Acceptance criteria for the difference between the duplicate results of the samples should rely on Good Laboratory Practises.

XV. REFERENCE INTERVALS

These values are given only for guidance; each laboratory should establish its own normal range of values.

Identification	Range (*) ($\mu g/ml$)	n
Men	22 - 55	16
Women	40 - 154	43

(*) The range is based on 2.5 % and 97.5 % percentiles

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.

All radioactive handling should be executed in a designated area, away from regular passage. A logbook 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 radiation safety 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.

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.

XVII. BIBLIOGRAPHY

1. BRIEN T.G., 1980
Free cortisol in human plasma.
Gorm. Metab. Res. 12, 643-650
2. BRIEN T.G., 1981
Human corticosteroid binding globulin.
Clin. Endocrinol. 14, 193-212
3. DAUGHADAY W.H., 1958
Binding of corticosteroid by plasma proteins. Corticosteroid-binding globulin activity in normal human beings and in certain disease states.
Arch. int. Med., 101, 286
4. DE MOOR P., HEINVEGH K., HERREMANS J.F. and DECLERCK-RASKIN M., 1962
Protein-binding of corticosteroid studies by gel filtration.
J. Clin. Invest. 41, 816-827
5. FAICT D. and DE MOOR P., 1984
Use of monoclonal antibodies in a RIA for human transcortin.
Clin. Chem. 30, 369-372
6. HEYNS W., COOLENS J.L., VAN BAELEN H., and DE MOOR P.,
Dosage et signification du cortisol libre dans le sang.
Journal de Biophysique et Médecine Nucléaire, in press.
7. PARTRIDGE W.M., 1981
Transport of protein-bound hormones into tissues in vivo.
Endocrine Reviews, 2, 103-123

8. ROBIN P., PREDINE J. and MILGROM T., 1978
Assay of unbound cortisol in plasma.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 46, 277-282
9. SAVU L., ZOUAGHI H., CARLI A., and NUNEZ E., 1981
Serum depletion of cortisolsteroid binding-activities, an early marker of human septic shock.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 102, 411-419
10. SEAL U.S. and DOE R.P., 1962
Purification and properbes of transcortin, the cortisol binding globulin, from patients with cancer of the prostate.
Cancer Chemotherapy Reports, 16, 329-334
11. SLAUWHITE W.R. and SANDBERG A.A., 1974
Transcortin : a corticosteroid-binding protein of plasma.
J. Clin. Invest. 38, 384-391
12. VAN BAELEN H. and DE MOOR P., 1974
Immunochemical quantitation of human transcortin.
J. Clin. Endocrinol and Metab. 39, 160-163
13. VAN BAELEN H., BIEPOELS R. and DE MOOR P., 1982
Transcortin Leuven : a variant of human corticosteroid-binding globulin with decreased cortisol binding affinity.
J. Biol. Chem., 257, 3397-3400.
14. WESTPHAL U., 1971
Steroid-protein interactions.
Springer Verlag.
15. WESTPHAL U., 1983
Corticosteroid-binding globulin. A review of some recent aspects.
Mol. Cell. Biochem, 55, 145-157
16. ROSNER W., 1972
Recent studies on the binding of cortisol in serum.
J. Steroid Biochem., 3, 531-542

XVIII. SUMMARY OF THE PROTOCOL

	TOTAL COUNTS µl	CALIBRATORS µl	SAMPLE (S) CONTROLS µl
Calibrators (0 to 6)	-	100	-
Samples, Controls	-	-	100
Tracer	100	100	100
Anti-CBG	-	100	100
Incubation	2 hour at room temperature with continuous shaking at 400 rpm		
Separation Working Wash solution Separation	-	Aspirate (or decant) 2.0 ml Aspirate (or decant)	
Counting	Count tubes for 60 seconds		

DIAsource Catalogue Nr : KIP1809	P.I. Number : 1700481/en	Revision nr : 101109/3
-------------------------------------	-----------------------------	---------------------------

Lire entièrement le protocole avant utilisation.

CBG-RIA-CT

I. BUT DU DOSAGE

Trousse de dosage radio-immunologique pour la mesure quantitative *in vitro* de la Transcortine humaine ou la CBG (Corticosteroid Binding Globulin) dans le sérum humain.

II. INFORMATIONS GÉNÉRALES

- A. **Nom du produit :** DIAsource CBG-RIA-CT kit
- B. **Numéro de catalogue:** KIP1809 : 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

A. Activités biologiques

La transcortine ou la CBG (corticosteroid-binding globulin) est une α_1 -glycoprotéine plasmatique avec un poids moléculaire d'environ 52000. Elle comprend un site de liaison de stéroïde simple avec une affinité (à 37°C) pour le cortisol de 3.107 M⁻¹ et une affinité un peu plus faible pour la progestérone. Comme la concentration plasma de transcortine varie entre 0.4 et 2.5 10⁻⁶ M, la fraction majeure de cortisol dans le plasma est liée à cette protéine. Ce cortisol lié à la transcortine est considéré être biologiquement inactif, tandis que le cortisol non lié constitue la forme active du cortisol. La fraction active du cortisol plasmatique va donc dépendre de la concentration en transcortine.

B. Applications cliniques


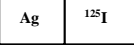
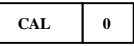
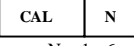

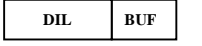
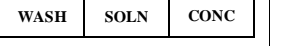
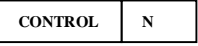
La concentration plasmatique de transcortine ne montre qu'une faible ou aucune variation diurne et pas de différences notables sont observées chez les sujets adultes en fonction de l'âge, du sexe ou du cycle menstruel. Dans le sang du cordon ombilical, cependant, la transcortine est présente à la moitié du taux normal adulte et les enfants prépubères ont des taux légèrement supérieurs aux adultes. Une thérapie oestrogène (par ex. oestroprogestogènes pour le contrôle de la fertilité) ou traitement oestrogène pendant la grossesse cause une augmentation très importante de la concentration en transcortine. Des taux élevés de transcortine sont observées dans différentes conditions: hypoprotéinémie, syndrome de Cushing par traitement de corticoïdes et dans quelques cas de déficience en vitamine B12. Des taux extrêmement faibles de transcortine ont été rapportés chez quelques patients présentant un choc septique. De plus, une forme héréditaire rare d'hypotranscortinémie a été décrite.

L'application clinique la plus importante de dosage de la transcortine consiste à interpréter les taux de cortisol, puisqu'elle permet d'accéder à la concentration de cortisol non lié, qui est biologiquement actif. En effet, la concentration de cortisol non lié peut être calculée à partir de la concentration de cortisol total et celle de transcortine en se basant sur l'action de masse. Les résultats de cette méthode se corrént bien avec ceux obtenus par ultrafiltrations centrifugées.

IV. PRINCIPE DU DOSAGE

Une quantité fixe de CBG marquée à l'¹²⁵I est en compétition avec la CBG à mesurer et présent dans l'échantillon ou dans le calibrateur pour une quantité fixe d'anticorps anti-CBG qui sont liés aux anticorps de chèvre anti-souris (GAM (goat anti-mouse)) immobilisés sur la paroi du tube en polystyrène. Après 2 heures d'incubation à température ambiante, 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. Une courbe de calibration est réalisée et la concentration en CBG des échantillons est déterminée par interpolation de la dose sur la courbe de calibration.

V. RÉACTIFS FOURNIS

Réactifs	96 Tests	Code Couleur	Reconstitution
 Tubes tapissés de GAM (chèvre anti-souris ou Goat anti-Mouse)	2 x 48	Noir	Prêt à l'emploi
 TRACEUR: CBG marquée à l' ¹²⁵ Iodine dans un tampon phosphate avec de l'albumine bovine et de l'azoture (<0,1%)	1 flacon 10,5 ml 89 kBq	Rouge	Prêt à l'emploi
 Calibrateur zéro dans un tampon phosphate avec de l'albumine bovine et de l'azoture (<0,1%)	1 flacon lyophilisés	Jaune	Ajouter 3 ml d'eau distillée
 Calibrateurs - N = 1 - 6 (cf. valeurs exactes sur chaque flacon) dans un tampon phosphate avec de l'albumine bovine et de l'azoture (<0,1%)	6 flacon lyophilisés	Jaune	Ajouter 1 ml d'eau distillée
 Antisérums CBG dans un tampon phosphate avec de l'albumine bovine et de l'azoture (<0,1%)	1 flacon 10,5 ml	Bleu	Prêt à l'emploi
 Tampon de dilution: un tampon phosphate avec de l'albumine bovine et de l'azoture (<0,1%)	1 flacon 110 ml	Noir	Prêt à l'emploi
 Solution de lavage (TRIS-HCl)	1 flacon 10 ml	Brun	Diluer 70x avec de l'eau distillée (utiliser un agitateur magnétique).
 Contrôles - N = 1 ou 2: dans un tampon phosphate avec du sérum humain (dilution 25x), de l'albumine bovine et de l'azoture (<0,1%)	2 flacons lyophilisés	Gris	Ajouter 0,5 ml d'eau distillée

A notre connaissance, aucun matériel de référence internationale n'existe pour ce paramètre.

VI. MATÉRIEL NON FOURNI

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

- Eau distillée
- Pipettes pour distribuer: 100 µl, 500 µl, 1 ml, 3 ml et 5 ml (l'utilisation de pipettes précises et de pointes jetables en plastique est recommandée)
- Tubes en polystyrène jetables (12 x 75 mm)
- Agitateur vortex
- Agitateur de tubes (400 tpm)
- Agitateur magnétique
- 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. PRÉPARATION DES REACTIFS

- Calibrateurs** : Reconstituer le calibrateur zéro avec 3 ml d'eau distillée et les autres calibrateurs avec 1 ml d'eau distillée.
- Contrôles** : Reconstituer les contrôles avec 0,5 ml d'eau distillée.
- Solution de Lavage** : Préparer un volume adéquat de Solution de Lavage en ajoutant 69 volumes d'eau distillée à 1 volume de Solution de Lavage (70x). 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 RÉACTIFS

- 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 aliquotes devront être réalisées et celles-ci seront gardées à -20°C. Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.
- 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. PRÉPARATION ET STABILITÉ DE L'ÉCHANTILLON

- Les échantillons de sérum doivent être gardés entre 2 et 8°C.
- Si le test n'est pas réalisé dans les 48 heures, un stockage à -20°C est recommandé.
- Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.
- Après la décongélation, les échantillons doivent être mélangés et puis centrifugés.
- Les échantillons doivent être dilués 25 fois dans du Tampon de Dilution. Procédure recommandée: 100 µl de sérum + 2,4 ml de Tampon de Dilution.**

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. Mélanger 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 de calibration pour chaque nouvelle série d'expériences, ne pas utiliser les données d'expériences précédentes.

B. Mode opératoire

- Identifier les tubes tapissés fournis dans la trousse en double pour chaque calibrateur, échantillon, contrôle. Pour la détermination de l'activité totale, identifier 2 tubes non tapissés.
- Agiter au vortex brièvement les calibrateurs, les échantillons dilués et les contrôles. Puis distribuer 100 µl de chacun d'eux dans leurs tubes respectifs.
- Distribuer 100 µl de CBG marquée à l'¹²⁵Iodine dans chaque tube, y compris les tubes sans anticorps pour la détermination de l'activité totale.
- Distribuer 100 µl de l'antisérums CBG dans chaque tube (sauf les tubes pour le comptage total).
- Agiter gentiment le portoir de tube pour libérer toute bulle d'air emprisonnée.
- Incuber pendant 2 heures à température ambiante sous agitation (400 tpm).
- Aspirer (ou décanter) 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.
- 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 RÉSULTATS

- Calculer la moyenne de chaque détermination réalisée en double.
- 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 CBG, écarter les valeurs aberrantes.
- Des méthodes informatiques peuvent aussi être utilisées pour construire la courbe de calibration. Si un système d'analyse de traitement informatique des données est utilisé, il est recommandé d'utiliser la fonction « 4 paramètres » du lissage de courbes.
- L'interpolation des valeurs de chaque échantillon (B/B0(%)) détermine les concentrations en CBG à partir de la courbe de calibration.
- La concentration lue sur la courbe de calibration doit être multipliée par 25 (facteur de dilution) pour les échantillons et les contrôles.
- Pour chaque essai, le pourcentage total de traceur lié en absence de CBG non marquée (B0/T) doit être vérifié.

Calcul du cortisol non-lié

Dans le sérum humain, le cortisol est lié à la transcortine; mais il existe en plus une faible proportion non-saturable liée à l'albumine. Cet équilibre de liaisons simultanées peut être représenté par l'équation suivante:

$$U^2 K (1+N) + U (1+N+K) (T-C) - C = 0$$

Dans cette équation, U représente la concentration molaire du cortisol non lié, C la concentration molaire du cortisol total et T la concentration de transcortine. K correspond à l'affinité de la transcortine pour le cortisol à 37°C et N à la proportion de l'albumine liée au cortisol non lié. L'équation peut être résolue pour U de la manière suivante:

$$U = \sqrt{Z^2 + \frac{C}{(1+N)K}} - ZM$$

$$\text{où : } Z = \frac{1}{2K} + \frac{T-C}{2(1+N)} M$$

Ou quantitativement, considérant la valeur pour K de $3 \times 10^{-7} \text{ M}^{-1}$ et la valeur pour N de 1.74 et en exprimant U, C et T en μM .

$$U = \sqrt{Z^2 + 0.0122C} - Z^{\mu\text{M}}$$

$$\text{où : } Z = 0.0167 + 0.182(T-C)Mm$$

Pour convertir la concentration de cortisol en $\mu\text{g}\%$ ou en ng/ml à partir des valeurs en μM , diviser respectivement par 36.2 ou 362 ; pour convertir les concentrations de transcortine en $\mu\text{g/ml}$ à partir des valeurs en μM , diviser par 52. Les valeurs obtenues pour U (en μM) peuvent être converties en $\mu\text{g}\%$ en multipliant par 36.2, ou en ng/ml en multipliant par 362.

Exemple de calcul : supposez que les taux de transcortine et cortisol total obtenus sont respectivement de 40 $\mu\text{g/ml}$ et 130 ng/ml

$$\cdot \text{ Taux de Transcortine en } \mu\text{M} : \frac{40}{52} = 0.77 \mu\text{M}$$

$$\cdot \text{ Taux de cortisol totaux en } \mu\text{M} : \frac{130}{362} = 0.36 \mu\text{M}$$

$$\cdot Z = 0.0167 + 0.182(0.77-0.36) = 0.09 \mu\text{M}$$

$$\cdot U = \sqrt{0.09^2 + (0.0122 \times 0.36)} - 0.09 = 0.021 \mu\text{M}$$

$$\cdot \text{ Concentration du cortisol non-lié en } \text{ng/ml} : 0.021 \times 362 = 7.8 \text{ ng/ml}$$

XII. DONNÉES TYPES

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

CBG	cpm	B/B0 (%)
Activité totale	42523	
Calibrateur		
0,00 $\mu\text{g/ml}$	17216	100,0
0,44 $\mu\text{g/ml}$	15282	89,6
0,81 $\mu\text{g/ml}$	13081	80,3
1,50 $\mu\text{g/ml}$	10162	61,6
2,20 $\mu\text{g/ml}$	8292	48,6
4,00 $\mu\text{g/ml}$	4429	21,2
8,00 $\mu\text{g/ml}$	2633	11,3

XIII. PERFORMANCE ET LIMITES DU DOSAGE

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 0,26 $\mu\text{g/ml}$.

B. Précision

INTRA-ESSAI

INTER-ESSAI

Sérum	N	<X> ± SD ($\mu\text{g/ml}$)	CV (%)	Sérum	N	<X> ± SD ($\mu\text{g/ml}$)	CV (%)
A	20	23,1 ± 2,0	8,6	A	14	24,7 ± 2,7	10,8
B	20	83,3 ± 3,2	3,9	B	14	113,8 ± 5,5	4,8

SD : Déviation Standard; CV: Coefficient de variation

C. Exactitude

TEST DE DILUTION

Échantillon	Dilution	Concentration Théorique ($\mu\text{g/ml}$)	Concentration Mesurée ($\mu\text{g/ml}$)
A	1/8	-	5,5
	1/16	2,75	3,2
	1/32	1,38	1,5
	1/64	0,69	0,69
	1/128	0,34	0,44

L'échantillon a été dilué avec le Calibrateur zéro.

TEST DE RÉCUPÉRATION

Échantillon	CBG ajoutée ($\mu\text{g/ml}$)	CBG récupérée ($\mu\text{g/ml}$)	Récupération (%)
1	0,46	0,4	87,0%
	0,88	1	113,6%
	1,4	1,3	92,9%
	2,1	2,2	104,8%
	4,3	4,1	95,3%
	8,7	9,4	108,0%

D. 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 30 minutes après que le calibrateur ait été ajouté aux tubes avec l'anticorps.

DÉLAI

Sérum $\mu\text{g/ml}$	0'	10'	20'	30'
C 1	25,3	30,3	28,8	29,3
C 2	101,8	105,8	106,3	101,5

XIV. CONTROLE QUALITÉ 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.
- Les critères d'acceptation pour les écarts des valeurs en double des échantillons doivent être basés sur les pratiques de laboratoire courantes.

XIV. VALEURS ATTENDUES

Les valeurs sont données à titre d'information; chaque laboratoire doit établir ses propres écarts de valeurs.

Identification	Portée (*) ($\mu\text{g/ml}$)	n
Hommes	22 - 55	16
Femmes	40 - 154	43

(*) Portée basés sur les percentiles de 2,5% & 97,5%.

XV. PRÉCAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

Sécurité

Pour utilisation en diagnostic *in vitro* uniquement. Cette trousse contient de 1^{125}I (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.

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

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'azoture de sodium est nocif s'il est inhalé, avalé ou en contact avec la peau (l'azoture de sodium est utilisé comme agent conservateur). L'azoture 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.

XVII. BIBLIOGRAPHIE

- BRIEN T.G., 1980
Free cortisol in human plasma.
Gorm. Metab. Res. 12, 643-650
- BRIEN T.G., 1981
Human corticosteroid binding globulin.
Clin. Endocrinol. 14, 193-212
- DAUGHADAY W.H., 1958
Binding of corticosteroid by plasma proteins. Corticosteroid-binding globulin activity in normal human beings and in certain disease states.
Arch. int. Med., 101, 286
- DE MOOR P., HEINVEGH K., HERREMANS J.F. and DECLERCK-RASKIN M., 1962
Protein-binding of corticosteroid studies by gel filtration.
J. Clin. Invest. 41, 816-827
- FAICT D. and DE MOOR P., 1984
Use of monoclonal antibodies in a RIA for human transcortin.
Clin. Chem. 30, 369-372
- HEYNS W., COOLENS J.L., VAN BAELEN H., and DE MOOR P.,
Dosage et signification du cortisol libre dans le sang.
Journal de Biophysique et Médecine Nucléaire, in press.
- PARTRIDGE W.M., 1981
Transport of protein-bound hormones into tissues in vivo.
Endocrine Reviews, 2, 103-123
- ROBIN P., PREDINE J. and MILGROM T., 1978
Assay of unbound cortisol in plasma.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 46, 277-282
- SAVU L., ZOUAGHI H., CARLI A., and NUNEZ E., 1981
Serum depletion of cortisolsteroid binding-activities, an early marker of human septic shock.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 102, 411-419
- SEAL U.S. and DOE R.P., 1962
Purification and properties of transcortin, the cortisol binding globulin, from patients with cancer of the prostate.
Cancer Chemotherapy Reports, 16, 329-334

- SLAUWHITE W.R. and SANDBERG A.A., 1974
Transcortin : a corticosteroid-binding protein of plasma.
J. Clin. Invest. 38, 384-391
- VAN BAELEN H. and DE MOOR P., 1974
Immunochemical quantitation of human transcortin.
J. Clin. Endocrinol and Metab. 39, 160-163
- VAN BAELEN H., BIEPOELS R. and DE MOOR P., 1982
Transcortin Leuven : a variant of human corticosteroid-binding globulin with decreased cortisol binding affinity.
J. Biol. Chem., 257, 3397-3400.
- WESTPHAL U., 1971
Steroid-protein interactions.
Springer Verlag.
- WESTPHAL U., 1983
Corticosteroid-binding globulin. A review of some recent aspects.
Mol. Cell. Biochem, 55, 145-157
- ROSNER W., 1972
Recent studies on the binding of cortisol in serum.
J. Steroid Biochem., 3, 531-542

XVIII. RÉSUMÉ DU PROTOCOLE

	ACTIVITÉ TOTALE (µl)	CALIBRATEURS (µl)	ÉCHANTILLON(S) CONTROLES (µl)
Calibrateurs (0 à 6)	-	100	-
Échantillons, contrôles	-	-	100
Traceur	100	100	100
Anti-CBG	-	100	100
Incubation	2 heures à température ambiante sous agitation (400 rpm).		
Séparation	-	Aspiration (ou décantation)	
Solution de Lavage		2,0 ml	
Séparation		Aspiration (ou décantation)	
Comptage (radioactivité)	Compter les tubes pendant 60 secondes		

Numéro de catalogue DIAsource: KIP1809	Numéro de P.I.: 1700481/fr	Numéro de révision: 101109/1
--	-------------------------------	---------------------------------

Date de révision : 2010-11-09



Lees het hele protocol vóór gebruik.

CBG-RIA-CT

I. BEOOGD GEBRUIK

Radioimmunoassay voor de kwantitatieve bepaling *in vitro* van humaan Transcortine of Corticosteroid-Bindend Globuline (CBG) in serum.

II. ALGEMENE INFORMATIE

- A. **Gedeponeerd handelsmerk:** DIAsource CBG-RIA-CT kit
- B. **Catalogusnummer:** KIP1809 : 96 tests
- 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

A. Biologische activiteiten

Transcortine of corticosteroid-bindend globuline (CBG) is een plasmatisch α_1 -glycoproteïne met een moleculair gewicht van ongeveer 52000 Dalton. Het bevat een enkele steroïde bindingsplaats met een affiniteit voor cortisol (bij 37°C) van $3.10^7 M^{-1}$ en een iets lagere affiniteit voor progesteron. Aangezien de concentratie van Transcortine in plasma varieert tussen 0.4 en $2.5 \cdot 10^{-6} M$, is het merendeel van de cortisol in plasma gebonden aan dit proteïne. Deze transcortine-gebonden cortisol wordt als biologisch inactief beschouwd, terwijl de ongebonden cortisol de actieve vorm van cortisol uitmaakt. De actieve fractie van cortisol in plasma hangt dus af van de concentratie van transcortine.

B. Klinische toepassingen


De concentratie van transcortine in plasma kent geen of weinig variatie doorheen de dag en er worden geen aangegeven verschillen genoteerd bij volwassen subjecten volgens leeftijd, sekse of menstruatiecyclus. In navelstrengbloed echter is transcortine slechts voor de helft van het normale volwassen gehalte aanwezig en prepuberale kinderen hebben iets hogere gehalten dan volwassenen. Oestrogeentherapie of oestrogeen impregnatie tijdens de zwangerschap veroorzaakt een aanzienlijke stijging van de transcortineconcentratie. Verlaagde transcortinegehalten komen onder verschillende condities: hypoproteïnemie, syndroom van Cushing of corticoïde behandeling en in sommige gevallen van vitamine B₁₂ deficiëntie. Extreem lage transcortinegehalten komen voor bij patiënten met een septische shock. Daarenboven is een zeldzame erfelijke vorm van hypotranscortinemie beschreven.

De belangrijkste klinische toepassing van de metingen van transcortine bestaat in de interpretatie van de cortisolgehalten, gezien zij het mogelijk maken de concentratie van ongebonden cortisol te evalueren, die biologisch actief is. Inderdaad kan de concentratie van ongebonden cortisol berekend worden vanuit de totale cortisolconcentratie en uit die van cortisol op basis van de massawerking. De resultaten van deze methode vallen goed samen met de resultaten bekomen via gecentrifugeerde ultrafiltratie.

IV. BESCHRIJVING VAN DE METHODE

Een vaste hoeveelheid ^{125}I gelabeld CBG concurreert met CBG dat bepaald moet worden en aanwezig is in het monster of in de kalibrator voor een vast aantal plaatsen met anti-CBG antilichamen, die gebonden zijn aan de geit-anti-muis (GAM) antilichamen die geïmmobiliseerd zijn aan de wand van een buisje van polystyreen. Na een incubatie van 2 uur bij kamertemperatuur, wordt de concurrentiereactie beëindigd door een aspiratiefase. Daarna worden de buisjes gewassen met 2 ml werk-wasoplossing en opnieuw afgezogen. Een kalibratiecurve wordt uitgezet en de concentraties van CBG van de monsters worden bepaald door dosisinterpolatie van de kalibratiecurve.

V. GELEVERDE REAGENTIA

Reagens	Kit voor 96 testen	Kleur-code	Reconstitutie			
 Buisjes gecoat met GAM (geit-anti-muis)	2 x 48	Zwart	Klaar voor gebruik			
<table border="1"><tr><td>Ag</td><td>^{125}I</td></tr></table> Tracer : CBG gelabeld met ^{125}I jood in fosfaat buffer met bovien serumalbumine en azide (< 0,1%)	Ag	^{125}I	1 flacon 10,5 ml 89 kBq	rood	Klaar voor gebruik	
Ag	^{125}I					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Nulkalibrator in fosfaat buffer met bovien serumalbumine en azide (< 0,1%)	CAL	0	1 flacon gevries- droogd	geel	3 ml gedestilleerd water toevoegen	
CAL	0					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Kalibrators - N = 1 - 6 (zie de exacte waarden op de flaconetiketten) in fosfaat buffer met bovien serumalbumine en azide (< 0,1%)	CAL	N	6 flacons gevries- droogd	geel	1 ml gedestilleerd water toevoegen	
CAL	N					
<table border="1"><tr><td>ANTISERUM</td></tr></table> CBG Antiserum in fosfaat buffer met bovien serumalbumine en azide (< 0,1%)	ANTISERUM	1 flacon 10,5 ml	blauw	Klaar voor gebruik		
ANTISERUM						
<table border="1"><tr><td>DIL</td><td>BUF</td></tr></table> Verdunningsbuffer: fosfaat buffer met bovien serumalbumine en azide (< 0,1%)	DIL	BUF	1 flacon 110 ml	zwart	Klaar voor gebruik	
DIL	BUF					
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Wasoplossing : TRIS-HCl	WASH	SOLN	CONC	1 flacon 10 ml	bruin	70x met gedistilleerd water verdunnen (gebruik een magnetische roerder)
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Controles - N = 1 of 2: in fosfaat buffer met humaan serum (25x verdund), bovien serumalbumine en azide (< 0,1%)	CONTROL	N	2 flacons gevries- droogd	zilver	0,5 ml gedestilleerd water toevoegen	
CONTROL	N					

Naar ons beste weten bestaat er geen internationaal referentiemateriaal voor deze parameter.

VI. NIET MEEGELEVERDE MATERIALEN

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

1. Gedestilleerd water.
2. Pipetten voor een volume van 100 μl , 500 μl , 1 ml, 3 ml en 5 ml (het gebruik van nauwkeurige pipetten met plastic wegwerptips wordt aanbevolen).
3. Wegwerpbuisjes uit polystyreen (12 x 75 mm)
4. Vortexmenger.
5. Schudapparaat voor buisjes (400 tpm)
6. Magnetische roerder.
7. Automatische spuit van 5 ml (type Cornwall) voor de wasfase.
8. Afzuigsysteem (facultatief).
9. Een gammateller die geschikt is voor de bepaling van ^{125}I . Een maximale telefficiëntie moet worden gegarandeerd.

VII. BEREIDING VAN HET REAGENS

- A. **Kalibrators:** Reconstitueer de Nulkalibrator met 3,0 ml gedestilleerd water en de andere kalibrators met 1 ml gedestilleerd water
- B. **Controles:** Reconstitueer de controles met 0,5 ml gedestilleerd water.
- C. **Werk-wasoplossing:** Bereid een voldoende hoeveelheid werk-wasoplossing door 69 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 1 week houdbaar bij 2 tot 8°C. Voor een langere bewaartermijn moeten aliquots gemaakt worden, die bij -20°C bewaard moeten worden. Vermijd herhaalde invriezing en ontdooiing.
- 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

- Serummonsters moeten bij 2-8°C bewaard worden.
- Indien de test niet binnen 48 uur uitgevoerd wordt, dan wordt aanbevolen om ze bij -20°C te bewaren.
- Vermijd herhaalde invriezing en ontdooiing.
- Na ontdooiing moeten de stalen gemengd en gecentrifugeerd worden.
- **De stalen moeten 25 maal verdund worden in Verdunningsbuffer. Aanbevolen procedure: 100 μl serum + 2,4 ml Verdunningsbuffer.**

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 pipetteapparatuur zullen de precisie verhogen. Respecteer de incubatietijden.

Bereid een kalibratiecurve voor elke run; men mag geen gegevens gebruiken van voorafgaande runs.

B. Procedure

1. 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.
2. Vortex de kalibrators, verdunde monsters en controles gedurende korte tijd en distribueer 100 μl van elk in het desbetreffende buisje.
3. Distribueer 100 μl van de tracer in elk buisje, inclusief de buisjes voor de totaal tellingen.
4. Distribueer 100 μl van het CBG antiserum in elk buisje (behalve buisjes voor de totaal tellingen).
5. Schud het rek met de buisjes voorzichtig zodat eventuele ingesloten luchtballen vrijkomen.
6. Incubeer gedurende 2 uur bij kamertemperatuur terwijl continu geschud wordt bij 400 tpm.
7. Aspireer (of decanteer) de inhoud van elk buisje (met uitzondering van de totaal tellingen). Zorg ervoor dat de plastic tip van de aspirator tot aan de bodem van het gecoate buisje komt zodat alle vloeistof verwijderd wordt.
8. 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.
9. Na de wasfase moeten de buisjes gedurende twee minuten rechtop blijven staan en aspireer daarna de overblijvende vloeistof.
10. Tel de buisjes in een gammateller gedurende 60 seconden.

XI. BEREKENING VAN DE RESULTATEN

- Bereken het gemiddelde voor de bepalingen in duplo.
- Zet de (B/B0(%)) waarden uit voor elk kalibratorpunt, als een functie van de CBG concentratie van elk kalibratorpunt, op 3-cyclisch semi-logaritmisch of dubbellogaritmisch papier, verwerp hierbij de duidelijke uitschieters.
- Ook computergestuurde methoden kunnen worden gebruikt om de kalibratiecurve te vormen. Indien de resultaten automatisch verwerkt worden, wordt de 4 parameter logistische functie aanbevolen voor de gepaste curve.
- Bepaal de CBGconcentraties van de monsters uit de referentiecurve door de monsterwaarden (B/B0(%)) te interpoleren.
- De concentraties gelezen op de kalibratiecurve voor de stalen en controles moeten vermenigvuldigd worden met 25 (verdunningsfactor).
- Voor elke bepaling moet het totaalpercentage van de tracer, gebonden in afwezigheid van ongelabeld CBG (B0/T), gecontroleerd worden.

Berekening van ongebonden cortisol

In humaan serum is cortisol gebonden aan transcortine, en daarenboven is er een zwakke niet-verzadigbare binding aan albumine. Dit gelijktijdige bindingsevenwicht kan worden voorgesteld door de volgende vergelijking:

$$U^2K(1+N) + U(1+N+K)(T-C) - C = 0$$

In deze vergelijking staat U voor de molaire concentratie van ongebonden cortisol, C voor de molaire concentratie van het totale cortisol en T voor de concentratie van transcortine. K komt overeen met de affiniteit van transcortine voor cortisol bij 37°C en N met de verhouding tussen albumine-gebonden en ongebonden cortisol. Voor U kan deze vergelijking als volgt worden opgelost:

$$U = \sqrt{Z^2 + \frac{C}{(1+N)K}} - ZM$$

waarin: $Z = \frac{1}{2K} + \frac{T-C}{2(1+N)}M$

of kwantitatief, in de veronderstelling dat K als waarde $3 \times 10^{-7} M^{-1}$ en N 1.74 heeft en U, C en T uitdrukkend als μM .

$$U = \sqrt{Z^2 + 0.0122C} - Z^{\mu M}$$

waarin: $Z = 0.0167 + 0.182(T-C)\mu M$

Om de cortisolconcentraties om te zetten van μg of ng/ml in μM waarden, moet respectievelijk gedeeld worden door 36.2 of door 362, om transcortineconcentraties van $\mu g/ml$ om te zetten naar μM waarden, moet gedeeld worden door 52. De bekomen waarde van U (in μM) kan worden omgezet naar $\mu g\%$ door vermenigvuldiging met 36.2 of naar ng/ml door vermenigvuldiging met 362.

Voorbeeld van berekening: aangenomen dat het bekomen transcortinegehalte en het totale cortisolgehalte respectievelijk 40 $\mu g/ml$ en 130 ng/ml zijn:

· Transcortinegehalten in μM : $\frac{40}{52} = 0.77\mu M$

· Totale cortisolgehalten in μM : $\frac{130}{362} = 0.36\mu M$

· $Z = 0.0167 + 0.182(0.77-0.36) = 0.09 \mu M$

· $U = \sqrt{0.09^2 + (0.0122 \times 0.36)} - 0.09 = 0.021\mu M$

· Concentratie van ongebonden cortisol in ng/ml : $0.021 \times 362 = 7.8 ng/ml$.

XII. KENMERKENDE GEGEVENS

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

CBG	cpm	B/B0 (%)
Totaaltelling	42523	
Kalibrator		
0,00 $\mu g/ml$	17216	100,0
0,44 $\mu g/ml$	15282	89,6
0,81 $\mu g/ml$	13081	80,3
1,50 $\mu g/ml$	10162	61,6
2,20 $\mu g/ml$	8292	48,6
4,00 $\mu g/ml$	4429	21,2
8,00 $\mu g/ml$	2633	11,3

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 0,26 $\mu g/ml$.

B. Precisie

PRECISIE BINNEN EEN TEST

PRECISIE TUSSEN TESTEN

Serum	N	<X> ± SD ($\mu g/ml$)	CV (%)	Serum	N	<X> ± SD ($\mu g/ml$)	CV (%)
A	20	23,1 ± 2,0	8,6	A	14	24,7 ± 2,7	10,8
B	20	83,3 ± 3,2	3,9	B	14	113,8 ± 5,5	4,8

SD: standaarddeviatie; VC: variatiecoëfficiënt

C. Nauwkeurigheid

VERDUNNINGSTEST

Monster	Verdunning	Theoretische concentratie ($\mu g/ml$)	Concentratie die bepaald werd ($\mu g/ml$)
A	1/8	-	5,5
	1/16	2,75	3,2
	1/32	1,38	1,5
	1/64	0,69	0,69
	1/128	0,34	0,44

Monsters werden verdund met de Nulkalibrator.

RECOVERY-TEST

Monster	CBG toegevoegd ($\mu g/ml$)	Recovery van CBG ($\mu g/ml$)	Recovery (%)
1	0,46	0,4	87,0%
	0,88	1	113,6%
	1,4	1,3	92,9%
	2,1	2,2	104,8%
	4,3	4,1	95,3%
	8,7	9,4	108,0%

D. Tijdspanne tussen de laatste kalibrator en distributie van het monster

Zoals hieronder weergegeven wordt, blijven de resultaten van de bepaling nauwkeurig, zelfs wanneer een monster 30 minuten na toevoeging van de kalibrator in de gecoatete buisjes gepipetteerd wordt.

TIJDSPANNE

Serum $\mu g/ml$	0'	10'	20'	30'
C 1	25,3	30,3	28,8	29,3
C 2	101,8	105,8	106,3	101,5

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.
- Aanvaardingscriteria voor het verschil tussen de resultaten in duplo van stalen moeten steunen op gangbare laboratoriumpraktijken.

XV. REFERENTIE-INTERVALS

Deze waarden worden slechts als leidraad gegeven; elk laboratorium moet zijn eigen normaal bereik van waarden uitmaken.

Identificatie	Bereik (*) (µg/ml)	n
Mannen	22 - 55	16
Vrouwen	40 - 154	43

(*) Bereik gebaseerd op 2,5% & 97,5% percentielen.

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.

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.

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 werkruimte. Niet met de mond pipetteren. Draag beschermende kleding en gebruik wegwerphandschoenen.

XVII. BIBLIOGRAFIE

- BRIEN T.G., 1980
Free cortisol in human plasma.
Gorm. Metab. Res. 12, 643-650
- BRIEN T.G., 1981
Human corticosteroid binding globulin.
Clin. Endocrinol. 14, 193-212
- DAUGHADAY W.H., 1958
Binding of corticosteroid by plasma proteins. Corticosteroid-binding globulin activity in normal human beings and in certain disease states.
Arch. int. Med., 101, 286
- DE MOOR P., HEINVEGH K., HERREMANS J.F. and DECLERCK-RASKIN M., 1962
Protein-binding of corticosteroid studies by gel filtration.
J. Clin. Invest. 41, 816-827
- FAICT D. and DE MOOR P., 1984
Use of monoclonal antibodies in a RIA for human transcortin.
Clin. Chem. 30, 369-372
- HEYNS W., COOLENS J.L., VAN BAELEN H., and DE MOOR P.,
Dosage et signification du cortisol libre dans le sang.
Journal de Biophysique et Médecine Nucléaire, in press.

- PARTRIDGE W.M., 1981
Transport of protein-bound hormones into tissues in vivo.
Endocrine Reviews, 2, 103-123
- ROBIN P., PREDINE J. and MILGROM T., 1978
Assay of unbound cortisol in plasma.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 46, 277-282
- SAVU L., ZOUAGHI H., CARLI A., and NUNEZ E., 1981
Serum depletion of cortisolsteroid binding-activities, an early marker of human septic shock.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 102, 411-419
- SEAL U.S. and DOE R.P., 1962
Purification and properbes of transcortin, the cortisol binding globulin, from patients with cancer of the prostate.
Cancer Chemotherapy Reports, 16, 329-334
- SLAUWHITE W.R. and SANDBERG A.A., 1974
Transcortin : a corticosteroid-binding protein of plasma.
J. Clin. Invest. 38, 384-391
- VAN BAELEN H. and DE MOOR P., 1974
Immunochemical quantitation of human transcortin.
J. Clin. Endocrinol and Metab. 39, 160-163
- VAN BAELEN H., BIEPOELS R. and DE MOOR P., 1982
Transcortin Leuven : a variant of human corticosteroid-binding globulin with decreased cortisol binding affinity.
J. Biol. Chem., 257, 3397-3400.
- WESTPHAL U., 1971
Steroid-protein interactions.
Springer Verlag.
- WESTPHAL U., 1983
Corticosteroid-binding globulin. A review of some recent aspects.
Mol. Cell. Biochem, 55, 145-157
- ROSNER W., 1972
Recent studies on the binding of cortisol in serum.
J. Steroid Biochem., 3, 531-542

XVIII. SAMENVATTING VAN HET PROTOCOL

	TOTAAL-TELLINGEN (µl)	KALIBRATORS (µl)	MONSTER(S) CONTROLES (µl)
Kalibrators (0 - 6)	-	100	-
Monsters, Controles	-	-	100
Tracer	100	100	100
Anti-CBG	-	100	100
Incubatie	2 uur bij kamertemperatuur terwijl continu geschud wordt bij 400 tpm		
Scheiding Werk-wasoplossing Scheiding	-	Aspireer (of decanteer) 2,0 ml Aspireer (of decanteer)	
Telling	Tel buisjes gedurende 60 seconden		

DIAsource catalogusnummer: KIP1809	Bijsluitemummer : 1700481/nl	Revisienummer : 101109/1
---------------------------------------	---------------------------------	-----------------------------

Revisiedatum : 2010-11-09



Vor Gebrauch des Kits lesen Sie bitte diese Packungsbeilage.

CBG-RIA-CT

I. VERWENDUNGSZWECK

Ein Radio-Immunoassay für die quantitative *in vitro* Bestimmung von humanem Transkortin oder Kortikosteroid-bindendem Globulin (CBG) in Serum.

II. ALLGEMEINE INFORMATION

- A. **Handelsbezeichnung :** DIAsource CBG-RIA-CT Kit
- B. **Katalognummer :** KIP1809 : 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

A. Biologische Aktivität

Transkortin oder Kortikosteroid-bindendes Globulin (CBG) ist ein Plasma α_1 -Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 52000 Dalton. Es besitzt eine Steroidbindungsstelle mit einer Affinität (bei 37°C) zu Cortisol mit $3,10^7 M^{-1}$ und einer etwas geringeren Affinität zu Progesteron. Da die Plasmakonzentration von Transkortin zwischen 0,4 und $2,5 \cdot 10^{-6} M$ variiert, ist die größte Fraktion des Cortisols im Plasma an dieses Protein gebunden. Dieses an Transkortin gebundene Cortisol wird als biologisch inaktiv betrachtet, während das nicht gebundene Cortisol die aktive Form von Cortisol darstellt. Die aktive Fraktion des Plasmacortisols hängt somit von der Transkortin-Konzentration ab.

B. Klinische Anwendungen


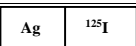
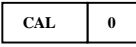
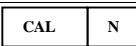
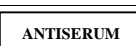

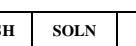
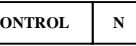
Die Transkortin-Konzentration im Plasma weist geringe oder keine Tagesschwankungen auf und bei Erwachsenen werden in Bezug auf Alter, Geschlecht oder Menstruationszyklus keine ausgesprochenen Unterschiede festgestellt. Im Nabelschnurblut beträgt der Transkortin-Wert jedoch nur die Hälfte der Werte bei gesunden Erwachsenen und präpubertäre Kinder weisen etwas höhere Werte als Erwachsene auf. Östrogen-therapie oder Östrogenimprägnierung während der Schwangerschaft führt zu einem sehr ausgesprochenen Anstieg der Transkortin-Konzentration. Herabgesetzte Transkortin-Werte werden bei bestimmten Phänomenen festgestellt: Hypoproteinämie, Cushing-Syndrom oder Kortikoid-Behandlung und einige Fälle von Vitamin B₁₂-Mangel. Extrem niedrige Transkortin-Werte wurden bei einigen Patienten mit septischem Schock berichtet. Weiters wurde eine seltene vererbte Form von Hypotranskortinämie beschrieben.

Die wichtigste klinische Anwendung der Transkortin-Bestimmungen ist die Interpretation von Cortisol-Werten, da damit die Konzentration von nicht gebundenem Cortisol, das biologisch aktiv ist, bestimmt werden kann. Die Konzentration des nicht gebundenen Cortisols kann auf der Grundlage der Massenwirkung nämlich aus der Konzentration des Gesamtcortisols und jener von Transkortin berechnet werden. Die Ergebnisse dieser Methode stimmen gut mit jenen aus zentrifugierten Ultrafiltrationen überein.

IV. GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

Eine festgesetzte Menge an ¹²⁵I-markiertem CBG konkurriert mit dem zu messenden, in der Probe oder in dem Kalibrator vorhandenen CBG um eine festgelegte Menge Anti-CBG Antikörper Bindungsstellen, die an die Ziege-Anti-Maus Antikörper (GAM) gebunden sind, die an der Wand des Polystyren-Röhrchens immobilisiert sind. Nach einer zweistündigen Inkubation bei Raumtemperatur, beendet das Absaugen die Verdrängungsreaktion. Die Röhrchen werden anschliessend mit Waschlösung gewaschen, danach wird nochmals abgesaugt. Eine Kalibrationskurve wird gedruckt und die CBG-Konzentrationen der Proben werden über Dosis Interpolation der Kalibrationskurve bestimmt.

V. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

Reagenz	96 Test Kit	Farbcode	Rekonstitution
 Röhrchen mit GAM (Ziege-Anti-Maus) beschichtet	2 x 48	schwarz	Gebrauchsfertig
 Tracer : ¹²⁵ Iod markiertes CBG in Phosphatpuffer mit Rinderserumalbumin und Azid (<0,1%)	1 Gefäß 10,5 ml 89 kBq	rot	Gebrauchsfertig
 Null Kalibrator in Phosphatpuffer mit Rinderserumalbumin und Azid (<0,1%)	1 Gefäß lyophilisiert	gelb	3 ml dest. Wasser zugeben
 Kalibratoren - N = 1 bis 6 (genaue Werte auf Gefäß-Etiketten) in Phosphatpuffer mit Rinderserumalbumin und Azid (<0,1%)	6 Gefäße lyophilisiert	gelb	1 ml dest. Wasser zugeben
 CBG Antiserum in Phosphatpuffer mit Rinderserumalbumin und Azid (<0,1%)	1 Gefäß 10,5 ml	blau	Gebrauchsfertig
 Dilutionspuffer: Phosphatpuffer mit Rinderserumalbumin und Azid (<0,1%)	1 Gefäß 110 ml	schwarz	Gebrauchsfertig
 Waschlösung (TRIS-HCl)	1 Gefäß 10 ml	braun	70x mit dest. Wasser (Magnetrihrer verwenden) verdünnen.
 Kontrollen- N = 1 oder 2: Phosphatpuffer mit humanserum (25 Mal verdünnt), Rinderserumalbumin und Azid (<0,1%)	2 Gefäße lyophilisiert	silber	0,5 ml dest. Wasser zugeben

Laut unserem Wissen, gibt es keine internationale Referenzen zu diesen Parametern.

VI. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

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

1. Dest. Wasser
2. Pipetten: 100 µl, 500 µl, 1 ml, 3 ml und 5 ml (Verwendung von Präzisionspipetten mit Einwegpipettenspitzen wird empfohlen)
3. Polystyrol-Wegwerfröhrchen (12 x 75 mm)
4. Vortexmixer
5. Schüttler für Röhrchen (400 rpm)
6. Magnetrihrer
7. 5 ml automatische Spritze (Cornwall-Typ) zum Waschen
8. Absaugsystem (optional)
9. 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 3 ml destilliertes Wasser, die anderen Kalibratoren mit 1 ml destilliertes Wasser.
- B. **Kontrollen** : Rekonstituieren Sie die Kontrollen mit 0,5 ml destilliertes Wasser.
- C. **Waschlösung**: Zur Vorbereitung eines angemessenen Volumens nutzbarer Waschlösung, mischen Sie zu einem Volumen Waschlösung (70x) 69 Volumen destilliertes Wasser. Benutzen Sie einen Magnetrihrer. 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 Kontrollen eine Woche bei 2 bis 8 °C stabil. Für eine längere Aufbewahrung sollten diese Reagenzien aliquotiert und bei -20°C eingefroren werden, dann sind sie 3 Monate haltbar.
- 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

- Serumproben müssen bei 2-8 °C aufbewahrt werden.
- Falls der Test nicht innerhalb von 48 Std. durchgeführt wird, müssen die Proben bei -20°C aufgehoben werden.
- Nach dem Auftauen sind die Proben zu mixen und zu zentrifugieren.
- **Die Proben müssen 25 Mal in Dilutionspuffer verdünnt werden. Empfohlenes Verfahren: 100 µl Serum + 2,4 ml Dilutionspuffer.**

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, Kontrollen und diluierten Proben kurz und geben Sie 100 µl von jedem in ihre Röhrchen.
3. Geben Sie 100 µl des ¹²⁵Iod markierten CBG in jedes Röhrchen, einschließlich der unbeschichteten Röhrchen für die Gesamtaktivität.
4. Geben Sie 100 µl CBG-Antiserum in jedes Röhrchen (außer Röhrchen für Gesamt).
5. Schütteln Sie vorsichtig die Halterung mit den Röhrchen um Blasen zu entfernen.
6. Inkubieren Sie 2 Stunden bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln (400 rpm).
7. Saugen Sie den Inhalt jedes Röhrchens ab (oder dekantieren) (außer Gesamtaktivität). Vergewissern Sie sich, dass die Plastikspitze des Absaugers den Boden des beschichteten Röhrchens erreicht, um die gesamte Flüssigkeit zu entfernen.
8. Waschen Sie die Röhrchen mit 2 ml Waschlösung (außer Gesamtaktivität) und saugen Sie ab. Vermeiden Sie Schaumbildung bei Zugabe der Waschlösung.
9. Lassen Sie 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.
2. Verwenden Sie semi-logarithmisches oder doppelt-logarithmisches Millimeterpapier (über 3 Größenordnungen) drucken Sie die (B/B0(%)) Werte für jeden Kalibratorpunkt als Funktion der CBG-Konzentration für jeden Kalibratorpunkt, schließen Sie offensichtliche „Ausreißer“ aus.
3. 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.
4. Bestimmen Sie die CBG-Konzentrationen der Proben über Interpolation der Probenwerte B/B0(%) der Referenzkurve.
5. Die auf der Kalibrationskurve der Proben und Kontrollen abgelesenen Werte müssen mit 25 multipliziert werden (Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors)
6. Bei jedem Assay muss der Prozentsatz des gesamten gebundenen Tracers ohne unmarkiertes CBG (B0/T) geprüft werden.

Berechnung des nicht gebundenen Cortisols

In menschlichem Serum ist Cortisol an Transkortin gebunden, darüber hinaus gibt es eine schwache, nicht zu sättigende Bindung an Albumin. Dieses simulative Bindegleichgewicht kann durch die folgende Gleichung dargestellt werden:

$$U^2K(1+N) + U(1+N+K)(T-C) - C = 0$$

In dieser Gleichung entspricht U der Molkonzentration des nicht gebundenen Cortisols, C der Molkonzentration des Gesamt-Cortisols und T der Transkortin-Konzentration. K entspricht der Affinität von Transkortin zu Cortisol bei 37°C und N dem Verhältnis von Albumingebundenem zu nicht gebundenem Cortisol. Diese Gleichung kann für U folgendermaßen gelöst werden:

$$U = \sqrt{Z^2 + \frac{C}{(1+N)K}} - ZM$$

wobei: $Z = \frac{1}{2K} + \frac{T-C}{2(1+N)}M$

oder quantitativ unter der Annahme eines Wertes für K von $3 \times 10^{-7} M^{-1}$ und eines Wertes für N von 1,74 und wenn U, C und T als μM ausgedrückt werden.

$$U = \sqrt{Z^2 + 0,0122C} - Z^{\mu M}$$

wobei: Z = 0,0167 + 0,182 (T-C) μM

Zur Konversion der in μg oder in ng/ml ausgedrückten Cortisol-Konzentration in μM -Werte wird respektive durch 36,2 oder 362 dividiert, zur Konversion der in $\mu g/ml$ ausgedrückten Transkortin-Konzentrationen in μM -Werte wird durch 52 dividiert. Der für U erzielte Wert (in μM) kann durch Multiplikation mit 36,2 in μg oder durch Multiplikation mit 362 in ng/ml umgerechnet werden.

Beispiel einer Berechnung: Nehmen wir an, dass die erreichten Werte für Transkortin und Gesamt-Cortisol respektive 40 $\mu g/ml$ und 130 ng/ml betragen.

· Transkortin-Werte in μM : $\frac{40}{52} = 0,77 \mu M$

· Gesamt-Cortisol-Werte in μM : $\frac{130}{362} = 0,36 \mu M$

· Z = 0,0167 + 0,182 (0,77-0,36) = 0,09 μM

· U = $\sqrt{0,09^2 + (0,0122 \times 0,36)} - 0,09 = 0,021 \mu M$

· Konzentration des nicht gebundenen Cortisols in ng/ml: $0,021 \times 362 = 7,8$ ng/ml.

XII. TYPISCHE WERTE

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

CBG	cpm	B/B0 (%)
Gesamtaktivität	42523	
Kalibrator		
0,00 $\mu g/ml$	17216	100,0
0,44 $\mu g/ml$	15282	89,6
0,81 $\mu g/ml$	13081	80,3
1,50 $\mu g/ml$	10162	61,6
2,20 $\mu g/ml$	8292	48,6
4,00 $\mu g/ml$	4429	21,2
8,00 $\mu g/ml$	2633	11,3

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 0,26 $\mu g/ml$.

B. Präzision

INTRA-ASSAY PRÄZISION

INTER-ASSAY PRÄZISION

Serum	N	<X> \pm SD ($\mu g/ml$)	CV (%)	Serum	N	<X> \pm SD ($\mu g/ml$)	CV (%)
A	20	23,1 \pm 2,0	8,6	A	14	24,7 \pm 2,7	10,8
B	20	83,3 \pm 3,2	3,9	B	14	113,8 \pm 5,5	4,8

SD : Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

C. Genauigkeit

VERDÜNNUNGSTEST

Probe	Verdünnung	Theoretische Konzent. ($\mu g/ml$)	Gemessene Konzent. ($\mu g/ml$)
A	1/8	-	5,5
	1/16	2,75	3,2
	1/32	1,38	1,5
	1/64	0,69	0,69
	1/128	0,34	0,44

Die Proben wurden mit Null-Kalibrator verdünnt.

WIEDERFINDUNGSTEST

Probe	Zugeg. CBG ($\mu g/ml$)	Wiedergef. CBG ($\mu g/ml$)	Wiedergefunden (%)
1	0,46	0,4	87,0%
	0,88	1	113,6%
	1,4	1,3	92,9%
	2,1	2,2	104,8%
	4,3	4,1	95,3%
	8,7	9,4	108,0%

D. Zeitverzögerung zwischen letzter Kalibrator- und Probenzugabe

Es wird im folgenden gezeigt, dass die Genauigkeit der Tests selbst dann erhalten bleibt, wenn die Probe 30 Minuten nach Zugabe des Kalibrators in die beschichteten Röhrchen zugeführt wird.

ZEITABSTAND

Serum $\mu g/ml$	0'	10'	20'	30'
C 1	25,3	30,3	28,8	29,3
C 2	101,8	105,8	106,3	101,5

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.
- Akzeptanzkriterien für die Differenz zwischen den Resultaten der Wiederholungstests anhand der Proben müssen auf Guter Laborpraxis beruhen.

XV. ZU ERWARTENDER BEREICH

Diese Werte sind nur Richtwerte; jedes Labor muss seinen eigenen Normalwertbereich ermitteln.

Identifikation	Bereich (*) ($\mu g/ml$)	n
Männer	22 - 55	16
Frauen	40 - 154	43

(*) Bereich auf Basis der 2,5% und 97,5% Perzentile

XVI. VORSICHTMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

Sicherheit

Nur für diagnostische Zwecke. Dieser Kit enthält ^{125}I (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 Endverbraucher. In keinem Fall darf das Produkt an Menschen oder Tieren angewendet werden.

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 Laborausstattung 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.

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 Waschstufen 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.

XVII. LITERATUR

- BRIEN T.G., 1980
Free cortisol in human plasma.
Gorm. Metab. Res. 12, 643-650
- BRIEN T.G., 1981
Human corticosteroid binding globulin.
Clin. Endocrinol. 14, 193-212
- DAUGHADAY W.H., 1958
Binding of corticosteroid by plasma proteins. Corticosteroid-binding globulin activity in normal human beings and in certain disease states.
Arch. int. Med., 101, 286
- DE MOOR P., HEINVEGH K., HERREMANS J.F. and DECLERCK-RASKIN M., 1962
Protein-binding of corticosteroid studies by gel filtration. J. Clin. Invest. 41, 816-827
- FAICT D. and DE MOOR P., 1984
Use of monoclonal antibodies in a RIA for human transcortin.
Clin. Chem. 30, 369-372
- HEYNS W., COOLENS J.L., VAN BAELEN H., and DE MOOR P.,
Dosage et signification du cortisol libre dans le sang.
Journal de Biophysique et Médecine Nucléaire, in press.
- PARTRIDGE W.M., 1981
Transport of protein-bound hormones into tissues in vivo.
Endocrine Reviews, 2, 103-123
- ROBIN P., PREDINE J. and MILGROM T., 1978
Assay of unbound cortisol in plasma.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 46, 277-282
- SAVU L., ZOUAGHI H., CARLI A., and NUNEZ E., 1981
Serum depletion of cortisolsteroid binding-activities, an early marker of human septic shock.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 102, 411-419

- SEAL U.S. and DOE R.P., 1962
Purification and properbes of transcortin, the cortisol binding globulin, from patients with cancer of the prostate.
Cancer Chemotherapy Reports, 16, 329-334
- SLAUWHITE W.R. and SANDBERG A.A., 1974
Transcortin : a corticosteroid-binding protein of plasma.
J. Clin. Invest. 38, 384-391
- VAN BAELEN H. and DE MOOR P., 1974
Immunochemical quantitation of human transcortin.
J. Clin. Endocrinol and Metab. 39, 160-163
- VAN BAELEN H., BIEPOELS R. and DE MOOR P., 1982
Transcortin Leuven : a variant of human corticosteroid-binding globulin with decreased cortisol binding affinity.
J. Biol. Chem., 257, 3397-3400.
- WESTPHAL U., 1971
Steroid-protein interactions.
Springer Verlag.
- WESTPHAL U., 1983
Corticosteroid-binding globulin. A review of some recent aspects.
Mol. Cell. Biochem, 55, 145-157
- ROSNER W., 1972
Recent studies on the binding of cortisol in serum.
J. Steroid Biochem., 3, 531-542

XVIII. ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

	GESAMT-AKTIVITÄT (µl)	KALIBRATOREN (µl)	PROBE(N)-KONTROLLEN (µl)
Kalibratoren (0 bis 6)	-	100	-
Proben, Kontrollen	-	-	100
Tracer	100	100	100
Anti-CBG	-	100	100
Inkubation	2 Stunden bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln (400 rpm).		
Separation Waschlösung Separation	-	Absaugen (oder dekantieren) 2,0 ml Absaugen (oder dekantieren)	
Auswertung	Messen der Röhren 60 Sekunden		

DIAsource Katalognummer: KIP1809	Beipackzettelnummer: 1700481/de	Nummer der Originalausgabe: 101109/1
-------------------------------------	------------------------------------	--

Revisionsdatum : 2010-11-09



es

Leer el protocolo completo antes de usar.

CBG-RIA-CT

I. INSTRUCCIONES DE USO

Radioinmunoensayo para la determinación cuantitativa in vitro de la Transcortina o Globulina Transportadora de Corticosteroides (CBG) humana en suero.

II. INFORMACIÓN GENERAL

- A. **Nombre:** DIAsource CBG-RIA-CT Kit
- B. **Número de Catálogo:** KIP1809 : 96 tests
- C. **Fabricado por:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgium.

Para cuestiones técnicas e información sobre pedidos contactar :

Tel : +32 (0)67 88.99.99

Fax : +32 (0)67 88.99.96

III. INFORMACIÓN CLÍNICA

A. Actividades Biológicas

La transcortina o Globulina Transportadora de Corticosteroides (CBG) es una α_1 -glicoproteína plasmática con un peso molecular de aproximadamente 52000 Dalton. Contiene un sitio único de ligación con esteroides con una afinidad (a 37°C) con el cortisol de $3.10^7 M^{-1}$ y una afinidad un poco más baja con la progesterona. Visto que la concentración de la transcortina en plasma varía entre 0.4 y $2.5 \cdot 10^{-6} M$, la fracción principal del cortisol en plasma está ligada a esta proteína. Este cortisol ligado a la transcortina es considerado como biológicamente inactivo, mientras que el cortisol libre es la forma activa del cortisol. Así la fracción activa del cortisol en plasma depende de la concentración de la transcortina.

B. Aplicación clínica


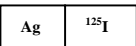
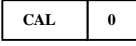
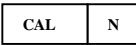

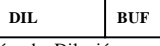

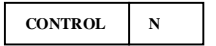
La concentración de la transcortina en plasma muestra poca o ninguna variación diurna y no se observan diferencias marcadas en sujetos adultos de acuerdo con la edad, el sexo o el ciclo menstrual. Sin embargo, la transcortina está presente en la sangre umbilical a la mitad del valor del adulto normal, y niños prepúberos tienen valores un poco más elevados que los adultos. La terapia con estrógeno o la impregnación estrógena durante el embarazo causan un aumento muy marcado de la concentración de la transcortina. Valores de transcortina disminuidos se observan en varias situaciones: hipoproteinemia, síndrome de Cushing o tratamiento corticoide y en algunos casos de deficiencia de vitamina B₁₂. Valores de transcortina extremadamente bajos se han observado en unos pocos pacientes con un shock séptico. Además de eso, una forma hereditaria rara de hipotranscortinemia ha sido descrita.

La aplicación clínica más importante de la medición de transcortina es la interpretación de los valores de cortisol, visto que permite determinar la concentración de cortisol libre, que es biológicamente activo. La concentración de cortisol libre puede ser calculada a partir de la concentración de cortisol total y de la concentración de transcortina en base a la acción de masa. Los resultados de este método coinciden con los resultados obtenidos con ultrafiltrados centrifugados.

IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

Una cantidad fija de CBG marcada con ^{125}I compete con el CBG a medir, presente en la muestra o en el calibrador, para una cantidad fija de sitios antigénicos para anti-CBG, que están unidos a los anticuerpos de cabra anti-ratón (GAM) que están inmovilizados en la pared de un tubo plástico. Después de 2 horas de incubación a T.A., una aspiración termina con la reacción de competición. Los tubos se lavan con 2 ml de Solución de lavado y se aspiran otra vez. Se dibuja la curva de calibración y las concentraciones de CBG 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 GAM (cabra anti-ratón)	2 x 48	negro	Listo para uso
 Ag ^{125}I TRAZADOR: CBG marcado con ^{125}I (grado HPLC) en tampón fosfato con albúmina bovina y azida (<0,1%)	1 vial 10,5 ml 89 kBq	rojo	Listo para uso
 CAL 0 Calibrador cero en tampón fosfato con albúmina bovina y azida (<0,1%)	1 vial liofilizados	amarillo	Añadir 3 ml de agua destilada
 CAL N Calibradores N = 1 a 6 (mirar los valores exactos en las etiquetas) en tampón fosfato con albúmina bovina y azida (<0,1%)	6 viales líoilizados	amarillo	Añadir 1 ml de agua destilada
 ANTISERUM Antisero CBG en tampón fosfato con albúmina bovina y azida (<0,1%)	1 vial 10,5 ml	Azul	Listo para uso
 DIL BUF Tampón de Dilución en tampón fosfato con albúmina bovina y azida (<0,1%)	1 vial 110 ml	negro	Listo para uso
 WASH SOLN CONC Solución de lavado (TRIS-HCl)	1 vial 10 ml	marrón	Diluir 70 x con agua destilada (utilizar agitador magnético)
 CONTROL N Controles - N = 1 o 2: en tampón fosfato con suero humano (diluido 25x), albúmina bovina y azida (<0,1%)	2 viales líoilizados	plateado	Añadir 0,5 ml de agua destilada

De acuerdo con nuestros conocimientos, no existe ninguna preparación de referencia internacional de este parámetro.

VI. MATERIAL NO SUMINISTRADO

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

1. Agua destilada
2. Pipetas de 100 μl , 500 μl , 1 ml, 3 ml y 5 ml (Se recomienda el uso de pipetas precisas con puntas desechables de plástico)
3. Tubos plásticos desechables (12 x 75 mm)
4. Vortex
5. Agitador de tubos (400 rpm)
6. Agitador magnético
6. Jeringa automática 5 ml (tipo Cornwall) para el lavado
7. Sistema de aspiración (opcional)
8. Contador de radiaciones gamma para medir ^{125}I (mínima eficiencia 70%)

VII. PREPARACIÓN REACTIVOS

- A. **Calibradores:** Reconstituir el calibrador cero con 3 ml de agua destilada y otros calibradores con 1 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 69 partes de agua destilada por 1 parte de Solución de lavado (70x). 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 o 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, alícuotar y guardar a -20°C. Evitar congelar y descongelar sucesivamente.
- 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 o deterioro.

IX. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

- Las muestras de suero deben ser guardadas a 2-8°C.
- Si el ensayo no se realiza en 48 hrs., almacenar las muestras a -20°.
- Evitar congelar y descongelar sucesivamente.
- Después de descongelar, las muestras deben ser mezcladas y centrifugadas.
- **Las muestras deben ser diluidas 25 veces en el Tampón de Dilución. Procedimiento recomendado: 100 μl suero + 2,4 ml de Tampón de Dilución.**

X. PROTOCOLO

- A. **Notas de manejo**
No utilizar el kit o componentes después de la fecha de caducidad. No mezclar reactivos de diferente número de lote. Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente antes de su uso.
Agitar minuciosamente todos los reactivos y muestras, agitándolos o girándolos suavemente. Con el fin de evitar contaminación cruzada utilizar puntas de pipetas desechables y limpias para la adición de cada reactivo y muestra.
El uso de pipetas de precisión o equipamiento de dispensación automática mejorará 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**
 1. Marcar los tubos recubiertos por duplicado para cada uno de los estándares, muestras y controles. Para la determinación de las Cuentas Totales, marcar 2 tubos normales.
 2. Agitar brevemente los calibradores, controles y muestras diluidas y dispensar 100 μl de cada uno en sus respectivos tubos.
 3. Dispensar 100 μL del anti-CBG- ^{125}I tracer en cada tubo, incluido los de Cuentas Totales.
 4. Dispensar 100 μl del antisuero CBG en cada tubo (excepto cuentas totales).
 5. Agitar suavemente la gradilla de tubos para eliminar cualquier burbuja pegada de las paredes de los tubos.
 6. Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación constante (400 rpm).
 7. Aspirar (o decantar) 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.
 8. 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
 9. Dejar los tubos en posición inversa durante 2 minutos y aspirar el líquido restante.
 10. Medir la actividad de cada tubo durante 60 segundos en un Contador Gamma.

XI. CALCULO DE RESULTADOS

1. Calcular la media de los duplicados.
2. Utilizando papel 3 ciclo semilogarítmico o logit-log, representar los valores de (B/B0%) para cada punto de calibración como función de la concentración del CBG de cada punto calibrador Rechazar aquellos que están claramente en los extremos.
3. Métodos computarizados pueden ser utilizados para la construcción de la curva de calibración. Si se utiliza un sistema automático de cálculo de resultados, se recomienda usar la representación gráfica "4 parámetros".
4. Por interpolación de los valores (B/B0%) de las muestras, se determinan los valores de las concentraciones de las mismas desde la curva de calibración.
5. Las concentraciones leídas en la curva de calibración para las muestras y los controles se deben multiplicar por 25 (factor de la dilución).
6. El porcentaje total de enlace del trazador en ausencia de CBG no marcado (B0/T) debe ser calculado en cada ensayo.

Cálculo de cortisol no ligado

En suero humano, el cortisol está ligado a la transcortina, y, además hay una ligación no saturable débil a la albumina. Este equilibrio de ligación simultáneo puede ser representado por la ecuación siguiente:

$$U^2 K (1+N) + U (1+N+K (T-C)) - C = 0$$

En esta ecuación, U representa la concentración molar del cortisol no ligado, C la concentración molar total de cortisol y T la concentración de transcortina. K corresponde a la afinidad de la transcortina con el cortisol a 37°C y N a la proporción de albumina unida al cortisol no ligado. Esta ecuación puede ser resuelta para U como :

$$U = \sqrt{Z^2 + \frac{C}{(1+N)K}} - ZM$$

con : $Z = \frac{1}{2K} + \frac{T-C}{2(1+N)} M$

o cuantitativamente, asumiendo el valor de K como $3 \times 10^{-7} M^{-1}$ y un valor de N de 1.74 y expresando U, C y T como μM .

$$U = \sqrt{Z^2 + 0.0122C} - Z^{\mu M}$$

con : $Z = 0.0167 + 0.182(T-C)\mu M$

Para convertir las concentraciones de cortisol en μg o en ng/ml a valores μM , dividir respectivamente por 36.2 o 362; para convertir las concentraciones de transcortina en $\mu g/ml$ a valores μM , dividir por 52. El valor obtenido de U (en μM) puede ser convertido a $\mu g\%$ multiplicándolo por 36.2 o a ng/ml multiplicándolo por 362.

Ejemplo de cálculo : presuponiendo que el valor de transcortina obtenido y el valor total de cortisol son respectivamente 40 $\mu g/ml$ y 130 ng/ml

· Valores de transcortina en μM : $\frac{40}{52} = 0.77\mu M$

· Valores totales de cortisol en μM : $\frac{130}{362} = 0.36\mu M$

· $Z = 0.0167 + 0.182(0.77-0.36) = 0.09 \mu M$

· $U = \sqrt{0.09^2 + (0.0122 \times 0.36)} - 0.09 = 0.021\mu M$

· Concentración de cortisol no ligado en ng/ml : $0.021 \times 362 = 7.8 \text{ ng/ml}$.

XII. EJEMPLO DE RESULTADOS

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

CBG	cpm	B/B0 (%)
Cuentas Totales	42523	
Calibrador		
0,00 $\mu g/ml$	17216	100,0
0,44 $\mu g/ml$	15282	89,6
0,81 $\mu g/ml$	13081	80,3
1,50 $\mu g/ml$	10162	61,6
2,20 $\mu g/ml$	8292	48,6
4,00 $\mu g/ml$	4429	21,2
8,00 $\mu g/ml$	2633	11,3

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 0,26 $\mu g/ml$.

B. Precisión

PRECISION INTRA-ENSAYO

PRECISION INTER-ENSAYO

Suero	N	<X> \pm SD ($\mu g/ml$)	CV (%)	Suero	N	<X> \pm SD ($\mu g/ml$)	CV (%)
A	20	23,1 \pm 2,0	8,6	A	14	24,7 \pm 2,7	10,8
B	20	83,3 \pm 3,2	3,9	B	14	113,8 \pm 5,5	4,8

SD : Desviación Estándar; CV: Coeficiente de Variación

C. Exactitud

TEST DILUCIÓN

Muestra	Dilución	Concent. Teórica ($\mu g/ml$)	Concent. Medida ($\mu g/ml$)
A	1/8	-	5,5
	1/16	2,75	3,2
	1/32	1,38	1,5
	1/64	0,69	0,69
	1/128	0,34	0,44

Las muestras fueron diluidas con el Calibrador cero,

TEST DE RECUPERACIÓN

Muestra	CBG añadido ($\mu g/ml$)	CBG Recuperado ($\mu g/ml$)	Recuperado (%)
1	0,46	0,4	87,0%
	0,88	1	113,6%
	1,4	1,3	92,9%
	2,1	2,2	104,8%
	4,3	4,1	95,3%
	8,7	9,4	108,0%

D. 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 30 minutos después de haberse adicionado el calibrador a los tubos cubiertos.

TIEMPO DE ESPERA

Suero $\mu g/ml$	0'	10'	20'	30'
C 1	25,3	30,3	28,8	29,3
C 2	101,8	105,8	106,3	101,5

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.
- Los criterios de aceptación de la diferencia entre los resultados de las muestras en duplicado deben depender de las Buenas Prácticas de Laboratorio

XV. INTERVALOS DE REFERENCIA

Estos valores solamente sirven de pauta; cada laboratorio tiene que establecer sus propios valores normales.

Identificación	Alcance (*) (µg/ml)	n
Hombres	22 - 55	16
Mujeres	40 - 154	43

(*) Alcance basados en percentilos de 2,5% & 97,5%

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 e intercambio de productos radiactivos están sujetos a la legislación del país del usuario. En ningún caso el producto deberá ser suministrado a humanos o animales. Todo el manejo de producto radiactivo se hará en un área señalizada, diferente de la de paso regular. Deberá de utilizarse un libro de registros y almacenaje de productos radiactivos utilizados, que permanecerá en el laboratorio. El material de laboratorio y de vidrio que podría estar contaminado radiactivamente deberá separarse para evitar la contaminación cruzada con otros radioisótopos.

Cualquier derramamiento radiactivo deberá ser limpiado de inmediato de acuerdo con los procedimientos de seguridad. Los desperdicios radiactivos deberán ser eliminados 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.

Los componentes de sangre humana utilizados en este kit han sido testados por métodos aprobados por la CEE y/o la FDA dando negativo para 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 u 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 considerados como potencialmente infecciosos.

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 desechables.

XVII. BIBLIOGRAFIA

- BRIEN T.G., 1980
Free cortisol in human plasma.
Gorm. Metab. Res. 12, 643-650
- BRIEN T.G., 1981
Human corticosteroid binding globulin.
Clin. Endocrinol. 14, 193-212
- DAUGHADAY W.H., 1958
Binding of corticosteroid by plasma proteins. Corticosteroid-binding globulin activity in normal human beings and in certain disease states.
Arch. int. Med., 101, 286
- DE MOOR P., HEINVEGH K., HERREMANS J.F. and DECLERCK-RASKIN M., 1962
Protein-binding of corticosteroid studies by gel filtration.
J. Clin. Invest. 41, 816-827
- FAICT D. and DE MOOR P., 1984
Use of monoclonal antibodies in a RIA for human transcortin.
Clin. Chem. 30, 369-372
- HEYNS W., COOLENS J.L., VAN BAELEN H., and DE MOOR P.,
Dosage et signification du cortisol libre dans le sang.
Journal de Biophysique et Médecine Nucléaire, in press.
- PARTRIDGE W.M., 1981
Transport of protein-bound hormones into tissues in vivo.
Endocrine Reviews, 2, 103-123

- ROBIN P., PREDINE J. and MILGROM T., 1978
Assay of unbound cortisol in plasma.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 46, 277-282
- SAVU L., ZOUAGHI H., CARLI A., and NUNEZ E., 1981
Serum depletion of corticosteroid binding-activities, an early marker of human septic shock.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 102, 411-419
- SEAL U.S. and DOE R.P., 1962
Purification and properbes of transcortin, the cortisol binding globulin, from patients with cancer of the prostate.
Cancer Chemotherapy Reports, 16, 329-334
- SLAUWHITE W.R. and SANDBERG A.A., 1974
Transcortin : a corticosteroid-binding protein of plasma.
J. Clin. Invest. 38, 384-391
- VAN BAELEN H. and DE MOOR P., 1974
Immunochemical quantitation of human transcortin.
J. Clin. Endocrinol and Metab. 39, 160-163
- VAN BAELEN H., BIEPOELS R. and DE MOOR P., 1982
Transcortin Leuven : a variant of human corticosteroid-binding globulin with decreased cortisol binding affinity.
J. Biol. Chem., 257, 3397-3400.
- WESTPHAL U., 1971
Steroid-protein interactions.
Springer Verlag.
- WESTPHAL U., 1983
Corticosteroid-binding globulin. A review of some recent aspects.
Mol. Cell. Biochem, 55, 145-157
- ROSNER W., 1972
Recent studies on the binding of cortisol in serum.
J. Steroid Biochem., 3, 531-542

XVIII. RESUMEN DEL PROTOCOLO

	CUENTAS TOTALES (µl)	CALIBRADO RES (µl)	MUESTRA(S) CONTROL(ES) (µl)
Calibradores (0 - 6)	-	100	-
Muestras, controles	-	-	100
Trazador	100	100	100
Anti-CBG	-	100	100
Incubación	2 horas a temperatura ambiente en agitación constante (400 rpm).		
Separación	-	aspirar (o decantar)	
Solución de lavado de trabajo		2,0 ml	
Separación		aspirar (o decantar)	
Contaje	Contar los tubos durante 60 segundos		

DIAsource Catalogo Nr : KIP1809	P.I. Numero : 1700481/es	Revisión nr : 101109/1
------------------------------------	-----------------------------	---------------------------

Fecha de la revisión : 2010-11-09



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

CBG-RIA-CT

I. USO DEL KIT

Kit radioimmunologico per la determinazione quantitativa in vitro della transcortina umana o globulina legante i corticosteroidi (CBG) nel siero.

II. INFORMAZIONI DI CARATTERE GENERALE

- A. **Nome commerciale:** DIAsource CBG-RIA-CT Kit
- B. **Numero di catalogo:** KIP1809 : 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

A. Attività biologiche

La transcortina o globulina legante i corticosteroidi (CBG) è una α_1 -glicoproteina del plasma con peso molecolare di circa 52000 Dalton. Contiene un unico sito di legame steroideo con un'affinità (a 37°C) per il cortisolo di $3,10^7 M^{-1}$ e affinità leggermente inferiore per il progesterone. Poiché la concentrazione plasmatica di transcortina varia da 0,4 a $2,5 \cdot 10^{-6} M$, la frazione maggiore di cortisolo nel plasma è legata a questa proteina. Il cortisolo legato alla transcortina è considerato biologicamente inattivo, mentre il cortisolo non legato costituisce la forma attiva del cortisolo. La frazione attiva del cortisolo plasmatico dipende pertanto dalla concentrazione di transcortina.

B. Applicazioni cliniche


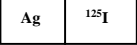

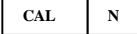



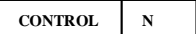
La concentrazione plasmatica di transcortina fa rilevare una variazione diurna lieve o del tutto assente e non si osservano differenze notevoli nei soggetti adulti in base all'età, al sesso o al ciclo mestruale. Tuttavia, nel sangue del fucolo ombelicale, la transcortina risulta presente in una quantità pari alla metà del livello normalmente presente negli adulti, mentre nei bambini nel periodo prima della pubertà i livelli sono leggermente più alti rispetto agli adulti. Una terapia a base di estrogeni o l'impregnazione estrogenica in gravidanza provoca un aumento considerevole della concentrazione di transcortina. Livelli minori di transcortina si osservano in numerose condizioni: ipoproteinemia, sindrome di Cushing o terapia a base di corticoidi e in alcuni casi di deficit di vitamina B₁₂. In alcuni pazienti interessati da shock settico si sono registrati livelli estremamente bassi di transcortina. Inoltre, è stata descritta una rara forma di ipotranscortinemia ereditaria.

L'applicazione clinica più importante della misurazione della transcortina consiste nell'interpretazione dei livelli di cortisolo, interpretazione che consente di valutare la concentrazione di cortisolo non legato biologicamente attiva. Infatti, è possibile calcolare la concentrazione di cortisolo non legato in base alla concentrazione di cortisolo totale e di transcortina sulla base dell'azione di massa. I risultati di questo metodo si correlano bene con quelli ottenuti dalle ultrafiltrazioni centrifugate.

IV. PRINCIPIO DEL METODO

Una quantità definita di CBG marcato con ^{125}I compete con il CBG presente nel calibratore o nel campione per una quantità fissa di siti dell'anticorpo anti-CBG, che sono legati agli anticorpi capra anti-topo (GAM) immobilizzati sulla parete di una provetta di polistirene. Dopo 2 ore di incubazione a temperatura ambiente, la reazione di competizione viene interrotta per aspirazione della miscela di reazione. Le provette vengono quindi lavate con tampone di lavaggio diluito e aspirate. La concentrazione di CBG nei campioni viene calcolata per interpolazione sulla curva calibratore.

IV. REATTIVI FORNITI

Reattivi	Kit da 96 test	Codice colore	Volume di ricostituzione
 Provette rivestite con GAM (capra anti-topo)	2 x 48	nero	Pronte per l'uso
 Marcato: CBG marcato con ^{125}I in tampone fosfato con BSA e sodio azide (<0,1%)	1 flacone 10,5 ml 89 kBq	rosso	Pronto per l'uso
 Calibratore zero in tampone fosfato con BSA e sodio azide (<0,1%)	1 flacone liofilizzati	giallo	Aggiungere 3 ml di acqua distillata
 Calibratore - N = da 1 a 6 (le concentrazioni esatte dei calibratori sono riportate sulle etichette dei flaconi) in tampone fosfato con BSA e sodio azide (<0,1%)	6 flacone liofilizzati	giallo	Aggiungere 1 ml di acqua distillata
 Antisiero CBG in tampone fosfato con BSA e sodio azide (<0,1%)	1 flacone 10,5 ml	blu	Pronte per l'uso
 Tampone di diluizione: tampone fosfato con BSA e sodio azide (<0,1%)	1 flacone 110 ml	nero	Pronto per l'uso
 Tampone di lavaggio (TRIS-HCl)	1 flacone 10 ml	bruno	Diluire 70 x con acqua distillata usando un agitatore magnetico
 Controlli - N = 1 or 2: tampone fosfato con siero umano (diluito x 25), BSA e sodio azide (<0,1%)	2 flaconi liofilizzati	argento	Aggiungere 0,5 ml di acqua distillata

Al momento non risulta disponibile un calibratore di riferimento internazionale per questo parametro.

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 , 1 ml, 3 ml e 5 ml (Si raccomanda di utilizzare pipette accurate con puntale in plastica monouso).
3. Provette monouso in polistirene (12 x 75 mm)
4. Agitatore tipo vortex.
5. Agitatore rotante (400 rpm).
6. Agitatore magnetico.
7. Pipetta a ripetizione automatica 5 ml per i lavaggi.
8. Sistema di aspirazione dei campioni (facoltativo).
9. Contatore gamma con finestra per ^{125}I (efficienza minima 70%)

VII. PREPARAZIONE DEI REATTIVI

- A. **Calibratore:** Ricostituire il calibratore zero con 3 ml di acqua distillata e gli altri calibratori con 1 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 69 parti di acqua distillata ad una parte di tampone di lavaggio concentrato (70x). 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. Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelo dei campioni.
- 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 a 2-8°C.
- Se non si desidera eseguire il dosaggio entro 48 ore dal prelievo, si raccomanda di conservare i campioni a -20°C.
- Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelo dei campioni.
- Terminato lo scongelamento, i campioni devono essere mescolati e centrifugati.
- **I campioni devono essere diluiti 25 volte nel tampone di diluizione. Procedura consigliata: 100 μl di siero + 2,4 ml di tampone di diluizione.**

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 diluiti e controlli. Dispensare 100 μl di calibratore, campioni diluiti e controlli nelle rispettive provette.
3. Dispensare 100 μl di CBG marcato con ^{125}I in tutte le provette, comprese quelle per l'attività totale.
4. Dispensare 100 μl di antisiero CBG in ogni provetta (ad eccezione dell'attività totale).
5. Scuotere gentilmente il portaprovette per liberare eventuali bolle d'aria intrappolate nel liquido contenuto nelle provette.
6. Incubare 2 ore a temperatura ambiente sotto agitazione (400 rpm).
7. Aspirare (o far decantare) 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.
8. 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.
9. Lasciare decantare le provette in posizione verticale per due minuti circa e aspirare eventuali gocce di liquido residue.
10. Contare tutte le provette per 1 minuto con il contatore gamma.

XI. CALCOLO DEI RISULTATI

1. Calcolare la media delle determinazioni in duplicato.
2. 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 CBG, tracciare la curva di taratura, scartare i valori palesemente discordanti.
3. È possibile utilizzare un sistema di interpolazione dati automatizzato. Con un sistema automatico di interpolazione dati, utilizzare la curva a 4 parametri.
4. Per interpolazione sulla curva di taratura dei rapporti di competizione di campioni e controlli, determinare le rispettive concentrazioni di CBG.
5. Le concentrazioni lette sulla curva di taratura per i campioni e per i controlli dovranno essere moltiplicate per 25 (fattore di diluizione).
6. Per ogni dosaggio determinare la capacità legante B0/T.

Calcolo del cortisolo non legato

Nel siero umano il cortisolo è legato alla transcortina, ed è presente inoltre anche qualche debole legame non saturabile con l'albumina. Questo equilibrio di legame simultaneo può essere rappresentato con la seguente equazione:

$$U^2K(1+N) + U(1+N+K(T-C)) - C = 0$$

In questa equazione, U rappresenta la concentrazione molare di cortisolo non legato, C la concentrazione molare di cortisolo totale e T la concentrazione di transcortina. K corrisponde all'affinità della transcortina per il cortisolo a 37°C e N alla proporzione del cortisolo legato all'albumina rispetto a quello non legato. Il valore U di questa equazione può essere calcolato nel seguente modo:

$$U = \sqrt{Z^2 + \frac{C}{(1+N)K}} - ZM$$

dove in: $Z = \frac{1}{2K} + \frac{T-C}{2(1+N)}M$

oppure quantitativamente, considerando un valore per K di $3 \times 10^{-7} M^{-1}$ ed un valore per N di 1,74 ed indicando U, C e T come μM .

$$U = \sqrt{Z^2 + 0,0122C} - Z^{\mu M}$$

dove in: $Z = 0,0167 + 0,182(T-C)\mu M$

Per convertire le concentrazioni di cortisolo in μg o in ng/ml in valori μM , dividere rispettivamente per 36,2 o 362 per convertire le concentrazioni di transcortina in $\mu g/ml$ in valori μM , dividere per 52. Il valore ottenuto di U (in μM) può essere convertito in $\mu g\%$ moltiplicando per 36,2 o ng/ml moltiplicando per 362.

Esempio di calcolo: supponiamo che i valori complessivi di transcortina e cortisolo ottenuti siano rispettivamente di 40 $\mu g/ml$ e 130 ng/ml

• Livelli di transcortina in μM : $\frac{40}{52} = 0,77\mu M$

• Livelli complessivi di cortisolo in μM : $\frac{130}{362} = 0,36\mu M$

• $Z = 0,0167 + 0,182(0,77-0,36) = 0,09\mu M$

• $U = \sqrt{0,09^2 + (0,0122 \times 0,36)} - 0,09 = 0,021\mu M$

• Concentrazione di cortisolo non legato in ng/ml : $0,021 \times 362 = 7,8\ ng/ml$.

XII. CARATTERISTICHE TIPICHE

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

CBG	cpm	B/B0 (%)
Attività totale	42523	
Calibratore		
0,00 $\mu g/ml$	17216	100,0
0,44 $\mu g/ml$	15282	89,6
0,81 $\mu g/ml$	13081	80,3
1,50 $\mu g/ml$	10162	61,6
2,20 $\mu g/ml$	8292	48,6
4,00 $\mu g/ml$	4429	21,2
8,00 $\mu g/ml$	2633	11,3

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 del calibratore zero, è risultata essere 0,26 $\mu g/ml$.

B. Precisione

INTRA SAGGIO				INTER SAGGIO			
Siero	N	<X> \pm SD ($\mu g/ml$)	CV (%)	Siero	N	<X> \pm SD ($\mu g/ml$)	CV (%)
A	20	23,1 \pm 2,0	8,6	A	14	24,7 \pm 2,7	10,8
B	20	83,3 \pm 3,2	3,9	B	14	113,8 \pm 5,5	4,8

SD : Deviazione Standard; CV: Coefficiente di Variazione

C. Accuratezza

TEST DI DILUIZIONE			
Campione	Diluizione	Concentrazione teorica ($\mu g/ml$)	Concentrazione misurata ($\mu g/ml$)
A	1/8	-	5,5
	1/16	2,75	3,2
	1/32	1,38	1,5
	1/64	0,69	0,69
	1/128	0,34	0,44

I campioni sono stati diluiti con calibratore zero.

TEST DI RECUPERO			
Campione	CBG aggiunto ($\mu g/ml$)	CBG recuperato ($\mu g/ml$)	Recupero (%)
1	0,46	0,4	87,0%
	0,88	1	113,6%
	1,4	1,3	92,9%
	2,1	2,2	104,8%
	4,3	4,1	95,3%
	8,7	9,4	108,0%

D. 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 30 minuti dopo l'aggiunta del calibratore.

TEMPO TRASCORSO				
Siero $\mu g/ml$	0'	10'	20'	30'
C 1	25,3	30,3	28,8	29,3
C 2	101,8	105,8	106,3	101,5

XIV. CONTROLLO DI QUALITÀ 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.
- I criteri di accettazione delle differenze tra i risultati in duplicato dei campioni devono basarsi sulla buona prassi di laboratorio.

XV. INTERVALLI DI RIFERIMENTO

Questi valori sono puramente indicativi, ciascun laboratorio potrà stabilire i propri intervalli normali.

Identificazione	Intervallo (*) ($\mu g/ml$)	n
Uomini	22 - 55	16
Donne	40 - 154	43

(*) Intervallo basati su 2,5% e 97,5% percentili.

XVI. PRECAUZIONI PER L'USO

Sicurezza

Il kit è solo per uso diagnostico in vitro. Il kit contiene ^{125}I (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.

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. 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.

XVII. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- BRIEN T.G., 1980
Free cortisol in human plasma.
Gorm. Metab. Res. 12, 643-650
- BRIEN T.G., 1981
Human corticosteroid binding globulin.
Clin. Endocrinol. 14, 193-212
- DAUGHADAY W.H., 1958
Binding of corticosteroid by plasma proteins. Corticosteroid-binding globulin activity in normal human beings and in certain disease states.
Arch. int. Med., 101, 286
- DE MOOR P., HEINVEGH K., HERREMANS J.F. and DECLERCK-RASKIN M., 1962
Protein-binding of corticosteroid studies by gel filtration.
J. Clin. Invest. 41, 816-827
- FAICT D. and DE MOOR P., 1984
Use of monoclonal antibodies in a RIA for human transcortin.
Clin. Chem. 30, 369-372
- HEYNS W., COOLENS J.L., VAN BAELEN H., and DE MOOR P.,
Dosage et signification du cortisol libre dans le sang.
Journal de Biophysique et Médecine Nucléaire, in press.
- PARTRIDGE W.M., 1981
Transport of protein-bound hormones into tissues in vivo.
Endocrine Reviews, 2, 103-123
- ROBIN P., PREDINE J. and MILGROM T., 1978
Assay of unbound cortisol in plasma.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 46, 277-282
- SAVU L., ZOUAGHI H., CARLI A., and NUNEZ E., 1981
Serum depletion of cortisolsteroid binding-activities, an early marker of human septic shock.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 102, 411-419
- SEAL U.S. and DOE R.P., 1962
Purification and properbes of transcortin, the cortisol binding globulin, from patients with cancer of the prostate.
Cancer Chemotherapy Reports, 16, 329-334
- SLAUWHITE W.R. and SANDBERG A.A., 1974
Transcortin : a corticosteroid-binding protein of plasma.
J. Clin. Invest. 38, 384-391

- VAN BAELEN H. and DE MOOR P., 1974
Immunochemical quantitation of human transcortin.
J. Clin. Endocrinol and Metab. 39, 160-163
- VAN BAELEN H., BIEPOELS R. and DE MOOR P., 1982
Transcortin Leuven : a variant of human corticosteroid-binding globulin with decreased cortisol binding affinity.
J. Biol. Chem., 257, 3397-3400.
- WESTPHAL U., 1971
Steroid-protein interactions.
Springer Verlag.
- WESTPHAL U., 1983
Corticosteroid-binding globulin. A review of some recent aspects.
Mol. Cell. Biochem, 55, 145-157
- ROSNER W., 1972
Recent studies on the binding of cortisol in serum.
J. Steroid Biochem., 3, 531-542

XVIII. SCHEMA DEL DOSAGGIO

	Attività totale ml	Calibratore ml	Campioni Controlli ml
Calibratore (0 - 6) Campioni, controlli Marcato Anti-CBG	- - 100 -	100 - 100 100	- 100 100 100
Incubazione	2 ora a temperatura ambiente sotto agitazione (400 rpm).		
Separazione Soluzione di lavoro del tamponne di lavaggio Separazione	-	Aspirare (o decantare) 2,0 ml Aspirare (o decantare)	
Conteggio	Contare le provette per 1 minuto		

Numero di catalogo di DIASource: KIP1809	P.I. numero: 1700481/it	Revisione numero: 101109/1
--	----------------------------	-------------------------------

Data di revisione : 2010-11-09



no

Les hele protokollen før bruk.

CBG-RIA-CT

I. BRUKSOMRÅDE

Immunoradiometrisk analyse for kvantitativ *in vitro* måling av transcortin eller corticosteroidbindende globulin (CBG) i serum.

II. GENERELL INFORMASJON

- A. **Varemerkenavn:** DIAsource CBG-RIA-CT Set
- B. **Katalognummer:** KIP1809: 96 test
- C. **Produsert av:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgien.

For teknisk hjelp eller informasjon om bestilling, kontakta:
Tel : +32 (0)67 88.99.99 Fax : +32 (0)67 88.99.96

III. KLINISK BAKGRUNN

A. Biologisk aktivitet

Transcortin eller corticosteroidbindende globulin (CBG) er et plasma α_1 -glycoprotein med en molekylvekt på cirka 52000 Dalton. Det har et steroidbindende plass med en affinitet (ved 37°C) for $3 \cdot 10^7 M^{-1}$ cortisol og en noe lavere affinitet for progesteron. Da transcortinets plasmakonsentrasjon varierer mellom 0,4 og 2,5 $10^{-6} M$, er den største fraksjonen cortisol i plasmaet bundet til dette protein. Dette transcortinbundne cortisol anses å være biologisk inaktivt, mens det ubundne cortisol er den aktive formen av cortisol. Plasmacortisolens aktive fraksjon er således beroende av transcortinkonsentrasjonen.

B. Klinisk anvendelse


Transcortinets plasmakonsentrasjon viser liten eller ingen døgnvariasjon og ingen merkbare forskjeller kan sees hos voksne personer når det gjelder alder, kjønn eller menstruasjonssyklus. I blod fra blindtarmen finnes det imidlertid halvparten av den normale mengden transcortin hos voksne, og barn før puberteten er det en noe høyere innhold enn voksne. Østrogenbehandling eller østrogenimpregnering under graviditet forårsaker en markant økning av transcortinkonsentrasjonen. Minsket innhold av transcortin kan man se ved ulike tilstander: hypoproteinemi, Cushings syndrom eller corticoidbehandling og i noen tilfeller B₁₂-vitamin mangel. Ekstremt lave mengder transcortin er påvist hos en del pasienter i septisk sjokktilstand. En uvanlig arvet form av hypotranscortinemi har blitt beskrevet.

Den viktigste kliniske anvendelsen av transcortinmålinger består i tolkningen av cortisolnivåene, mens den tillater bestemmelse av den ubundne cortisolkonsentrasjonen, som er biologisk aktiv. Den ubundne cortisolkonsentrasjonen kan faktisk beregnes fra de totale cortisol- og transcortinkonsentrasjonene med basis av masse effekt. Resultatene fra denne metode korrelerer godt med de resultat som man har fått med sentrifugerte ultrafiltreringer.

IV. METODENS PRINSIPPER

Et gitt antall ¹²⁵I-merket CBG konkurrerer med CBG i prøven eller kalibratoren om et gitt antall anti-CBG antistoff-seter, som igjen er bundet til Geit anti Mus (GAM) antistoffer som er immobilisert til veggen i et polystyren-prøverør. Etter to timer inkubasjon ved romtemperatur avsluttes den konkurrerende bindingen med en aspirering/dekantering. Prøverørene blir deretter vasket med 2 ml fortynnet vaskeløsning, og aspirert/dekantert en gang til. En kalibreringskurve blir plottet, og CBG-konsentrasjonen i prøvene blir bestemt ut fra dose-interpolering ut fra kalibreringskurven.

V. REAGENSER SOM FØLGER MED

Reagenser	96 Test Set	Fargkode	Fortynning			
 Prøverør belagt med GAM (Geit anti Mus)	2 x 48	svart	Ferdig til bruk			
<table border="1"><tr><td>Ag</td><td>¹²⁵I</td></tr></table> TRACER: ¹²⁵ Jod-merket CBG i en fosfatbuffer med bovint serumalbumin og -azid (<0,1%)	Ag	¹²⁵ I	1 ampulle 10,5 ml 89 kBq	rød	Ferdig til bruk	
Ag	¹²⁵ I					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Nullkalibrator i en fosfatbuffer med bovint serumalbumin og -azid (<0,1%)	CAL	0	1 ampulle frysetørret	gul	Tilsett 3 ml destillert vann	
CAL	0					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Kalibrator – N = 1 til 6 (se de eksakte verdiene på ampullenes etiketter) i en fosfatbuffer med bovint serumalbumin og -azid (<0,1%)	CAL	N	6 ampuller frysetørret	gul	Tilsett 1 ml destillert vann	
CAL	N					
<table border="1"><tr><td>ANTISERUM</td></tr></table> CBG antiserum i en fosfatbuffer med bovint serumalbumin og -azid (<0,1%)	ANTISERUM	1 ampulle 10,5 ml	blå	Ferdig til bruk		
ANTISERUM						
<table border="1"><tr><td>DIL</td><td>BUF</td></tr></table> Fortynningsbuffer: fosfatbuffer med bovint serumalbumin og -azid (<0,1%)	DIL	BUF	1 ampulle 110 ml	svart	Ferdig til bruk	
DIL	BUF					
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Vaskeløsning (TRIS-HCL)	WASH	SOLN	CONC	1 ampulle 10 ml	brun	Spe ut 70x med destillert vann (bruk magnetblander)
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Kontroller – N = 1 eller 2: fosfatbuffer med humant serum (fortynnet 25x), bovint serumalbumin og -azid (<0,1%)	CONTROL	N	2 ampuller frysetørret	sølvfarget	Tilsett 0,5 ml destillert vann	
CONTROL	N					

Så langt vi vet finns det ikke noe internasjonalt referansemateriale for dette parameter.

VI. NØDVENDIG MATERIALE SOM IKKE FØLGER MED

1. Destillert vann
2. Pipetter for dosering av: 100 µl, 500 µl, 1 ml, 3 ml og 5 ml (det anbefales bruk av nøyaktige pipetter med engangs plast spisser)
3. Engangsprøverør av polystyren (12 x 75 mm)
4. Virvelblander
5. Mekanisk prøverørs-rister (400 rpm)
6. Magnetblander
7. 5 ml automatisk sprøyte (type Cornwall) for skylling
8. System for aspirering (valgbart)
9. Enhver gamma-måler, som kan måle ¹²⁵I, kan brukes (minimum utbytte 70%)

VII. KLARGJØRING AV REAGENSER

- A. **Kalibratorene:** Rekonstituer nullkalibratoren med 3 ml destillert vann og de øvrige kalibratorene med 1 ml destillert vann.
- B. **Kontrollene:** Fortynn kontrollene med 0,5 ml destillert vann.
- C. **Vaskeløsning:** Bland en tilstrekkelig s mengde vaskeløsning ved å tilsette 69 deler destillert vann til en del vaskeløsning konsentrat (70x). Bruk en magnetblander for homogenisering. Kast ubrukt vaskeløsning ved dagens slutt.

VIII. OPPBEVARING AV REAGEBSENE OG HOLDBARHET

- Uåpnede eller ufortynnet er alle kitets komponenter holdbare til og med utløpsdatoen som er merket på etiketten, om de har blitt oppbevart ved 2 til 8°C.
- Etter fortynning er kalibratorene og kontrollene stabile i 7 dager ved 2-8°C. For lengre oppbevaring, bør alikvoter gjøres og oppbevares ved -20°C i maks. 3 måneder. Unngå påfølgende nedfrysnings-opptiningssykluser.
- Nyblandet vaskeløsning må anvendes samme dag.
- Etter den første bruken er traceren stabil til utløpsdatoen, om den oppbevares i den originale lukkede ampullen ved 2 til 8°C.
- Forandringer i det fysiske utseende av kitets reagenser kan tyde på ustabilitet eller forringelse.

IX. PRØVETAKING OG FORBEREDELSE

- Serumprøvene bør oppbevares ved 2-8°C.
- Om prøvene ikke kan analyseres innen 48 timer anbefales oppbevaring ved -20°C.
- Unngå etterfølgende nedfrysing og opptining.
- Etter opptining må prøvene blandes og sentrifugeres.
- **Prøvene må fortynnes ut 25 ganger i en fortynningsbuffer. Anbefalt prosedyre: 100 µl serum + 2,4 ml fortynningsbuffer.**

X. PROSEDYRE

A. Merknader

Bruk ikke kitet eller komponentene etter utløpsdato. Bland ikke komponenter fra ulike kit. Alle reagenser må ha romtemperatur før bruk. Bland nøye alle reagenser og prøver ved å forsiktig riste eller rotere dem. Bruk en ren engangs pipettespiss for å unngå krysskontaminasjon ved tilsetning av hvert enkelt reagens og hver enkelt prøve. Presisjonspipetter eller automatisk pipetteutstyr øker nøyaktigheten. Respekter inkubasjonstidene. Tegn opp kalibreringskurve for hver kjøring, bruk ikke data fra tidligere kjøring.

B. Prosedyre

1. Merk to belagte prøverør per kalibrator, kontroll og prøve. For å måle den totale mengden, merk to vanlige prøverør.
2. Roter en kort stund kalibratorene, kontrollene og de fortynnete prøvene og pipetter 100 µl av hver i respektive prøverør.
3. Pipeter 100 µl ¹²⁵Jod merket CBG i hvert prøverør, også i prøverøret for den totale mengden.
4. Pipeter 100 µl CBG antiserum i hvert prøverør (utenom i prøverøret for den totale mengden).
5. Rist prøverørene sakte for hand for å frigjøre bundne luftbobler.
6. Inkuber i 2 timer ved romtemperatur med kontinuerlig risting ved 400 rpm.
7. Aspirer/sug (eller dekanter) av innholdet i alle prøverørene (utenom fra prøverøret for den totale mengden). Forsikre deg om at plast-tuppen på aspiratoren når helt ned i bunnen av de belagte prøverørene slik at all væske blir fjernet.
8. Vask rørene med 2 ml fortynnet vaskeløsning (utenom prøverøret for den totale mengden), og aspirer/sug av løsningen. Unngå skumdannelse ved tilsetningen av fortynnet vaskeløsning.
9. La prøverørene stå oppreist i to minutter, og aspirer/sug av den gjenværende væskedråpen.
10. Mål prøverørene i en gammateller i 60 sekunder.

XI. UTREGNING AV RESULTATENE

1. Regn ut middeltallet for de dobbelte målingene.
2. Tegn ned ved å anvende et halvlogaritmisk eller linjert grafisk papir, (B/B0(%)) verdiene for hvert kalibreringspunkt som en funksjon av CBG-konsentrasjonen for hvert kalibreringspunkt. Uteslutt de punkter som ligger klart utenfor.
3. Datametoder for å fremstille kalibreringskurven kan også anvendes. Om man anvender automatisk resultatbearbeiding, anbefales det at man bruker en logistisk funksjonskurvsavpassning med 4-parametere.
4. Bestem via interpolering av prøvens (B/B0 (%)) verdier, prøvens CBG-konsentrasjoner fra kalibreringskurven.
5. De konsentrasjoner som avleses fra kalibreringskurven bør multipliseres med 25 (fortynningsfaktoren).
6. For hver måling ved mangel på umerket CBG (B0/T) bør den prosentuelle mengden bunden tracer kontrolleres.

Bergning av ubunden cortisol

I humant plasma er cortisol bundet ved transcortin, og dessuten finnes det en svak umettet binding til albumin. Denne simultane bindings likevekt kan beregnes med følgende formel:

$$U^2K(1+N) + U(1+N+K(T-C)) - C = 0$$

I denne formel representerer U den molare konsentrasjonen av ubundet cortisol, C den molare konsentrasjonen av den totale mengden cortisol ved 37°C og N forholdet mellom bundet albumin og ubundet cortisol. Denne formel kan løses for U på følgende måte:

$$U = \sqrt{Z^2 + \frac{C}{(1+N)K}} - ZM$$

der $Z = \frac{1}{2K} + \frac{T-C}{2(1+N)}M$

eller kvantitativt, der K gies verdien $3 \times 10^{-7} M^{-1}$ og N gies verdien 1,74 og U, C og T uttrykkes som μM .

$$U = \sqrt{Z^2 + 0,0122C} - Z^{\mu M}$$

der $Z = 0,0167 + 0,182(T-C)\mu M$

Divider med 36,2 respektive 362 for å endre cortisolkonsentrasjonene fra verdier i μg eller ng/ml til verdier i μM . Divider med 52 for å endre transcortinkonsentrasjonene fra $\mu g/ml$ til μM verdier. Den oppnådde verdien for U (i μM) kan endres til $\mu g\%$ ved å multiplisere med 36,2 eller ng/ml gjennom å multiplisere med 362.

Utregningseksempel: La oss anta at de oppnådde mengdene av transcortin og totalt cortisol er $40 \mu g/ml$ respektive $130 \mu g/ml$.

· Transcortinmengden i μM : $\frac{40}{52} = 0,77 \mu M$

· Den totale cortisolmengden i μM : $\frac{130}{362} = 0,36 \mu M$

· $Z = 0,0167 + 0,182(0,77-0,36) = 0,09 \mu M$

· $U = \sqrt{0,09^2 + (0,0122 \times 0,36)} - 0,09 = 0,021 \mu M$

· Konsentrasjonen av ubundet cortisol i ng/ml : $0,021 \times 362 = 7,8 \text{ ng/ml}$.

XII. TYPISKE DATA

Følgende data er bare illustrasjon, og må ikke brukes isteden for kalibreringskurven ved kjøring.

CBG	cpm	B/B0 (%)
Totalmengde	42523	
Kalibratører		
0,00 $\mu g/ml$	17216	100,0
0,44 $\mu g/ml$	15282	89,6
0,81 $\mu g/ml$	13081	80,3
1,50 $\mu g/ml$	10162	61,6
2,20 $\mu g/ml$	8292	48,6
4,00 $\mu g/ml$	4429	21,2
8,00 $\mu g/ml$	2633	11,3

XIII. YTELSE OG BEGRENSNINGER

A. Deteksjonsgrense

Tyve nullkalibratører ble målt sammen med et sett andre kalibratører. Deteksjonsgrensen, definert som den åpenbare konsentrasjonen til standarddeviasjoner under middelmengden ved nullbinding, var $0,26 \mu g/ml$ lavere enn laveste kalibrator: denne verdi er aldeles for høy (med hensyn til kalibreringskurvens bredde).

B. Presisjon

INTRAANALYSE PRESISJON

INTERANALYSE PRESISJON

Serum	N	<X> \pm SD ($\mu g/ml$)	CV (%)	Serum	N	<X> \pm SD ($\mu g/ml$)	CV (%)
A	20	23,1 \pm 2,0	8,6	A	14	24,7 \pm 2,7	10,8
B	20	83,3 \pm 3,2	3,9	B	14	113,8 \pm 5,5	4,8

SD: Standard Deviation; CV: Variasjonskoeffisient

C. Nøyaktighet

FORTYNNINGSTEST

Prøve	Fortynning	Teoretisk konc. ($\mu g/ml$)	Målt konc. ($\mu g/ml$)
A	1/8	-	5,5
	1/16	2,75	3,2
	1/32	1,38	1,5
	1/64	0,69	0,69
	1/128	0,34	0,44

Prøven ble fortynnet med nullkalibrator.

GJENVINNING

Prøve	tilsatt CBG ($\mu g/ml$)	Gjenvunnet CBG ($\mu g/ml$)	Gjenvunnet (%)
1	0,46	0,4	87,0%
	0,88	1	113,6%
	1,4	1,3	92,9%
	2,1	2,2	104,8%
	4,3	4,1	95,3%
	8,7	9,4	108,0%

D. Tidsforskyvning mellom siste kalibratørene og prøvefordeling

Som vist nedenfor forblir analyseresultatene riktige selv om en prøve fordelt 30 minutter etter at kalibratørene er tilsatt i prøverørene.

TIDSFORSKYVNING

Serum $\mu g/ml$	0'	10'	20'	30'
C 1	25,3	30,3	28,8	29,3
C 2	101,8	105,8	106,3	101,5

XIV. INTERN KVALITETSKONTROLL

- Om resultatet som fåes for Kontroll 1 og/eller Kontroll 2, ikke er innenfor det som er spesifisert på ampullenes etikett, kan resultatene ikke brukes om ikke en tilfredsstillende forklaring for diskrepansen kan gies.
- Om det er ønskelig kan hvert laboratorium etablere sitt egne lager av kontrollprøver som bør fryses i alliqoter.
- Kriterier for å godkjenne forskjellen mellom dublett resultatene for prøvene bør være i henhold til god laboratoriepraksis.

XV. REFERANSEINTERVALLER

Disse verdier gies bare som en veiledning; hvert laboratorium bør fastsette sine egne normale grenseverdier.

Identifisering	Grenseverdier (*) ($\mu g/ml$)	n
Mennesker	22 - 55	16
Kvinner	40 - 154	43

(*) Grenseverdiene baserer sig på 2,5% og 97,5% percentiler.

XVI. FORSIKTIGHETSREGLER OG ADVARSLER

Sikkerhet

Bare for *in vitro* diagnostikk.

Dette kit inneholder ¹²⁵I (halveringstid: 60 dager), ionisert stråling X (28 keV) og γ (35.5 keV) utstråling

Dette radioaktive produkt må fraktes og brukes bare av autoriserte personer; innkjøp, lagring, bruk og utveksling av radioaktive produkter er underlagt gjeldene lov i sluttbrukerlandet. Ikke på noen måte må dette produkt gies til mennesker eller dyr.

All radioaktiv behandling må skje på et egnet avskilt område. En loggbok for mottagning og lagring av radioaktivt materiale må føres i laboratoriet. Laboratoriestyr og glassvarer som kan kontamineres med radioaktivitet må oppbevares avskilt for å unngå krysskontaminasjon med andre isotoper.

Alt radioaktivt avfall må vaskes umiddelbart i henhold til sikkerhetsforskriftene for radioaktive emner. Det radioaktive avfallet må behandles i henhold til lokale myndigheter. Ved å følge de grunnregler som gjelder for strålingsikkerhet garanteres god beskyttelse.

De humane blodkomponentene som finnes i dette kit er testet med Europeiske og/eller FDA godkjente metoder og de er konstatert til å være negative for HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 og 2. Ingen kjent metode kan gi en fullstendig sikkerhet mot smitte av hepatitt, AIDS eller andre infeksjoner via humane blodderivat. Derfor må håndteringen av reagenser, serum eller plasmaprøver skje i henhold til lokale sikkerhetsforskrifter.

Alle animalske produkter og derivat er innsamlet fra friske dyr. Komponenter fra storfe kommer fra land hvor BSE ikke er blitt rapportert. Men komponenter som inneholder animalske substanser bør behandles som potensielt smittsomme.

Unngå all hudkontakt med reagensene (natrium azid som konserveringsmiddel). Aziden kan reagere med bly og kobber i avløpsrørene og danne eksplosive gasser. Etter utskylning i avløpet bør dette spyles med store mengder vann for å unngå gassdannelse.

Du bør ikke røke, drikke, eller spise eller anvende kosmetikk i arbeidsrommet. Pipetter ikke med munnen og bruk beskyttelses tøy og engangshansker.

XVII. BIBLIOGRAFI

- BRIEN T.G., 1980
Free cortisol in human plasma.
Gorm. Metab. Res. 12, 643-650
- BRIEN T.G., 1981
Human corticosteroid binding globulin.
Clin. Endocrinol. 14, 193-212
- DAUGHADAY W.H., 1958
Binding of corticosteroid by plasma proteins. Corticosteroid-binding globulin activity in normal human beings and in certain disease states.
Arch. int. Med., 101, 286
- DE MOOR P., HEINVEGH K., HERREMANS J.F. and DECLERCK-RASKIN M., 1962
Protein-binding of corticosteroid studies by gel filtration.
J. Clin. Invest. 41, 816-827
- FAICT D. and DE MOOR P., 1984
Use of monoclonal antibodies in a RIA for human transcortin.
Clin. Chem. 30, 369-372
- HEYNS W., COOLENS J.L., VAN BAELEN H., and DE MOOR P.,
Dosage et signification du cortisol libre dans le sang.
Journal de Biophysique et Médecine Nucléaire, in press.
- PARTRIDGE W.M., 1981
Transport of protein-bound hormones into tissues in vivo.
Endocrine Reviews, 2, 103-123
- ROBIN P., PREDINE J. and MILGROM T., 1978
Assay of unbound cortisol in plasma.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 46, 277-282
- SAVU L., ZOUAGHI H., CARLI A., and NUNEZ E., 1981
Serum depletion of cortisolsteroid binding-activities, an early marker of human septic shock.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 102, 411-419
- SEAL U.S. and DOE R.P., 1962
Purification and properties of transcortin, the cortisol binding globulin, from patients with cancer of the prostate.
Cancer Chemotherapy Reports, 16, 329-334
- SLAUWHITE W.R. and SANDBERG A.A., 1974
Transcortin : a corticosteroid-binding protein of plasma.
J. Clin. Invest. 38, 384-391

- VAN BAELEN H. and DE MOOR P., 1974
Immunochemical quantitation of human transcortin.
J. Clin. Endocrinol and Metab. 39, 160-163
- VAN BAELEN H., BIEPOELS R. and DE MOOR P., 1982
Transcortin Leuven : a variant of human corticosteroid-binding globulin with decreased cortisol binding affinity.
J. Biol. Chem., 257, 3397-3400.
- WESTPHAL U., 1971
Steroid-protein interactions.
Springer Verlag.
- WESTPHAL U., 1983
Corticosteroid-binding globulin. A review of some recent aspects.
Mol. Cell. Biochem, 55, 145-157
- ROSNER W., 1972
Recent studies on the binding of cortisol in serum.
J. Steroid Biochem., 3, 531-542

XVIII. PROTOKOLLSAMMENDRAG

	TOTALA MENGDER μ l	KALIBRATORER μ l	PRØV(ER) KONTROLLER μ l
Kalibrator (0 - 6)	-	100	-
Prøver, kontroller	-	-	100
Tracer	100	100	100
Anti-CBG	-	100	100
Inkubasjon	2 timer ved romtemperatur ved kontinuerlig risting ved 400 rpm		
Separasjon Vaskeløsning Separasjon	-	Aspirer ut (eller dekanter) 2,0 ml Aspirer ut (eller dekanter)	
Målning	Mål prøverørene i 60 sekunder		

DIAsource Katalog Nr: KIP1809	P.I. Nummer: 1700481/no	Revisionsnr: 101109/1
----------------------------------	----------------------------	--------------------------

Revisjons dato: 2010-11-09

Läs hela protokollet före användning.

CBG-RIA-CT

I. AVSEDD ANVÄNDNING

Immunoradiometrisk analys för kvantitativ *in vitro* mätning av transcortin eller corticosteroidbindande globulin (CBG) i serum.

II. ALLMÄN INFORMATION

- A. **Varumärkesnamn:** DIAsource CBG-RIA-CT Set
- B. **Katalognummer:** KIP1809: 96 test
- C. **Tillverkat av:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgien.

För teknisk hjälp eller information om beställning, kontakta:
Tel: +32 (0)67 88.99.99 Fax: +32 (0)67 88.99.96

III. KLINISK BAKGRUND

A. Biologisk aktivitet

Transcortin eller corticosteroidbindande globulin (CBG) är ett plasma α_1 -glycoprotein med en molekylvikt på cirka 52000 Dalton. Det har ett steroidbindande läge med en affinitet (vid 37°C) för $3 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ cortisol och en något lägre affinitet för progesteron. Då transcortinets plasmakoncentration fluktuerar mellan 0.4 och 2.5 10^{-6} M , är den större fraktionen cortisol i plasmat bunden till detta protein. Detta transcortinbundna cortisol anses vara biologiskt inaktivt, medan det obundna cortisol är den aktiva formen av cortisol. Plasmacortisolets aktiva fraktion är således beroende av transcortinkoncentrationen.

B. Klinisk tillämpning


Transcortinets plasmakoncentration visar liten eller ingen dygnsvariation och inga märkbara skillnader kan ses hos fullvuxna personer vad gäller ålder, kön eller menstruationscykel. I blod från blindtarmen finns det emellertid hälften av den normala vuxenhalten av transcortin, och barn före puberteten har en något högre halt än fullvuxna. Östrogenbehandling eller östrogenimpregnering under graviditet förorsakar en markant ökning av transcortinkoncentrationen. Minskade halter av transcortin kan man se vid olika tillstånd: hypoproteinemi, Cushings syndrom eller corticoidbehandling och i vissa fall B₁₂-vitaminbrist. Extremt låga halter transcortin har påvisats hos en del patienter i septiskt chocktillstånd. En ovanlig nedärvd form av hypotranscortinemi har beskrivits.

Den viktigaste kliniska tillämpningen av transcortinmätningarna består av tolkningen av cortisolhalterna, emedan den tillåter bestämning av den obundna cortisolkoncentrationen, som är biologiskt aktiv. Den obundna cortisolkoncentrationen kan faktiskt beräknas från de totala cortisol- och transcortinkoncentrationerna på basen av massaeffekt. Resultaten från denna metod korrelerar väl med de resultat som man fått med centrifugerade ultrafiltreringar.

IV. METODENS PRINCIPER

En bestämd mängd ^{125}I -märkt CBG konkurrerar med det CBG som ska mätas i provet eller i kalibreraren om en bestämd mängd anti-CBG-antikroppsplatser, som är bundna till de get-anti-musantikroppar (GAM) som är fixerade på väggen i ett provrör av polystyren. Efter 2 timmars inkubation vid rumstemperatur avbryter ett aspirationssteg den kompetitiva reaktionen. Provrören tvättas därefter med 2 ml arbetstvättlösning och aspireras igen. En kalibreringskurva ritas upp och provernas CBG-koncentrationer beräknas genom dosinterpolering från kalibreringskurvan.

V. MEDFÖLJANDE REAGENSER

Reagenser	96 Test Set	Färgkod	Utspädning			
 Provrör belagda med GAM (get-anti-mus)	2 x 48	svart	Färdig att användas			
<table border="1" data-bbox="119 593 255 649"><tr><td>Ag</td><td>^{125}I</td></tr></table> SPÅRÄMNE: ^{125}I Jod-märkt CBG i en fosfatbuffert med bovin serumalbumin och -azid (<0.1%)	Ag	^{125}I	1 ampull 10.5 ml 89 kBq	röd	Färdig att användas	
Ag	^{125}I					
<table border="1" data-bbox="119 750 255 795"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Nollkalibrerare i en fosfatbuffert med bovin serumalbumin och -azid (<0.1%)	CAL	0	1 ampull lyofiliserad	gul	Tillsätt 3 ml destillerat vatten	
CAL	0					
<table border="1" data-bbox="119 907 255 952"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Kalibrerare – N = 1 till 6 (se de exakta värdena på ampullernas etiketter) i en fosfatbuffert med bovin serumalbumin och -azid (<0.1%)	CAL	N	6 ampuller lyofiliserade	gul	Tillsätt 1 ml destillerat vatten	
CAL	N					
<table border="1" data-bbox="119 1086 255 1131"><tr><td>ANTISERUM</td></tr></table> CBG antiserum i en fosfatbuffert med bovin serumalbumin och -azid (<0.1%)	ANTISERUM	1 ampull 10.5 ml	blå	Färdig att användas		
ANTISERUM						
<table border="1" data-bbox="119 1220 255 1265"><tr><td>DIL</td><td>BUF</td></tr></table> Utspädningsbuffert: fosfatbuffert med bovin serumalbumin och -azid (<0.1%)	DIL	BUF	1 ampull 110 ml	svart	Färdig att användas	
DIL	BUF					
<table border="1" data-bbox="119 1366 255 1411"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Tvättlösning (TRIS-HCL)	WASH	SOLN	CONC	1 ampull 10 ml	brun	Späd ut 70x med destillerat vatten (använd magnetblandare)
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1" data-bbox="119 1478 255 1523"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Kontroller – N = 1 eller 2: fosfatbuffert med humant serum (utspätt 25x), bovin serumalbumin och -azid (<0.1%)	CONTROL	N	2 ampuller lyofiliserade	silver	Tillsätt 0,5 ml destillerat vatten	
CONTROL	N					

Så vitt vi vet finns det inget internationellt referensmaterial för denna parameter.

VI. EJ MEDFÖLJANDE TILLBEHÖR

Följande material behövs men tillhandahålls inte i setet:

- Destillerat vatten
- Pipetter för dosering av: 100 µl, 500 µl, 1 ml, 3 ml och 5 ml (användning av exakta pipetter med engångs plastspetsar rekommenderas)
- Engångsprövrör av polystyren (12 x 75 mm)
- Virvelblandare
- Provrörsskak (400 rpm)
- Magnetblandare
- 5 ml automatisk spruta (typ Cornwall) för sköljning
- Aspirationssystem (valbart)
- Vilken gamma-mätare som helst, som kan mäta ^{125}I , kan användas (minimum avkastning 70%)

VII. PREPARERING AV REAGENSER

- Kalibrerare:** Återställ nollkalibrerarna med 3 ml destillerat vatten och de övriga kalibrerarna med 1 ml destillerat vatten.
- Kontrollerna:** Späd ut kontrollerna med 0,5 ml destillerat vatten.
- Arbetstvättlösning:** Blanda en tillräckligt stor mängd arbetstvättlösning genom att tillsätta 69 delar destillerat vatten till en del tvättlösning (70x). Använd en magnetblandare för homogenisering. Släng bort oanvänd arbetstvättlösning vid dagens slut.

VIII. FÖRVARING AV REAGENSERNA OCH MÄRKNING AV FÖRFALLODAGEN

- Före öppnandet eller utspädningen är alla setets komponenter stabila till och med förfalldagen, som märkts ut på etiketten, om de har förvarats i temperaturer på 2 till 8°C.
- Efter återställning är kalibrerarna och kontrollerna stabila i 7 dagar vid 2-8°C. För längre förvaringstider, bör alikvoter beredas och förvaras vid -20°C i maximalt 3 månader. Undvik efterföljande nedfrysnings-upptiningscykler.
- Nyblandad arbetstvättlösning bör användas under samma dag.
- Efter den första användningen är tracern stabil ända till förfalldagen, om den förvaras i den ursprungliga tillslutna ampullen i temperaturer på 2 till 8°C.
- Förändringar i det fysiska utseende av setets reagenser kan tyda på instabilitet eller försämring.

IX. TAGNING OCH PREPARERING AV PROVER

- Serumproverna bör förvaras vid 2-8°C.
- Om proverna inte analyseras inom 48 timmar rekommenderas förvaring vid -20°C.
- Undvik efterföljande nedfrysnings-upptiningscykler.
- Efter upptining bör proverna blandas och centrifugeras.
- Proverna måste spädas ut 25 gånger i en utspädningsbuffert. Rekommenderad procedur: 100 µl serum + 2.4 ml utspädningsbuffert.**

X. PROCEDUR

A. Anteckningar beträffande hantering

Använd inte setet eller komponenterna efter förfalldagen.

Blanda inte material från olika set.

Alla reagenser bör vara vid rumstemperatur före användningen.

Blanda noggrant alla reagenser och prover genom att försiktigt skaka eller snurra dem.

Använd en ren engångspipettspets för att undvika korskontamination vid tillsättning av varje enskild reagens och varje enskilt prov. Högprecisionspipetter eller automatisk pipetteringsapparat ökar noggrannheten.

Respektera inkubationstiderna.

Gör upp en kalibreringskurva för varje körning, använd inte data från tidigare körningar.

B. Procedur

- Märk belagda provrör i dubletter för varje kalibrerare, kontroll och prov. Märk 2 vanliga provrör för bestämningen av den totala mängden.
- Snurra för en kort stund kalibrerarna, kontrollerna och de utspädda proverna och fördela 100 µl av varje i respektive provrör.
- Fördela 100 µl ^{125}I Jod märkt CBG i varje provrör, och även i provrören för den totala mängden.
- Fördela 100 µl CBG antiserum i varje provrör (utom i provrören för den totala mängden).
- Skaka provrörställningen sakta för hand för att frigöra bundna luftbubblor.
- Inkubera i 2 timmar vid rumstemperatur med kontinuerlig skakning vid 400 rpm.
- Aspirera (eller dekantera) innehållet i varje provrör (utom i provrören för den totala mängden). Se till att sugens plastspets når ner i botten på det belagda provröret så att all vätska avlägsnas.
- Tvätta provrören med 2 ml arbetstvättlösning (utom i provrören för den totala mängden) och aspirera. Undvik skumbildning vid tillsats av arbetstvättlösning.
- Låt provrören stå rakt upp i två minuter och sug bort den återstående vätskedroppen.
- Mät provrören i en gammamätare under 60 sekunder.

XI. UTRÄKNING AV RESULTATEN

- Räkna ut medeltalet för de dubbla bestämningarna.
- Rita, genom att använda ett halvlogaritmiskt eller lineärt grafiskt papper, (B/B0(%)) upp värdena för varje kalibreringspunkt som en funktion av CBG-koncentrationen för varje kalibreringspunkt. Uteslut de punkter som ligger klart utanför.
- Datorstödda metoder för att framställa kalibreringskurvan kan även användas. Om man använder automatisk resultatbearbetning, rekommenderas att man använder en logistisk funktionskurvasavpassning med 4-parametrar.
- Bestäm genom interpolering av provets (B/B0 (%)) värden, provens CBG-koncentrationer från kalibreringskurvan.
- Koncentrationerna som avläses på kalibreringskurvan för proverna och kontrollerna ska multipliceras med 25 (utspädningsfaktorn)
- För varje mätning bör vid brist på omärkt CBG (B0/T) den procentuella mängden bunden tracer kontrolleras.

Uträkning av obunden cortisol

I humant serum är cortisol bundet vid transcortin, och dessutom finns det i någon mån en svag omätnad bindning till albumin. Denna simultana bindningsjämvikt kan framställas med följande ekvation:

$$U^2K(1+N) + U(1+N+K(T-C)) - C = 0$$

I denna ekvation representerar U den molära koncentrationen av obundet cortisol, C den molära koncentrationen av den totala mängden cortisol vid 37°C och N förhållandet mellan bundet albumin och obundet cortisol. Denna ekvation kan lösas för U på följande sätt:

$$U = \sqrt{Z^2 + \frac{C}{(1+N)K}} - ZM$$

där
$$Z = \frac{1}{2K} + \frac{T-C}{2(1+N)}M$$

eller kvantitativt, där K ges värdet $3 \times 10^{-7} M^{-1}$ och N ges värdet 1.74 och U, C och T uttrycks som μM .

$$U = \sqrt{Z^2 + 0.0122C} - Z^{\mu M}$$

där $Z = 0.0167 + 0.182(T-C)\mu M$

Dividera med 36.2 respektive 362 för att förvandla cortisolkoncentrationerna från värden i μg eller ng/ml till värden i μM . Dividera med 52 för att omvandla transcortinkoncentrationerna från $\mu g/ml$ till μM värden. Det uppnådda värdet för U (i μM) kan omvandlas till $\mu g\%$ genom att multiplicera med 36.2 eller ng/ml genom att multiplicera med 362.

Uträkningsexempel: Låt oss anta att de uppnådda mängderna av transcortin och totalt cortisol är $40 \mu g/ml$ respektive $130 \mu g/ml$.

· Transcortinmängden i μM : $\frac{40}{52} = 0.77 \mu M$

· Den totala cortisolmängden i μM : $\frac{130}{362} = 0.36 \mu M$

· $Z = 0.0167 + 0.182(0.77 - 0.36) = 0.09 \mu M$

· $U = \sqrt{0.09^2 + (0.0122 \times 0.36)} - 0.09 = 0.021 \mu M$

· Koncentrationen av obunden cortisol i ng/ml : $0.021 \times 362 = 7.8 \text{ ng/ml}$.

XII. TYPISKA DATA

Följande data ges endast som illustration, och bör aldrig användas istället för kalibreringskurvan i realtid.

CBG	cpm	B/B0 (%)
Totalmängd	42523	
Kalibrerare		
0,00 $\mu g/ml$	17216	100,0
0,44 $\mu g/ml$	15282	89,6
0,81 $\mu g/ml$	13081	80,3
1,50 $\mu g/ml$	10162	61,6
2,20 $\mu g/ml$	8292	48,6
4,00 $\mu g/ml$	4429	21,2
8,00 $\mu g/ml$	2633	11,3

XIII. PRESTATION OCH BEGRÄNSNINGAR

A. Detektionsgräns

Tjugo nollkalibreringar mättes tillsammans med ett set andra kalibrerare. Detektionsgränsen, definierad som den uppenbara koncentrationen två standarddeviationer under medelmängden vid nollbindning, var $0,26 \mu g/ml$ återberäknat: detta värde är alldeles för högt (med beaktande av kalibreringskurvas vidd).

B. Precision

INTRAAANALYS PRECISION

INTERANALYS PRECISION

Serum	N	<X> \pm SD ($\mu g/ml$)	CV (%)	Serum	N	<X> \pm SD ($\mu g/ml$)	CV (%)
A	20	23,1 \pm 2,0	8,6	A	14	24,7 \pm 2,7	10,8
B	20	83,3 \pm 3,2	3,9	B	14	113,8 \pm 5,5	4,8

SD: Standard Deviation; CV: Variationskoefficient

C. Noggrannhet

UTSPÄDNINGSTEST

Prov	Utspädning	Teoretisk konc. ($\mu g/ml$)	Uppmätt konc. ($\mu g/ml$)
A	1/8	-	5.5
	1/16	2.75	3.2
	1/32	1.38	1.5
	1/64	0.69	0.69
	1/128	0.34	0.44

Proven utspäddes med nollkalibrerare.

ÅTERVINNINGSTEST

Prov	tilsatt CBG ($\mu g/ml$)	Återvunnet CBG ($\mu g/ml$)	Återvunnet (%)
1	0.46	0.4	87.0%
	0.88	1	113.6%
	1.4	1.3	92.9%
	2.1	2.2	104.8%
	4.3	4.1	95.3%
	8.7	9.4	108.0%

D. Tidsförskjutning mellan sista kalibrerarna och provfördelning

Såsom här nedan visas förblir analysresultaten riktiga även om ett prov fördelas 30 minuter efter det att kalibrerarna har tillsatts i provrören.

TIDSFÖRSKJUTNING

Serum $\mu g/ml$	0'	10'	20'	30'
C 1	25,3	30,3	28,8	29,3
C 2	101,8	105,8	106,3	101,5

XIV. INTERN KVALITETSKONTROLL

- Om resultatet, som erhålls för Kontroll 1 och/eller Kontroll 2, inte faller inom värdena för det som specificerats på ampullens etikett, kan resultaten ej användas om inte en tillfredsställande förklaring för diskrepansen har kunnat ges.
- Om det är önskvärt kan varje laboratorium göra sina egna reserver av kontrollprover, som bör hållas frusna i portioner.
- Kriterier för godkännande av skillnaderna mellan de dubbla resultaten för proverna bör stöda sig på god laboratoriepraxis.

XV. REFERENSINTERVALLER

Dessa värden ges endast som vägledning; varje laboratorium bör fastställa sina egna normala gränsvärden.

Identifiering	Gränsvärden (*) (µg/ml)	n
Människa	22 - 55	16
Kvinnor	40 - 154	43

(*) Gränsvärdena baserar sig på 2.5% och 97.5% percentiler.

XVI. FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER OCH VARNINGAR

Säkerhet

Bör användas endast för *in vitro* diagnostik. Detta kit innehåller ¹²⁵I (halveringstid: 60 dagar), avger röntgen (X: 28 keV) och gamma (γ: 35.5 keV) strålar. Denna radioaktiva produkt bör förflyttas och användas endast av auktoriserade personer; inköp, lagring, användning och utbyte av radioaktiva produkter är underställda gällande lagstiftning i slutanvändarens land. I inget fall som helst får denna produkt ges åt människor eller djur.

All radioaktiv hantering bör ske på ett för ändamålet avsett område, avskilt från allmänna platser. En dagbok för mottagning och lagring av radioaktivt material måste föras i laboratoriet. Laboratorieutrustning och glasvaror som kan kontamineras med radioaktiva ämnen bör förvaras avskilt för undvikande av korskontamination av olika radioisotoper.

Allt radioaktivt spill måste sköljas omedelbart i enlighet med säkerhetsföreskrifterna för radioaktiva ämnen. Det radioaktiva avfallet bör behandlas i enlighet med bestämmelser som utfärdats av lokala myndigheter med jurisdiktion över laboratoriet. Genom att följa de grundregler som gäller för strålnings säkerhet garanteras ett tillräckligt skydd.

De humana blodkomponenter som finns i detta set har testats med i Europa och/eller av FDA godkända metoder, och de har konstaterats vara negativa för HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 och 2. Ingen känd metod kan ge en fullständig säkerhet mot överföring av hepatit, AIDS eller andra infektioner genom humant blodderivat. Därför bör hanteringen av reagenser, serum eller plasmaprover ske i enlighet med lokala säkerhetsföreskrifter.

Alla animaliska produkter och derivat har insamlats från friska djur. Komponenter från nötdjur kommer från länder där BSE inte har rapporterats. Dock bör komponenter som innehåller animaliska substanser behandlas som potentiellt smittsamma.

Undvik all hudkontakt med reagenserna (natriumsyra som konserveringsmedel). Syran i detta set kan reagera med bly och koppar i avloppsrören, och på detta sätt bilda synnerligen explosiva metallsyror. Vid sköljningskedet bör avloppet spolas med stora mängder vatten för att undvika en syraökning.

Du bör inte röka, dricka, äta eller använda kosmetika i arbetsutrymmena. Pipettera inte med munnen. Använd skyddskläder och engångshandskar.

XVII. BIBLIOGRAFI

- BRIEN T.G., 1980
Free cortisol in human plasma.
Gorm. Metab. Res. 12, 643-650
- BRIEN T.G., 1981
Human corticosteroid binding globulin.
Clin. Endocrinol. 14, 193-212
- DAUGHADAY W.H., 1958
Binding of corticosteroid by plasma proteins. Corticosteroid-binding globulin activity in normal human beings and in certain disease states.
Arch. int. Med., 101, 286
- DE MOOR P., HEINVEGH K., HERREMANS J.F. and DECLERCK-RASKIN M., 1962
Protein-binding of corticosteroid studies by gel filtration.
J. Clin. Invest. 41, 816-827
- FAICT D. and DE MOOR P., 1984
Use of monoclonal antibodies in a RIA for human transcortin.
Clin. Chem. 30, 369-372
- HEYNS W., COOLENS J.L., VAN BAELEN H., and DE MOOR P.,
Dosage et signification du cortisol libre dans le sang.
Journal de Biophysique et Médecine Nucléaire, in press.
- PARTRIDGE W.M., 1981
Transport of protein-bound hormones into tissues in vivo.
Endocrine Reviews, 2, 103-123

- ROBIN P., PREDINE J. and MILGROM T., 1978
Assay of unbound cortisol in plasma.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 46, 277-282
- SAVU L., ZOUAGHI H., CARLI A., and NUNEZ E., 1981
Serum depletion of cortisolsteroid binding-activities, an early marker of human septic shock.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 102, 411-419
- SEAL U.S. and DOE R.P., 1962
Purification and properbes of transcortin, the cortisol binding globulin, from patients with cancer of the prostate.
Cancer Chemotherapy Reports, 16, 329-334
- SLAUWHITE W.R. and SANDBERG A.A., 1974
Transcortin: a corticosteroid-binding protein of plasma.
J. Clin. Invest. 38, 384-391
- VAN BAELEN H. and DE MOOR P., 1974
Immunochemical quantitation of human transcortin.
J. Clin. Endocrinol. and Metab. 39, 160-163
- VAN BAELEN H., BIEPOELS R. and DE MOOR P., 1982
Transcortin Leuven: a variant of human corticosteroid-binding globulin with decreased cortisol binding affinity.
J. Biol. Chem., 257, 3397-3400.
- WESTPHAL U., 1971
Steroid-protein interactions.
Springer Verlag.
- WESTPHAL U., 1983
Corticosteroid-binding globulin. A review of some recent aspects.
Mol. Cell. Biochem, 55, 145-157
- ROSNER W., 1972
Recent studies on the binding of cortisol in serum.
J. Steroid Biochem., 3, 531-542

XVIII. PROTOKOLLSAMMANDRAG

	TOTALA MÄNGDER µl	KALIBRERARE µl	PROV(ER) KONTROLLER µl
Kalibrerare (0 - 6) Prover, kontroller Tracer Anti-CBG	- - 100 -	100 - 100 100	- 100 100 100
Inkubation	2 timmar vid rumstemperatur med kontinuerlig skakning vid 400 rpm		
Separation Tvättlösning Separation	-	Aspirera (eller dekantera) 2,0 ml Aspirera (eller dekantera)	
Mätning	Mät provrören i 60 sekunder		

DIASource Katalog Nr: KIP1809	P.I. Nummer: 1700481/sv	Revisionsnr: 101109/1
----------------------------------	----------------------------	--------------------------

Utfärdat : 2010-11-09

	<u>Used symbols</u>
	Consult instructions for use
	Storage temperature
	Use by
LOT	Batch code
REF	Catalogue number
CONTROL	Control
I V D	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 125I	Tracer
Ab 125I	Tracer
Ag 125I CONC	Tracer concentrated
Ab 125I 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
U U	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

	<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
I V D	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
TIT	Microtiterplaat
Ab HRP	HRP Conjuugaat
Ag HRP	HRP Conjuugaat
Ab HRP CONC	HRP Conjuugaat geconcentreerd
Ag HRP CONC	HRP Conjuugaat geconcentreerd
CONJ BUF	Conjuugaat 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 Conjuugaat
SUB PNPP	Substraat PNPP
BIOT CONJ CONC	Geconcentreerd Biotine conjuugaat
AVID HRP CONC	Geconcentreerd Avidine-HRP conjuugaat
ASS BUF	Assay buffer
Ab BIOT	Biotine conjuugaat
Ab	Specifiek antilichaam
SAV HRP CONC	Streptavidine-HRP concentraat
NSB	Aspecifieke binding
2nd Ab	2de antilichaam
ACID BUF	Verzuringbuffer

	<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
U	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>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
TLU	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>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	Diluyente campione
DIL BUF	Tampone diluizione
ANTISERUM	Antisiero
IMMUNOADSORBENT	Immunoassorbente
DIL CAL	Diluyente 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
U U	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>Symboler brukt</u>
	Les bruksanvisningen før bruk
	Oppbevaringstemperatur
	Bruk innen
LOT	Batchnummer/lotnummer
REF	Katalognummer
CONTROL	Kontroll
I V D	In vitro diagnose-kit
	Produsent
	Inneholder nok til <n> tester
WASH SOLN CONC	Konsentrert vaskeløsning
CAL 0	Nullkalibrator
CAL N	Kalibrator #
CONTROL N	Kontroll #
Ag 125I	Tracer
Ab 125I	Tracer
Ag 125I CONC	Konsentrert tracer
Ab 125I CONC	Konsentrert tracer
	Prøverør
INC BUF	Inkubasjonsbuffer
ACETONITRILE	Acetonitril
SERUM	Serum
DIL SPE	Fortynningsbuffer for prøver
DIL BUF	Fortynningsbuffer
ANTISERUM	antiserum
IMMUNOADSORBENT	Immunoabsorbent
DIL CAL	Fortynningsbuffer for kalibrator
REC SOLN	Rekonstitueringsløsning
PEG	Polyetylen glykol
EXTR SOLN	Ekstraksjonsløsning
ELU SOLN	Elueringsløsning
GEL	Silikapatroner for binding/eluering
PRE SOLN	Forbehandlingsløsning
NEUTR SOLN	Nøytraliseringsløsning
TRACEUR BUF	Tracer-buffer
U U	Microtiter-plate
Ab HRP	HRP-konjugat
Ag HRP	HRP-konjugat
Ab HRP CONC	Konsentrert HRP-konjugat
Ag HRP CONC	Konsentrert HRP-konjugat
CONJ BUF	Konjugatbuffer
CHROM TMB CONC	Kromogent TMB-konsentrat
CHROM TMB	Kromogent TMB-løsning
SUB BUF	Substratbuffer
STOP SOLN	Stoppløsning
INC SER	Inkubasjonsserum
BUF	Buffer
Ab AP	AP-konjugat
SUB PNPP	Substrat PNPP
BIOT CONJ CONC	Biotinkonjugat-konsentrat
AVID HRP CONC	Avidine HRP-konsentrat
ASS BUF	Assaybuffer
Ab BIOT	Biotinkonjugat
Ab	Spesifikt antistoff
SAV HRP CONC	Streptavidin HRP konsentrat
NSB	Ikke-spesifikk binding
2nd Ab	Sekundært antistoff
ACID BUF	Surgjøringsbuffer

	<u>Använda symboler</u>
	Läs instruktionerna före användning
	Förvaringstemperatur
	Används av
LOT	Lotnummer
REF	Katalognummer
CONTROL	Kontroll
I V D	In vitro diagnostiskt kit
	Tillverkare
	Innehållet räcker till <n> prover
WASH SOLN CONC	Tvättlösning, koncentrerad
CAL 0	Nollkalibrerare
CAL N	Kalibrator #
CONTROL N	Kontroll #
Ag 125I	Radioisotop, antigen
Ab 125I	Radioisotop, antikropp
Ag 125I CONC	Radioisotop, antigen koncentrerad
Ab 125I CONC	Radioisotop, antikropp koncentrerad
	Rör
INC BUF	Inkuberingsbuffert
ACETONITRILE	Acetonitril
SERUM	Serum
DIL SPE	Spädningsbuffert för prover
DIL BUF	Spädningsbuffert
ANTISERUM	Antiserum
IMMUNOADSORBENT	Immunoadsorberare
DIL CAL	Kalibratordiluent
REC SOLN	Rekonstitutionslösning
PEG	Polyetylen glykol
EXTR SOLN	Extraktionslösning
ELU SOLN	Elueringslösning
GEL	Silikonpatroner för elueringsbindning
PRE SOLN	Förbehandlingslösning
NEUTR SOLN	Neutraliseringslösning
TRACEUR BUF	Tracerbuffert
U U	Microtiterplatta
Ab HRP	HRP-konjugat
Ag HRP	HRP-konjugat
Ab HRP CONC	HRP-konjugat-koncentrat
Ag HRP CONC	HRP-konjugat-koncentrat
CONJ BUF	Konjugatbuffert
CHROM TMB CONC	Kromogeniskt TMB-koncentrat
CHROM TMB	Kromogenisk TMB-lösning
SUB BUF	Substratbuffert
STOP SOLN	Stoplösning
INC SER	Inkubationsserum
BUF	Buffert
Ab AP	AP-konjugat
SUB PNPP	Substrat-PNPP
BIOT CONJ CONC	Biotinkonjugat koncentrat
AVID HRP CONC	Avidin HRP-koncentrat
ASS BUF	Provbuffert
Ab BIOT	Biotinkonjugat
Ab	-
SAV HRP CONC	-
NSB	-
2nd Ab	-
ACID BUF	-