ANDROSTENEDIONE-RIA-CT

KIP0451

DIAsource ImmunoAssays S.A. - Rue de l'Industrie, 8 - B-1400 Nivelles - Belgium

CE

en

Read entire protocol before use.

ANDROSTENEDIONE-RIA-CT

I. INTENDED USE

Radioimmunoassay for the *in vitro* quantitative measurement of human 4-Androsten-3, 17-Dione (Androstenedione) in serum and plasma.

II. GENERAL INFORMATION

A. Proprietary name : DIAsource ANDROSTENEDIONE-RIA-CT Kit

B. Catalog number : KIP0451 : 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

4-Androsten-3, 17-dione (Androstenedione) is a C19 steroid. It is produced in the adrenal gland and gonads. Androstenedione is an immediate precursor to both testosterone and estrone, both of which may be subsequently converted to estradiol. Due to the presence of a 17-oxo (rather than hydroxyl) group, Androstenedione has relatively weak androgenic activity, estimated at ≤ 20% of testosterone. Although it is a weak androgen, serum Androstenedione levels may exceed testosterone in both normal and disease states, Androstenedione secretion and production rates exceed those of testosterone in women, and significant extra-adrenal conversion of Androstenedione to testosterone occurs. Furthermore, the affinity of sex hormone-binding globulin for Androstenedione is much less than for testosterone or estradiol (1 – 3).

The physiologic role of Androstenedione is not well defined. Serum Androstenedione levels are high in fetal and neonatal serum, decrease during childhood, and increase during puberty. In normal pubertal and adult men, the major portion of Androstenedione is derived from the testis, either directly or from conversion of testosterone, while in normal adult women, essentially equivalent amounts of Androstenedione are produced by the adrenal gland and ovary (2,3). Increased Androstenedione levels may play a role in the development of secondary sexual hair during adrenarche. Serum Androstenedione levels show significant diurnal variation dependent on the secretion of ACTH. Ovarian Androstenedione production is stimulated by luteinizing hormone, and serum Androstenedione levels vary with the menstrual cycle (3). Adrenal Androstenedione production gradually declines with advanced age in both men and women. In addition, ovarian Androstenedione production decreases after menopause (3).

B. Clinical applications

Measurement of Androstenedione provides a useful marker of androgen biosynthesis : Elevated Androstenedione levels have been demonstrated in virilizing congenital adrenal hyperplasia; additionally Androstenedione levels may have advantages over 17-hydroxy-progesterone levels in monitoring treatment of this condition, e.g. less marked diurnal variation and less suppression after brief glucocorticoid exposure (4). Serum Androstenedione levels are also increased in polycystic ovary syndrome, ovarian stromal hyperthecosis, 3b-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency, and other causes of hirsutism in women (3,6 & 7). By definition, Androstenedione levels are normal in idiopathic hirsutism. Elevated serum Androstenedione levels may also occur in adrenal and ovarian virilizing tumors (3). In a prospective study of over 1000 men, a dose-response relationship of androstenedione and prostate cancer risk was demonstrated (5); additional studies will be needed to confirm these findings.

IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

A fixed amount of ^{125}I labelled Androstenedione competes with the Androstenedione to be measured present in the sample or in the calibrator for a fixed amount of antibody sites being immobilized to the wall of a polystyrene tube. After 1 hour incubation at room temperature on a shaker, an aspiration step terminates the competition reaction. The tubes are then washed with 2 ml of Working Wash Solution and aspirated. A calibration curve is plotted and the Androstenedione concentrations of the samples are determined by dose interpolation from the calibration curve.

V. REAGENTS PROVIDED

Reagents	96 Test Kit	Colour Code	Reconstitution
Tubes coated with anti Androstenedione	2 x 48	yellow	**Ready** for use
Ag | **^{125}I** TRACER: ^{125}Iodine labelled Androstenedione (HPLC grade) in buffer with bovine casein and azide (<0.1%)	1 vial 26 ml 111 kBq	red	**Ready** for use
CAL | **0** Zero calibrator in human serum and thymol.	1 vial lyophilized	yellow	**Add** 0.5 ml distilled water
CAL | **N** Calibrators Androstenedione - N = 1 to 5 (see exact values on vial labels) in human serum and thymol.	5 vials lyophilized	yellow	**Add** 0.5 ml distilled water
WASH | **SOLN** | **CONC** Wash solution (TRIS-HCl)	1 vial 10 ml	brown	**Dilute** 70 x with distilled water (use a magnetic stirrer).
CONTROL | **N** Controls - N = 1 or 2 in human serum and thymol.	2 vials lyophilized	silver	**Add** 0.5 ml distilled water

Note : Use the zero calibrator for sample dilutions.

VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

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

1. Distilled water
2. Pipettes for delivery of: 25 µl, 250 µl, 500 µl and 2 ml (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
3. Vortex mixer
4. Magnetic stirrer
5. Tube shaker (400 rpm)
6. 5 ml automatic syringe (Cornwall type) for washing
7. Aspiration system (optional)
8. Any gamma counter capable of measuring ^{125}I may be used (minimal yield 70%).

VII. REAGENT PREPARATION

A. **Calibrators** : Reconstitute the calibrators with 0.5 ml distilled water
B. **Controls**: Reconstitute the controls with 0.5 ml distilled water.
C. **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 kit components are stable until the expiry date, indicated on the label, if kept at 2 to 8°C.
- After reconstitution, calibrators and controls are stable for one week at 2 to 8°C. For longer storage periods, aliquots should be made and kept at -20°C for maximum 3 months. Avoid successive freezing and thawing.
- Freshly prepared Working Wash solution should be used on the same day.
- After its first use, the tracer is stable until expiry date, if kept in the original well-closed vial at 2 to 8°C.
- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration.

IX. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- Serum or plasma samples must be kept at 2-8°C.
- If the test is not run within 24 hrs, storage in aliquots at -20°C is recommended.
- Avoid successive freezing and thawing.
- Serum and plasma provides similar results:

  Y (Hep. plasma) = 0.94 x (serum) + 0.02 r = 0.98 n = 17
  Y (EDTA plasma) = 1.01 x (serum) – 0.03 r = 0.95 n = 17

X. PROCEDURE

A. Handling notes

Do not use the kit or components beyond expiry date. Do not mix materials from different kit lots. Bring all the reagents to room temperature prior to use.
Thoroughly mix all reagents and samples by gentle agitation or swirling.
In order to avoid cross-contamination, use a clean disposable pipette tip for the addition of each reagent and sample.
High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision. Respect the incubation times.
Prepare a 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 samples and dispense 25 µl of each into respective tubes.
3. Dispense 250 µl of ^{125}Iodine labelled Androstenedione into each tube, including the uncoated tubes for total counts.
4. Shake the tube rack gently by hand to liberate any trapped air bubbles.
5. Incubate for 1 hour at room temperature with continuous shaking.
6. 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.
7. Wash tubes with 2 ml Working Wash solution (except total counts) and aspirate (or decant). Avoid foaming during the addition of the Working Wash solution.
8. Let the tubes stand upright for two minutes and aspirate the remaining drop of liquid.
9. Count tubes in a gamma counter for 60 seconds.

XI. CALCULATION OF RESULTS

1. Calculate the mean of duplicate determinations.
2. Calculate the bound radioactivity as a percentage of the binding determined at the zero calibrator point (0) according to the following formula :

$$B/B0\,(\%) = \frac{\text{Counts (Calibrator or sample)}}{\text{Counts (Zero Calibrator)}} \times 100$$

3. 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 Androstenedione concentration of each calibrator point. Reject obvious outliers.
4. 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.
5. By interpolation of the sample (B/B0 (%)) values, determine the Androstenedione concentrations of the samples from the calibration curve.
6. For each assay, the percentage of total tracer bound in the absence of unlabelled Androstenedione (B0/T) must be checked.

XII. TYPICAL DATA

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

ANDROSTENEDIONE-RIA-CT		cpm	B/Bo (%)
Total count		48670	
Calibrator	0.0 ng/ml	14867	100.0
	0.1 ng/ml	13196	88.8
	0.4 ng/ml	9450	63.6
	1.0 ng/ml	5910	39.8
	4.0 ng/ml	2746	18.5
	11.0 ng/ml	987	6.6

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 0.03 ng/ml.

B. Specificity

The specificity of the polyclonal antibody used in this assay was evaluated by RIA, as the ratio of the amount of Androstenedione which yields 50% inhibition of binding of labelled Androstenedione and the amount of cross-reacting compounds (analogs) giving the same inhibition.

Compound	Cross-Reactivity (%)
Androsterone	0.0566
Cortisol	0.0148
Corticosterone	0.0047
Cortisone	0.0099
DHEA	0.0155
DHEA-SO_4	0.0009
21-Deoxycortisone	0.0006
Estradiol-17β	ND
Estriol	ND
Estrone	0.0270
Etiocholanolone	0.0422
17α-hydroxypregnenolone	ND
17α-Hydroxyprogesterone	0.0840
Isoandrosterone	0.0112
Pregnenolone	ND
Progesterone	0.0168
Spironolactone	0.0006
5α-Dihydrotestosterone	0.0105
Testosterone	0.2406

Note : This table shows the cross-reactivity for the anti Androstenedione.
ND : not detectable

C. Precision

INTRA-ASSAY PRECISION

Serum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	10	0.36 ± 0.02	4.5
B	10	6.04 ± 0.19	3.2

INTER-ASSAY PRECISION

Serum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	10	0.42 ± 0.04	9.0
B	10	1.90 ± 0.11	5.9

SD: Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

D. Accuracy

DILUTION TEST

Sample	Dilution	Theoretical Concent. (ng/ml)	Measured Concent. (ng/ml)
Serum 1			
	1/1	-	4.64
	1/2	2.32	2.01
	1/4	1.16	0.97
	1/8	0.58	0.55
	1/16	0.29	0.30
	1/32	0.14	0.20
Serum 2			
	1/1	-	8.94
	1/2	4.47	3.89
	1/4	2.24	2.05
	1/8	1.12	0.98
	1/16	0.56	0.49
	1/32	0.28	0.27
	1/64	0.14	0.18
	1/128	0.07	0.09

Samples were diluted with the zero calibrator.

RECOVERY TEST

Sample	added Androstenedione (ng/ml)	Recovered Androstenedione (ng/ml)	Recovered (%)
Serum	8.0	7.7	96
	4.0	4.0	100
	2.0	1.9	95
	1.0	1.0	100
	0.5	0.4	80

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

E. Time delay between last calibrator and sample dispensing

As shown hereafter, assay results remain accurate even when a sample is dispensed 24 minutes after the calibrator has been added to coated tubes.

TIME DELAY

Serum (ng/ml)	0'	12'	24'
	0.49	0.55	
	1.96	2.13	
	0.45		0.45
	1.69		2.08

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.
The ranges are expressed as 2.5% to 97.5% percentiles.

subjects	N	Mean ng/ml	Range
CHILDREN	25	0.4	0.1 – 0.9
MALES	64	2.0	0.5 – 4.8
FEMALES	250	2.1	0.5 – 4.7
Follicular phase	45	1.9	0.9 – 3.0
Ovulatory peak	14	2.9	1.9 – 4.7
Luteal phase	27	2.0	1.1 – 4.2
Polycystic Ovarian syndrome	25	3.6	2.2 – 6.5
Postmenopausal	45	1.7	0.3 – 3.7

XVI. PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety
For *in vitro* diagnostic use only.
This kit contains ^{125}I (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. Dorfman RI, Shipley RA : **Androgens.** John Wiley and Sons, New York, pp. 116-128, 1956.

2. Horton R, Tait J : **Androstenedione production and interconversion rates measured in peripheral blood and studies on the possible site of its conversion to testosterone.** J Endocrinol Invest 45:301-313,1966.

3. Pang S, Riddick L : Hirsutism. IN Lifshitz T (ed) : **Pediatric Endocrinology, A Clinical Guide, second edition.** Marcel Dekker, Incl., New York, pp. 259-291, 1990.

4. Cavallo A, Corn C, Bryan GT, Meyer WJ III : **The use of plasma androstenedione in monitoring therapy of patients with congenital adrenal hyperplasia.** J Pediatr 95:33-37, 1979. Bull NY Acad Med 53, 347, 1977

5. Barett-Connor E, Garland C, McPhililips JB, Kaw K-T, Wingard DL : **A prospective, population based study of androstenedione, estrogens and prostate cancer**. Canc res 50:169-173, 1990.

6. Rittmaster RS, Thompson DL : **Effects of leuprolide and esametehasone o hair growth and hormone levels in hirsute women : the relative importance of the ovary and adrenal in the pathogenesis of hirsutism.** J Clin Endocrinol Metab 70:112-116, 1993.

7. Zwicker H, Rittmaster RS : **Androsterone sulfate : Physiology and signifiance in hirsute women.** J Clin Endocrinol Metab 76:112-116, 1993.

XVIII. SUMMARY OF THE PROTOCOL

	TOTAL COUNTS µl	CALIBRATORS µl	SAMPLE(S) CONTROLS µl
Calibrators (0-5) Samples, controls Tracer	- - 250	25 - 250	- 25 250
Incubation	1 hour at RT with continuous shaking		
Separation Working Wash solution Separation	-	Aspirate 2.0 ml Aspirate carefully	
Counting	Count tubes for 60 seconds		

DIAsource Catalogue Nr :	P.I. Number :	Revision nr :
KIP0451	1700460/en	110608/1

Revision date : 2011-06-08

CE

fr

Lire entièrement le protocole avant utilisation.

ANDROSTENEDIONE-RIA-CT

I. BUT DU DOSAGE

Trousse de dosage radio-immunologique pour la mesure quantitative *in vitro* du 4-Androsten-3,17-Dione (Androsténédione) dans le sérum et le plasma humain.

II. INFORMATIONS GENERALES

A. Nom du produit : DIAsource ANDROSTENEDIONE-RIA-CT kit

B. Numéro de catalogue: KIP0451 : 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. Activité biologique

Le 4-Androsten-3, 17-dione (Androsténédione) est un stéroïde à 19 carbones. Il est produit dans la glande surrénale et dans les gonades. L'Androsténédione est un précurseur immédiat de la testostérone et de l'estrone, qui peuvent être convertis en estradiol. A cause de la présence d'un groupe 17-oxo (plutôt que hydroxyle), l'Androsténédione a une activité androgénique relativement faible, estimée à ≤ 20% de la testostérone. Bien qu'il est un androgène faible, les taux sériques en Androsténédione peuvent être supérieurs à la testostérone dans un état normal ainsi qu'en cas de maladie, la sécrétion et la production de Androsténédione sont supérieures à la testostérone dans les femmes, et une conversion extra-surrénale importante de l'Androsténédione en testostérone apparaît. En plus, l'affinité de la globuline fixant l'hormone sexuelle pour l'Androsténédione est fort inférieure à celle pour la testostérone ou l'estradiol (1 – 3).

Le rôle physiologique de l'Androsténédione n'est pas bien défini. Les taux sériques en Androsténédione sont élevés dans le sérum foetal et néonatal, diminuent lors de l'enfance, et augmentent lors de la puberté. Chez les hommes pubères et adultes normaux, la plus grande partie de l'Androsténédione est dérivée des testicules, soit directement, soit par conversion de la testostérone, tandis que chez les femmes adultes normales des quantités essentiellement équivalentes d'Androsténédione sont produites par la glande surrénale et les ovaires (2,3). Des taux en Androsténédione élevés peuvent jouer un rôle dans le développement de pilosité sexuelle secondaire lors de l'adrénarche. Les taux sériques en Androsténédione ont une variation diurne importante dépendante de la sécrétion d'ACTH. La production ovaire d'Androsténédione est stimulée par l'hormone lutéinisante, et les taux sériques en Androsténédione varient avec le cycle menstruel (3). La production surrénale de l'Androsténédione diminue progressivement avec l'âge chez les homes comme chez les femmes. En plus, la production ovaire d'Androsténédione diminue après la ménopause (3).

B. Applications cliniques

La mesure d'Androsténédione offre un marqueur utile de la biosynthèse androgénique: des taux élevés en Androsténédione ont été découverts en cas de hyperplasie surrénale congénitale virilisante; en plus les taux en Androsténédione peuvent avoir des avantages par rapport aux taux en 17-hydroxy-progestérone quant à l'observation du traitement de cette condition, à savoir une variation diurne moins importante et moins de suppression après une courte exposition glucocorticoïde (4). Les taux sériques en Androsténédione sont également augmentés dans le syndrome ovarien polycystique, l'hyperthécose ovarienne stromale, la déficience 3b-hydroxystéroïde déhydrogénase, et autres causes de hirsutisme chez les femmes (3,6 & 7). Par définition, les taux en Androsténédione sont normaux en cas de hirsutisme idiopathique. Des taux sériques en Androsténédione peuvent également apparaître en cas de tumeurs virilisantes surrénales et ovariennes (3). Une étude prospective sur plus de 1000 hommes a démontrée une relation de dose-réponse entre l'androsténédione et le risque de cancer de la prostate (5) ; des études supplémentaires seront nécessaires pour confirmer ces résultats.

IV. PRINCIPE DU DOSAGE

Une quantité fixe d'Androsténédione marquée à l'^{125}I est en compétition avec l'Androsténédione à mesurer et présente dans l'échantillon ou dans le calibrateur pour une quantité fixe d'anticorps immobilisés sur les parois du tube en polystyrène. Après 1 heure 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 Androsténédione des échantillons est déterminée par interpolation de la dose sur la courbe de calibration.

V. REACTIFS FOURNIS

Réactifs	96 Tests	Code couleur	Reconstitution
Tubes recouverts avec l'anti Androsténédione	2 x 48	Jaune	**Prêt** à l'emploi
Ag | **^{125}I** TRACEUR: Androsténédione marquée à l'^{125}Iodine (grade HPLC) dans un tampon avec de la caséine bovine et de l'azide de sodium (<0,1%)	1 flacon 26 ml 111 kBq	Rouge	**Prêt** à l'emploi
CAL | **0** Calibrateur zéro dans du sérum humain et du thymol	1 flacon lyophilisés	Jaune	**Ajouter** 0,5 ml d'eau distillée
CAL | **N** Calibrateurs Androsténédione - N = 1 à 5 (cfr. valeurs exactes sur chaque flacon) dans du sérum humain et du thymol	5 flacons lyophilisés	Jaune	**Ajouter** 0,5 ml d'eau distillée
WASH | **SOLN** | **CONC** Solution de lavage (TRIS-HCl)	1 flacon 10 ml	Brun	**Diluer** 70x avec de l'eau distillée (utiliser un agitateur magnétique).
CONTROL | **N** Contrôles - N = 1 ou 2 dans du sérum humain et du thymol	2 flacons lyophilisés	Gris	**Ajouter** 0,5 ml d'eau distillée

Note : Utiliser le calibrateur zéro pour la dilution des échantillons

VI. MATERIEL NON FOURNI

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

1. Eau distillée
2. Pipettes pour distribuer: 50 µl et 500 µl (l'utilisation de pipettes précises et de pointes jetables en plastique est recommandée)
3. Agitateur vortex
4. Agitateur magnétique
5. Agitateur de tubes (400 rpm)
6. Seringue automatique de 5 ml (type Cornwall) pour les lavages
7. Système d'aspiration
8. Tout compteur gamma capable de mesurer l'125I peut être utilisé (rendement minimum 70%).

VII. PREPARATION DES REACTIFS

A. **Calibrateurs** : Reconstituer les calibrateurs avec 0,5 ml d'eau distillée.
B. **Contrôles** : Reconstituer les contrôles avec 0,5 ml d'eau distillée.
C. **Solution de Lavage** : Préparer un volume adéquat de Solution de Lavage en ajoutant 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 REACTIFS

- Avant l'ouverture ou la reconstitution, tous les composants de la trousse sont stables jusqu'à la date d'expiration, indiquée sur l'étiquette, si la trousse est conservée entre 2 et 8°C.
- Après reconstitution, les calibrateurs et les contrôles sont stables pendant une semaine entre 2 et 8°C. Pour de plus longues périodes de stockage, des aliquots devront être réalisés et ceux-ci seront gardés à –20°C. 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. PREPARATION ET STABILITE DE L'ECHANTILLON

- Les échantillons de sérum et de plasma doivent être gardés entre 2 et 8°C.
- Si le test n'est pas réalisé dans les 24 heures, un stockage à -20°C est recommandé.
- Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.
- Le sérum ou le plasma donne des résultats similaires.

  Y (Hep. plasma) = 0,94 x (sérum) + 0,02 r = 0,98 n = 17
  Y (EDTA plasma) = 1,01 x (sérum) – 0,03 r = 0,95 n = 17

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

1. Identifier les tubes recouverts fournis dans la trousse en double pour chaque calibrateur, échantillon, contrôle. Pour la détermination de l'activité totale, identifier 2 tubes non recouverts.
2. Agiter au vortex brièvement les calibrateurs, les échantillons et les contrôles. Puis distribuer 25 µl de chacun d'eux dans leurs tubes respectifs.
3. Distribuer 250 µl d'Androsténédione marquée à l' ^{125}Iodine dans chaque tube, y compris les tubes sans anticorps pour la détermination de l'activité totale.
4. Agiter gentiment le portoir de tube pour libérer toute bulle d'air emprisonnée.
5. Incuber pendant 1 heure à température ambiante sous agitation continue.
6. Aspirer le contenu de chaque tube (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale). Assurez-vous que la pointe utilisée pour aspirer le liquide des tubes atteint le fond de chacun d'eux pour éliminer toute trace de liquide.
7. 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.
8. Laisser les tubes droits pendant 2 minutes et aspirer le reste de liquide.
9. Placer les tubes dans un compteur gamma pendant 60 secondes pour quantifier la radioactivité.

XI. CALCUL DES RESULTATS

1. Calculer la moyenne de chaque détermination réalisée en double.
2. Calculer la capacité de liaison de l'essai comme un pourcentage de liaison déterminé au point de calibration (0) en suivant la formule ci-dessous :

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

3. 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 Androsténédione, écarter les valeurs aberrantes.

4. 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.
5. L'interpolation des valeurs de chaque échantillon (B/B0(%)) détermine les concentrations en Androsténédione à partir de la courbe de calibration.
6. Pour chaque essai, le pourcentage total de traceur lié en absence d'Androsténédione non marquée (B0/T) doit être vérifié.

XII. DONNEES TYPES

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

Androsténédione-RIA-CT		cpm	B/Bo (%)
Activité totale		48670	
Calibrateur	0,0 ng/ml	14867	100,0
	0,1 ng/ml	13196	88,8
	0,4 ng/ml	9450	63,6
	1,0 ng/ml	5910	39,8
	4,0 ng/ml	2746	18,5
	11,0 ng/ml	987	6,6

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 0,03 ng/ml.

B. Spécificité

Le pourcentage de réaction croisée estimé par la comparaison de la concentration (indiquant une inhibition de 50 %) est respectivement :

Composé	Réactivité Croisée (%)
Androstérone	0,0566
Cortisol	0,0148
Corticostérone	0,0047
Cortisone	0,0099
DHEA	0,0155
DHEA-SO_4	0,0009
21-Déoxycortisone	0,0006
Estradiol-17β	ND
Estriol	ND
Estrone	0,0270
Etiocholanolone	0,0422
17α-hydroxypregnénolone	ND
17α-Hydroxyprogestérone	0,0840
Isoandrostérone	0,0112
Pregnénolone	ND
Progestérone	0,0168
Spironolactone	0,0006
5α-Dihydrotestostérone	0,0105
Testostérone	0,2406

Note: cette table montre la réactivité croisée pour l'anti-Androsténédione
ND : n'est pas détectable

C. Précision

INTRA-ESSAI

Sérum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	10	0,36 ± 0,02	4,5
B	10	6,04 ± 0,19	3,2

INTER-ESSAI

Sérum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	10	0,42 ± 0,04	9,0
B	10	1,90 ± 0,11	5,9

SD : Déviation Standard; CV: Coefficient de variation

D. Exactitude

TEST DE DILUTION

Echantillon	Dilution	Concent. Théorique (ng/ml)	Concent. Mesurée (ng/ml)
Serum 1			
	1/1	-	4,64
	1/2	2,32	2,01
	1/4	1,16	0,97
	1/8	0,58	0,55
	1/16	0,29	0,30
	1/32	0,14	0,20
Serum 2			
	1/1	-	8,94
	1/2	4,47	3,89
	1/4	2,24	2,05
	1/8	1,12	0,98
	1/16	0,56	0,49
	1/32	0,28	0,27
	1/64	0,14	0,18
	1/128	0,07	0,09

Les échantillons ont été dilués avec le Calibrateur zéro.

TEST DE RECUPERATION

Echantillon	Androsténédione ajouté (ng/ml)	Androsténédione récupéré (ng/ml)	Recupération (%)
Serum	8,0	7,7	96
	4,0	4,0	100
	2,0	1,9	95
	1,0	1,0	100
	0,5	0,4	80

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

E. Délai entre la distribution du dernier calibrateur et celle de l'échantillon

Comme montré ci-dessous, les résultats d'un essai restent précis même quand un échantillon est distribué 24 minutes après que le calibrateur ait été ajouté aux tubes avec l'anticorps.

DELAI

Serum (ng/ml)	0'	12'	24'
	0,49	0,55	
	1,96	2,13	
	0,45		0,45
	1,69		2,08

XIV. CÔNTROLE QUALITE INTERNE

- Si les résultats obtenus pour le(s) contrôle(s) 1 et/ou 2 ne sont pas dans l'intervalle spécifié sur l'étiquette du flacon, les résultats ne peuvent pas être utilisés à moins que l'on ait donné une explication satisfaisante de la non-conformité.
- Chaque laboratoire est libre de faire ses propres stocks d'échantillons contrôles, lesquels doivent être congelés aliquotés.
- Les critères d'acceptation pour les écarts des valeurs en duplicat des échantillons doivent être basés sur les pratiques de laboratoire courantes.

XV. VALEURS ATTENDUES

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

Population	N	Moyen ng/ml	Portée
ENFANTS	25	0,4	0,1 – 0,9
HOMMES	64	2,0	0,5 – 4,8
FEMMES	250	2,1	0,5 – 4,7
Phase folliculaire	45	1,9	0,9 – 3,0
Sommet ovulatoire	14	2,9	1,9 – 4,7
Phase lutéale	27	2,0	1,1 – 4,2
Syndrome ovarien polycystique	25	3,6	2,2 – 6,5
Postménopausique	45	1,7	0,3 – 3,7

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

XVI. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

Sécurité

Pour utilisation en diagnostic *in vitro* uniquement.

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

Ne pas fumer, ni boire, ni manger ni appliquer de produits cosmétiques dans les laboratoires où des produits radioactifs sont utilisés. Ne pas pipeter avec la bouche. Utiliser des vêtements protecteurs et des gants à usage unique.

XVII. BIBLIOGRAPHIE

1. Dorfman RI, Shipley RA : **Androgens.** John Wiley and Sons, New York, pp. 116-128, 1956.
2. Horton R, Tait J : **Androstenedione production and interconversion rates measured in peripheral blood and studies on the possible site of its conversion to testosterone.** J Endocrinol Invest 45:301-313,1966.
3. Pang S, Riddick L : Hirsutism. IN Lifshitz T (ed) : **Pediatric Endocrinology, A Clinical Guide, second edition.** Marcel Dekker, Incl., New York, pp. 259-291, 1990.
4. Cavallo A, Corn C, Bryan GT, Meyer WJ III : **The use of plasma androstenedione in monitoring therapy of patients with congenital adrenal hyperplasia.** J Pediatr 95:33-37, 1979. Bull NY Acad Med 53, 347, 1977
5. Barett-Connor E, Garland C, McPhililips JB, Kaw K-T, Wingard DL : **A prospective, population based study of androstenedione, estrogens and prostate cancer**. Canc res 50:169-173, 1990.
6. Rittmaster RS, Thompson DL : **Effects of leuprolide and esametehasone o hair growth and hormone levels in hirsute women : the relative importance of the ovary and adrenal in the pathogenesis of hirsutism.** J Clin Endocrinol Metab 70:112-116, 1993.
7. Zwicker H, Rittmaster RS : **Androsterone sulfate : Physiology and signifiance in hirsute women.** J Clin Endocrinol Metab 76:112-116, 1993.

XVIII. RESUME DU PROTOCOLE

	ACTIVITE TOTALE (µl)	CALIBRA-TEURS (µl)	ECHANTILLON(S) CONTROLES (µl)
Calibrateurs (0 à 5)	-	25	-
Echantillons, contrôles	-	-	25
Traceur	250	250	250
Incubation	1 heure à température ambiante sous agitation continue.		
Séparation Solution de Lavage Séparation	-	aspiration 2,0 ml aspiration	
Comptage (radioactivité)	Temps de comptage des tubes : 60 secondes		

Numéro de catalogue DIAsource : KIP0451	Numéro de P.I.: 1700460/fr	Numéro de révision : 110608/1

Date de révision : 2011-06-08

CE

nl

Lees het hele protocol vóór gebruik.

ANDROSTENEDIONE-RIA-CT

I. BEOOGD GEBRUIK

Radioimmunoassay voor de kwantitatieve bepaling *in vitro* van humaan Androstene-3,17-Dione (Androstenedione) in serum en plasma.

II. ALGEMENE INFORMATIE

A. Gedeponeerd handelsmerk: DIAsource ANDROSTENEDIONE-RIA-CT kit

B. Catalogusnummer: KIP0451: 96 testen.

C. Geproduceerd door: DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, België.

Voor technische assistentie of voor bestelinformatie
kunt u contact opnemen met :
Tel : +32 (0)67 88.99.99 Fax: +32 (0)67 88.99.96

III. KLINISCHE ACHTERGROND

A. Biologische activiteit

4-Androsten-3, 17-dione is een steroïde met 19 C. Het wordt geproduceerd in de bijnier en de gonaden. Androstenedione is een directe precursor voor zowel testosterone en estrone, die op hun beurt dan weer omgezet kunnen worden in estradiol. Door de aanwezigheid van een 17-oxo (eerder dan hydroxyl) groep, heeft Androstenedione een relatief zwakke androgene activiteit, geschat op ≤ 20% van testosterone. Hoewel het een zwak androgeen is kunnen de Androstenedione gehaltes in serum die testosterone overtreffen zowel in normale als zieke toestanden; de secretie- en productiegehaltes van Androstenedione overtreffen die van testosterone bij vrouwen, en er komt een aanzienlijke extra-adrenale conversie van Androstenedione naar testosterone voor. Daarenboven is de affiniteit van geslachtshormoon-bindend globuline voor Androstenedione veel minder dan voor testosterone of estradiol (1 – 3).

De fysiologische rol van Androstenedione is niet goed gedefinieerd. De gehaltes van Androstenedione in serum zijn hoog in foetaal en neonataal serum, nemen af tijdens de kindertijd, en verhogen tijdens de pubertijd. Bij normale puberale en volwassen mannen, komt het merendeel van Androstenedione van de testes, ofwel rechtstreeks ofwel vanuit de conversie van testosterone, terwijl bij normale volwassen vrouwen vooral equivalente hoeveelheden Androstenedione geproduceerd worden door de bijnier en de eierstokken (2,3). Verhoogde gehaltes van Androstenedione kunnen een rol spelen in de ontwikkeling van secundaire seksuele beharing tijdens de adrenarche. De gehaltes van Androstenedione in serum vertonen een belangrijke dagelijkse variatie afhankelijk van de secretie van ACTH. De productie van Androstenedione in de eierstokken wordt gestimuleerd door het luteïnizerend hormoon, en de gehaltes van Androstenedione in serum variëren met de menstruatiecyclus (3). De adrenale Androstenedione productie neemt geleidelijk aan af naarmate het ouder worden bij zowel mannen als vrouwen. Daarenboven neemt de productie van Androstenedione in de eierstokken af na de menopauze (3).

B. Klinische toepassingen

De meting van Androstenedione verleent een nuttige marker voor androgene biosynthese: verhoogde gehaltes van Androstenedione zijn aangetoond bij virilizerende congenitale adrenale hyperplasie; daarenboven hebben de gehaltes van Androstenedione voordelen tegenover de gehaltes van 17-hydroxy-progesterone bij het opvolgen van de behandeling van deze aandoening, nl. minder nadrukkelijke dagelijkse variatie en minder onderdrukking na een korte glucocorticoïde blootstelling (4). De gehaltes van Androstenedione in serum zijn ook verhoogd bij het polycystisch eierstoksyndroom, stromale hyperthecosis van de eierstok, 3b-hydroxysteroïde dehydrogenase deficiëntie, en andere oorzaken van hirsutisme bij vrouwen (3,6 & 7). Per definitie zijn de gehaltes van Androstenedione normaal bij idiopathisch hirsutisme. Verhoogde gehaltes van Androstenedione in serum kunnen ook voorkomen bij virilizerende adrenale en eierstoktumors (3). In een prospectieve studie van meer dan 1000 mannen werd een dosis-respons verhouding tussen androstenedione en het risico op prostaatkanker aangetoond (5); bijkomende studies zullen nodig zijn om deze bevindingen te bevestigen.

IV. BESCHRIJVING VAN DE METHODE

Een vaste hoeveelheid ^{125}I gelabeld Androstenedione concurreert met Androstenedione dat bepaald moet worden en aanwezig is in het monster of in de kalibrator voor een vast aantal plaatsen met antilichamen die geïmmobiliseerd zijn aan de wand van een buisje van polystyreen. Na een incubatieperiode van 1 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 Androstenedione van de monsters worden bepaald door dosisinterpolatie van de kalibratiecurve.

V. GELEVERDE REAGENTIA

Reagens	Kit voor 96 testen	Kleur -code	Reconstitutie
Buisjes gecoat met anti Androstenedione	2 x 48	Geel	**Klaar** voor gebruik
Ag | **^{125}I** Tracer : Androstenedione-gelabeld met ^{125}jood (HPLC-kwaliteit) in buffer met bovien caseine en azide (< 0,1%)	1 flacon 26 ml 111 kBq	Rood	**Klaar** voor gebruik
CAL | **0** Nulkalibrator in humaan serum met thymol	1 flacon gevries-droogd	Geel	0,5 ml gedestilleerd water **toevoegen**
CAL | **N** Kalibrators Androstenedione : N = 1 tot 5 (zie de exacte waarden op de flaconetiketten) in humaan serum met thymol	5 flacons gevries-droogd	Geel	0,5 ml gedestilleerd water **toevoegen**
WASH | **SOLN** | **CONC** Wasoplossing 70x : TRIS-HCl	1 flacon 10 ml	Bruin	70x met gedistilleerd water **verdunnen** (gebruik een magnetische roerder)
CONTROL | **N** Controles: N = 1 of 2 in humaan serum met thymol	2 flacons, gevries-droogd	zilver	0,5 ml gedestilleerd water **toevoegen**

Opmerking: Gebuik de nulkalibrator voor monsterverdunningen

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 50 µl en 500 µl (het gebruik van nauwkeurige pipetten met plastic wegwerptips wordt aanbevolen).
3. Vortexmenger.
4. Magnetische roerder.
5. Schudder voor de buisjes (400 rpm)
6. Automatische spuit van 5 ml (type Cornwall) voor de wasfase.
7. Afzuigsysteem (facultatief).
8. 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 kalibrators met 0,5 ml gedestilleerd water.
B. **Controles**: Reconstitueer de controles met 0,5 ml gedestilleerd water.
C. **Werk-wasoplossing**: Bereid een voldoende hoeveelheid werk-wasoplossing door 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. MONSTERAFNAME EN MONSTERBEREIDING

- Serum en plasmamonsters moeten bij 2-8°C bewaard worden.
- Indien de bepaling niet binnen 24 uur uitgevoerd wordt, dan wordt aanbevolen om ze bij -20°C te bewaren.
- Vermijd herhaalde invriezing en ontdooiing.
- Serum en plasma leveren vergelijkbare resultaten op.

  Y (Hep. plasma) = 0,94 x (serum) + 0,02 r = 0,98 n = 17
  Y (EDTA plasma) = 1,01 x (serum) – 0,03 r = 0,95 n = 17

X. PROCEDURE

A. Opmerkingen bij de procedure

Gebruik de kit of de componenten niet langer dan de aangegeven vervaldatum. Materialen van kits van verschillende loten mogen niet gemengd worden. Laat alle reagentia op kamertemperatuur komen vóór gebruik.

Meng alle reagentia en monsters goed door ze voorzichtig te bewegen of door er voorzichtig mee te draaien. Om kruisbesmetting te vermijden, moet een propere wegwerpbare pipettip gebruikt worden voor toevoeging van elk reagens en monster.

Pipetten met een grote precisie of geautomatiseerde pipetteerapparatuur zullen de precisie verhogen. Respecteer de incubatietijden.

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

B. Procedure

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 totaaltellingen.
2. Vortex de kalibrators, monsters en controles gedurende korte tijd en distribueer 25 µl van elk in het desbetreffende buisje.
3. Distribueer 250 µl Androstenedione dat met ^{125}I gelabeld werd in elk buisje, inclusief de niet gecoate buisjes voor de totaaltellingen.
4. Schud het rek met de buisjes voorzichtig zodat eventuele ingesloten luchtbellen vrijkomen.
5. Incubeer gedurende 1 uur bij kamertemperatuur terwijl er voortdurend mee geschud wordt.
5. Zuig de inhoud van elk buisje (met uitzondering van de totaaltellingen) op Zorg ervoor dat de plastic tip van de aspirator tot aan de bodem van het gecoate buisje komt zodat alle vloeistof verwijderd wordt.
6. Was de buisjes met 2 ml werk-wasvloeistof (met uitzondering van de totaaltellingen) en zuig op. Vermijd schuimvorming tijdens toevoeging van de werk-wasvloeistof.
7. Na de wasfase moeten de buisjes gedurende twee minuten rechtop blijven staan en zuig daarna de overblijvende vloeistof op.
8. Tel de buisjes in een gammateller gedurende 60 seconden.

XI. BEREKENING VAN DE RESULTATEN

1. Bereken het gemiddelde voor de bepalingen in duplo.
2. Bereken het percentage binding van de gebonden radioactiviteit, bepaald op het punt van de nulkalibrator (0), aan de hand van de volgende formule:

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

3. Zet de (B/B0(%)) waarden uit voor elk kalibratorpunt, als een functie van de Androstenedione concentratie van elk kalibratorpunt, op 3-cyclisch semi-logaritmisch of dubbellogaritmisch papier, verwerp hierbij de duidelijke uitschieters.

4. 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.
5. Bepaal de Androstenedione concentraties van de monsters uit de referentiecurve door de monsterwaarden (B/B0(%)) te interpoleren.
6. Voor elke bepaling moet het totaalpercentage van de tracer, gebonden in afwezigheid van ongelabeld Androstenedione (B0/T), gecontroleerd worden.

XII. KENMERKENDE GEGEVENS

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

ANDROSTENEDIONE-RIA-CT		Cpm	B/Bo (%)
Totaaltelling		48670	
Kalibrator	0,0 ng/ml	14867	100,0
	0,1 ng/ml	13196	88,8
	0,4 ng/ml	9450	63,6
	1,0 ng/ml	5910	39,8
	4,0 ng/ml	2746	18,5
	11,0 ng/ml	987	6,6

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 0,03 ng/ml.

B. Specificiteit

De percentages van kruisreactiviteit geschat naar de vergelijking van de concentraties (een remming van 50% toegevend) zijn respectievelijk:

Bestanddeel	Kruisreactiviteit (%)
Androsterone	0,0566
Cortisol	0,0148
Corticosterone	0,0047
Cortisone	0,0099
DHEA	0,0155
DHEA-SO_4	0,0009
21-Deoxycortisone	0,0006
Estradiol-17β	ND
Estriol	ND
Estrone	0,0270
Etiocholanolone	0,0422
17α-hydroxypregnenolone	ND
17α-Hydroxyprogesterone	0,0840
Isoandrosterone	0,0112
Pregnenolone	ND
Progesterone	0,0168
Spironolactone	0,0006
5α-Dihydrotestosteron	0,0105
Testosterone	0,2406

Nota: Deze tabel toont de kruisreactiviteit voor het anti -Androstenedione
ND : niet detecteerbaar

C. Precisie

PRECISIE BINNEN EEN TEST

Serum	N	<X> ± SD (ng/ml)	VC (%)
A	10	0,36 ± 0,02	4,5
B	10	6,04 ± 0,19	3,2

PRECISIE TUSSEN TESTEN

Serum	N	<X> ± SD (ng/ml)	VC (%)
A	10	0,42 ± 0,04	9,0
B	10	1,90 ± 0,11	5,9

SD: standaarddeviatie; VC: variatiecoëfficiënt

D. Nauwkeurigheid

VERDUNNINGSTEST

Monster	Verdunning	Theoretische concentratie (ng/ml)	Concentratie die bepaald werd (ng/ml)
Serum 1			
	1/1	-	4,64
	1/2	2,32	2,01
	1/4	1,16	0,97
	1/8	0,58	0,55
	1/16	0,29	0,30
	1/32	0,14	0,20
Serum 2			
	1/1	-	8,94
	1/2	4,47	3,89
	1/4	2,24	2,05
	1/8	1,12	0,98
	1/16	0,56	0,49
	1/32	0,28	0,27
	1/64	0,14	0,18
	1/128	0,07	0,09

Monsters werden verdund met de Nulkalibrator.

RECOVERY-TEST

Monster	Androstenedione toegevoegd (ng/ml)	Recovery van Androstenedione (ng/ml)	Recovery (%)
Serum	8,0	7,7	96
	4,0	4,0	100
	2,0	1,9	95
	1,0	1,0	100
	0,5	0,4	80

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

E. 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 24 minuten na toevoeging van de kalibrator over de gecoate buisjes gedistribueerd wordt.

TIJDSPANNE

Serum (ng/ml)	0'	12'	24'
	0,49	0,55	
	1,96	2,13	
	0,45		0,45
	1,69		2,08

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.

Subjecten	N	Gemiddelde ng/ml	Bereik
KINDEREN	25	0,4	0,1 – 0,9
MANNEN	64	2,0	0,5 – 4,8
VROUWEN:	250	2,1	0,5 – 4,7
Folliculaire fase	45	1,9	0,9 – 3,0
Ovulatoire piek	14	2,9	1,9 – 4,7
Luteale fase	27	2,0	1,1 – 4,2
Polycystisch eierstoksyndroom	25	3,6	2,2 – 6,5
Postmenopausaal	45	1,7	0,3 – 3,7

(*) Bereik gebaseerd op 2.5% & 97.5% percentielen.

XVI. VOORZORGSMAATREGELEN EN WAARSCHUWINGEN

Veiligheid

Uitsluitend voor in vitro diagnostisch gebruik.

Deze kit bevat ^{125}I (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

1. Dorfman RI, Shipley RA : **Androgens.** John Wiley and Sons, New York, pp. 116-128, 1956.
2. Horton R, Tait J : **Androstenedione production and interconversion rates measured in peripheral blood and studies on the possible site of its conversion to testosterone.** J Endocrinol Invest 45:301-313,1966.
3. Pang S, Riddick L : Hirsutism. IN Lifshitz T (ed) : **Pediatric Endocrinology, A Clinical Guide, second edition.** Marcel Dekker, Incl., New York, pp. 259-291, 1990.
4. Cavallo A, Corn C, Bryan GT, Meyer WJ III : **The use of plasma androstenedione in monitoring therapy of patients with congenital adrenal hyperplasia.** J Pediatr 95:33-37, 1979. Bull NY Acad Med 53, 347, 1977
5. Barett-Connor E, Garland C, McPhililips JB, Kaw K-T, Wingard DL : **A prospective, population based study of androstenedione, estrogens and prostate cancer**. Canc res 50:169-173, 1990.
6. Rittmaster RS, Thompson DL : **Effects of leuprolide and esametehasone o hair growth and hormone levels in hirsute women : the relative importance of the ovary and adrenal in the pathogenesis of hirsutism.** J Clin Endocrinol Metab 70:112-116, 1993.
7. Zwicker H, Rittmaster RS : **Androsterone sulfate : Physiology and signifiance in hirsute women.** J Clin Endocrinol Metab 76:112-116, 1993.

XVIII. SAMENVATTING VAN HET PROTOCOL

	TOTAAL-TELLINGEN (µl)	KALIBRATORS (µl)	MONSTER(S) CONTROLES (µl)
Kalibrators (0 tot 5)	-	25	-
Monsters, controles	-	-	25
Tracer	250	250	250
Incubatie	1 uur bij kamertemperatuur terwijl er voortdurend geschud wordt		
Scheiding	-	opzuigen	
Werk-wasoplossing		2,0 ml	
Scheiding		opzuigen	
Telling	Tel buisjes gedurende 60 seconden		

DIAsource catalogusnummer: KIP0451	Bijsluiternummer : 1700460/nl	Revisienummer : 110608/1

Revisiedatum : 2011-06-08

CE

de

Vor Gebrauch des Kits lesen Sie bitte diese Packungsbeilage.

ANDROSTENEDIONE-RIA-CT

I. VERWENDUNGSZWECK

Ein Radio-Immunoassay für die quantitative *in vitro* Bestimmung von humanem 4-Androsten-3,17-Dion (Androstendion) in Serum und Plasma.

II. ALLGEMEINE INFORMATION

A. Handelsbezeichnung : DIAsource ANDROSTENEDIONE-RIA-CT Kit

B. Katalognummer : KIP0451 : 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

III. KLINISCHER HINTERGRUND

A. Biologische Aktivität

4-Androsten-3, 17-dion (Androstendion) ist ein C19-Steroid. Es wird in den Nebennieren und den Gonaden produziert. Androstendion ist ein unmittelbarer Vorläufer von Testosteron und Östron, die beide in der Folge zu Östradiol umgewandelt werden können. Wegen der Anwesenheit einer 17-Oxo- (anstelle von Hydroxy-) Gruppe hat Androstendion eine relativ schwache androgene Aktivität, die auf ≤ 20% von Testosteron geschätzt wird. Obwohl es ein schwaches Androgen ist, kann der Androstendion-Spiegel im Serum Testosteron im gesunden und kranken Zustand übersteigen; die Werte von Androstendion-Sekretion und -Produktion übersteigen bei Frauen jene von Testosteron und es kommt zu einer signifikanten extra-adrenalen Konversion von Androstendion in Testosteron. Weiters ist die Affinität des geschlechtshormonbindenden Globulins für Androstendion viel geringer als für Testosteron oder Östradiol (1-3).
Die physiologische Rolle von Androstendion ist nicht gut definiert. Androstendion-Werte im Serum sind in fötalem und neonatalem Serum hoch, nehmen während der Kindheit ab und steigen während der Pubertät an. In normalen pubertären und erwachsenen Männern stammt der Großteil von Androstendion aus den Hoden, entweder direkt oder aus Konversion von Testosteron, während in normalen erwachsenen Frauen essenziell äquivalente Mengen von Androstendion durch Nebenniere und Ovarien produziert werden (2,3). Erhöhte Androstendion-Werte können bei der Entwicklung von sekundärer Geschlechtsbehaarung während der Adrenarche eine Rolle spielen. Androstendion-Werte im Serum weisen im Tagesverlauf eine signifikante Schwankung auf, die von der Sekretion von ACTH abhängt. Die Androstendion-Produktion durch die Ovarien wird durch das luteinisierende Hormon stimuliert, und die Androstendion-Werte im Serum variieren mit dem Menstruationszyklus (3). Die Androstendion-Produktion durch die Nebennieren nimmt sowohl bei Frauen als auch bei Männern mit fortschreitendem Alter ab. Darüber hinaus sinkt die Androstendion-Produktion durch die Ovarien nach der Menopause (3).

B. Klinische Anwendungen

Die Messung von Androstendion bietet einen nützlichen Marker der Androgenbiosynthese: erhöhte Androstendion-Werte wurden bei virilisierender kongenitaler Nebennierenhyperplasie nachgewiesen. Darüber hinaus kann der Androstendion-Wert gegenüber dem 17-Hydroxyprogesteron-Wert bei der Kontrolle der Behandlung dieser Erkrankung Vorteile bieten, z.B. weniger ausgesprochene Schwankung im Tagesverlauf und geringere Suppression nach kurzer Glukokortikoid-Exposition (4). Die Androstendion-Werte im Serum sind auch beim polyzystischen Ovariensyndrom, Thekomatose, 3b-Hydroxysteroid-Dehydrogenase-Mangel und anderen Ursachen von Hirsutismus bei Frauen erhöht (3,6,7). Per definitionem sind die Androstendion-Werte bei idiopathischem Hirsutismus normal. Erhöhte Androstendion-Werte im Serum können auch bei virilisierenden Tumoren der Nebennierenrinde und des Ovars auftreten (3). In einer prospektiven Studie an über 1.000 Männern wurde eine Dosis-Reaktion-Beziehung von Androstendion und dem Risiko auf Prostatakrebs nachgewiesen (5); zur Bestätigung dieser Ergebnisse sind weitere Studien erforderlich.

IV. GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

Eine festgesetzte Menge an ^{125}I-markiertem ANDROSTENDION konkurriert mit dem zu messenden, in der Probe oder in dem Kalibrator vorhandenen Steroid um eine festgesetzte Menge an Antikörperbindungsstellen, die an der Wand des Polystyren Röhrchens fixiert sind. Nach 1 Stunde Inkubation bei Raumtemperatur, beendet das Absaugen die Verdrängungsreaktion. Die Röhrchen werden anschliessend mit Waschlösung gewaschen, danach wird nochmals abgesaugt. Eine Standardkurve wird gedruckt und die ANDROSTENDION-Konzentrationen der Proben werden über Dosis Interpolation der Kalibrationskurve bestimmt.

V. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

Reagenz	96 Test Kit	Farbcode	Rekonstitution
Mit anti Androstendion - beschichtete Röhrchen	2 x 48	Gelb	**gebrauchsfertig**
Ag | **^{125}I** TRACER: ^{125}Iod-markiertes ANDROSTENDION (HPLC grade) in Puffer mit Rindercasein und Azid (<0,1%)	1 Gefäß 26 ml 111 kBq	Rot	**gebrauchsfertig**
CAL | **0** Null-Kalibrator: Humanserum und Thymol	1 Gefäß lyophilisiert	Gelb	0,5 ml dest. Wasser **zugeben**
CAL | **N** Kalibratoren - N = 1 bis 5 (genaue Werte auf Gefäß-Etiketten) in Humanserum und Thymol	5 Gefäße lyophilisiert	Gelb	0,5 ml dest. Wasser **zugeben**
WASH | **SOLN** | **CONC** Waschlösung (TRIS-HCl)	1 Gefäß 10 ml	Braun	70x mit dest. Wasser (Magnetrührer verwenden) **verdünnen**
CONTROL | **N** Kontrollen - N = 1 oder 2 in Humanserum und Thymol	2 Gefäße lyophilisiert	Silber	0,5 ml dest. Wasser **zugeben**

Bemerkung: Benutzen Sie den Null-Kalibrator für Serumverdünnungen.

VI. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

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

1. Dest. Wasser
2. Pipetten: 25 µl, 250 µl, 500 µl und 2 ml (Verwendung von Präzisionspipetten mit Einwegpipettenspitzen wird empfohlen)
3. Vortexmixer
4. Magnetrührer
5. Schüttler für Röhrchen (400 rpm)
6. 5 ml automatische Spritze (Cornwall-Typ) zum Waschen
7. Absaugsystem (optional)
8. Jeder Gamma-Counter, der ^{125}I messen kann, kann verwendet werden. Maximale Messeffizienz sollte gewährleistet sein.

VII. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

A. **Kalibratoren**: Rekonstituieren Sie die Kalibratoren mit 0,5 ml dest. Wasser.
B. **Kontrollen**: Rekonstituieren Sie die Kontrollen mit 0,5 ml dest. Wasser.
C. **Waschlösung**: Zur Vorbereitung eines angemessenen Volumens nutzbarer Waschlösung, mischen Sie zu einem Volumen Waschlösung (70x) 69 Volumen distilliertes Wasser. Benutzen Sie einen Magnetrührer. Entsorgen Sie nach jedem Arbeitstag die überflüssige Waschlösung.

VIII. *AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN*

- Vor dem Öffnen und Rekonstituieren sind alle Kitkomponenten bei 2 bis 8°C bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum haltbar.
- Nach der Rekonstitution sind die Kalibratoren und Kontrollen eine Woche bei 2 bis 8°C stabil. Für eine längere Aufbewahrung sollten diese Reagenzien aliquotiert und bei –20°C eingefroren werden während max. 3 Monaten. Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.
- Die Waschlösung sollte frisch hergestellt und am selben Tag aufgebraucht werden.
- Wenn der Tracer nach der ersten Benutzung wieder im gutverschloßenen Originalgefäß bei 2 bis 8°C aufbewahrt wird, ist er bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.
- Veränderungen im Aussehen der Kitkomponenten können auf Instabilität bzw. Zerfall hindeuten.

IX. PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG

- Serum und Plasmaproben müssen bei 2-8°C aufbewahrt werden.
- Falls der Test nicht innerhalb von 24 Std. durchgeführt wird, müssen die Proben bei –20°C aufgehoben werden.
- Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.
- Serum- oder Plasmaproben liefern ähnliche Ergebnisse
  Y (Hep. Plasma) = 0,94 x (serum) + 0,02 r = 0,98 n = 17
  Y (EDTA Plasma) = 1,01 x (serum) – 0,03 r = 0,95 n = 17

X. DURCHFÜHRUNG

A. Bemerkungen zur Durchführung

Verwenden Sie den Kit oder dessen Komponenten nicht nach dem Verfallsdatum.
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 Kontrolle und jede Probe. Zur Bestimmung der Gesamtaktivität, beschriften Sie 2 normale Röhrchen.
2. Vortexen Sie Kalibratoren, Kontrollen und Proben kurz und geben Sie 25 µl von jedem in ihre Röhrchen.
3. Geben Sie 250 µl des ^{125}Iod-markierten ANDROSTENDION in jedes Röhrchen, einschließlich der unbeschichteten Röhrchen für die Gesamtaktivität.
4. Schütteln Sie vorsichtig die Halterung mit den Röhrchen um Blasen zu entfernen.
5. Inkubieren Sie 1 Stunde bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln.
6. Saugen Sie den Inhalt jedes Röhrchens ab (oder dekantieren Sie) (außer Gesamtaktivität). Vergewissern Sie sich, dass die Plastikspitze des Absaugers den Boden des beschichteten Röhrchens erreicht, um die gesamte Flüssigkeit zu entfernen.
7. Waschen Sie die Röhrchen mit 2 ml Waschlösung (außer Gesamtaktivität) und saugen Sie ab (oder dekantieren Sie). Vermeiden Sie Schaumbildung bei Zugabe der Waschlösung.
8. Lassen Sie die Röhrchen 2 Minuten aufrecht stehen, und saugen Sie den verbleibenden Flüssigkeitstropfen ab.
9. 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. Berechnen Sie die gebundene Radioaktivität als Prozentsatz des am Null-Kalibratorpunkt (0) bestimmten Wertes nach folgender Formel:

$$B/B0\,(\%) = \frac{\text{Aktivität (Kalibrator oder Probe)}}{\text{Aktivität (Null-Kalibrator)}} \times 100$$

3. Verwenden Sie semi-logarithmisches oder doppelt-logarithmisches Millimeterpapier (über 3 Größenordnungen), tragen Sie die (B/B0(%))-Werte für jeden Kalibratorpunkt ein als Funktion der ANDROSTENDION-Konzentration für jeden Kalibratorpunkt. Schließen Sie offensichtliche ‚Ausreißer' aus.
4. Computergestützte Methoden können ebenfalls zur Erstellung der Kalibrationskurve verwendet werden. Falls die Ergebnisberechnung mit dem Computer durchgeführt wird, empfehlen wir die Berechnung mit einer ‚4 Parameter'-Kurvenfunktion.
5. Bestimmen Sie die ANDROSTENDION-Konzentrationen der Proben durch Interpolation der Probenwerte (B/B0(%)) aus der Referenzkurve.
6. Bei jedem Assay muss der Prozentsatz des gesamten gebundenen Tracers ohne unmarkiertes ANDROSTENDION (B0/T) geprüft werden.

XII. TYPISCHE WERTE

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

ANDROSTENDION-RIA-CT		cpm	B/Bo (%)
Gesamtaktivität		48670	
Kalibrator	0,0 ng/ml	14867	100,0
	0,1 ng/ml	13196	88,8
	0,4 ng/ml	9450	63,6
	1,0 ng/ml	5910	39,8
	4,0 ng/ml	2746	18,5
	11,0 ng/ml	987	6,6

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 0,03 ng/ml.

B. Spezifität

Der Prozentsatz der Kreuzreaktion, der im Vergleich der Konzentration geschätzt wurde, welche eine 50%ige Inhibition ergibt, beträgt respektive:

Substanz	Kreuzreaktivität (%)
Androsteron	0,0566
Cortisol	0,0148
Corticosteron	0,0047
Cortison	0,0099
DHEA	0,0155
DHEA-SO_4	0,0009
21-Deoxycortison	0,0006
Östradiol-17β	NN
Östriol	ND
Östron	0,0270
Etiocholanolon	0,0422
17α-Hydroxypregnenolon	NN
17α-Hydroxyprogesteron	0,0840
Isoandrosteron	0,0112
Pregnenolon	NN
Progesteron	0,0168
Spironolacton	0,0006
5α-Dihydrotestosteron	0,0105
Testosteron	0,2406

Bemerkung: Diese Tabelle zeigt die Kreuzreaktivität für die anti-ANDROSTENDION
NN: nicht nachweisbar

C. Präzision

INTRA-ASSAY PRÄZISION

Serum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	10	0,36 ± 0,02	4,5
B	10	6,04 ± 0,19	3,2

INTER-ASSAY PRÄZISION

Serum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	10	0,42 ± 0,04	9,0
B	10	1,90 ± 0,11	5,9

SD: Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

D. Genauigkeit

VERDÜNNUNGSTEST

Probe	Verdünnung	Theoretische Konzent. (ng/ml)	Gemessene Konzent. (ng/ml)
Serum 1			
	1/1	-	4,64
	1/2	2,32	2,01
	1/4	1,16	0,97
	1/8	0,58	0,55
	1/16	0,29	0,30
	1/32	0,14	0,20
Serum 2			
	1/1	-	8,94
	1/2	4,47	3,89
	1/4	2,24	2,05
	1/8	1,12	0,98
	1/16	0,56	0,49
	1/32	0,28	0,27
	1/64	0,14	0,18
	1/128	0,07	0,09

Die Proben wurden mit Null-Kalibrator verdünnt.

WIEDERFINDUNGSTEST

Probe	Zugeg. ANDROSTENDION (ng/ml)	Wiedergef. ANDROSTENDION (ng/ml)	Wiedergefunden (%)
Serum	8,0	7,7	96
	4,0	4,0	100
	2,0	1,9	95
	1,0	1,0	100
	0,5	0,4	80

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

E. Zeitverzögerung zwischen letzter Kalibrator- und Probenzugabe

Es wird im Folgenden gezeigt, dass die Genauigkeit der Tests selbst dann gewährleistet ist, wenn die Probe 24 Minuten nach Zugabe des Kalibrators in die beschichteten Röhrchen zugegeben wird.

ZEITABSTANDT

Serum (ng/ml)	0'	12'	24'
	0,49	0,55	
	1,96	2,13	
	0,45		0,45
	1,69		2,08

XIV. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

- Entsprechen die Ist-Werte nicht den auf den Fläschchen angegebenen Soll-Werten, können diese Werte, ohne treffende Erklärung für die Abweichungen, nicht weiterverarbeitet werden.
- Falls zusätzliche Kontrollen erwünscht sind, kann jedes Labor seinen eigenen Pool herstellen, der in Aliquots eingefroren werden sollte.
- 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.

Population	N	Mittelwert ng/ml	Bereich
KINDER	25	0,4	0,1 – 0,9
MÄNNER	64	2,0	0,5 – 4,8
FRAUEN:	250	2,1	0,5 – 4,7
Follikelsphase	45	1,9	0,9 – 3,0
Ovulationspeak	14	2,9	1,9 – 4,7
Lutealphase	27	2,0	1,1 – 4,2
Polyzystisches Ovariensyndrom	25	3,6	2,2 – 6,5
Postmenopausal	45	1,7	0,3 – 3,7

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

XV. VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

Sicherheit

Nur für *in vitro* diagnostische Zwecke.

Dieser Kit enthält ^{125}I (Halbwertzeit: 60 Tagen) , das ionisierende X (28 keV) und γ (35.5 keV) Strahlungen emittiert.

Dieses radioaktive Produkt kann nur an autorisierte Personen abgegeben und darf nur von diesen angewendet werden; Erwerb, Lagerung, Verwendung und Austausch radioaktiver Produkte sind Gegenstand der Gesetzgebung des Landes des jeweiligen Endverbrauchers. In keinem Fall darf das Produkt an Menschen oder Tieren angewendet werden.

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

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

Die menschlichen Blutkomponenten in diesem Kit wurden mit europäischen und in den 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 darüber 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 Waschschritte den Abfluß gründlich mit viel Wasser, um die Metallazidbildung zu verhindern.

Bitte rauchen, trinken, essen Sie nicht in Ihrem Arbeitsbereich, und ver wenden Sie keine Kosmetika. Pipettieren Sie nicht mit dem Mund. Tragen Sie Schutzkleidung und Wegwerfhandschuhe.

XVII. LITERATUR

1. Dorfman RI, Shipley RA : **Androgens.** John Wiley and Sons, New York, pp. 116-128, 1956.
2. Horton R, Tait J : **Androstenedione production and interconversion rates measured in peripheral blood and studies on the possible site of its conversion to testosterone.** J Endocrinol Invest 45:301-313,1966.
3. Pang S, Riddick L : Hirsutism. IN Lifshitz T (ed) : **Pediatric Endocrinology, A Clinical Guide, second edition.** Marcel Dekker, Incl., New York, pp. 259-291, 1990.
4. Cavallo A, Corn C, Bryan GT, Meyer WJ III : **The use of plasma androstenedione in monitoring therapy of patients with congenital adrenal hyperplasia.** J Pediatr 95:33-37, 1979. Bull NY Acad Med 53, 347, 1977
5. Barett-Connor E, Garland C, McPhililips JB, Kaw K-T, Wingard DL : **A prospective, population based study of androstenedione, estrogens and prostate cancer**. Canc res 50:169-173, 1990.
6. Rittmaster RS, Thompson DL : **Effects of leuprolide and esametehasone o hair growth and hormone levels in hirsute women : the relative importance of the ovary and adrenal in the pathogenesis of hirsutism.** J Clin Endocrinol Metab 70:112-116, 1993.
7. Zwicker H, Rittmaster RS : **Androsterone sulfate : Physiology and signifiance in hirsute women.** J Clin Endocrinol Metab 76:112-116, 1993.

XVIII. ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

	GESAMT-AKTIVITÄT (µl)	KALIBRA-TOREN (µl)	PROBE(N)-KONTROLLEN (µl)
Kalibratoren (0 to 5) Proben, Kontrollen Tracer	- - 250	25 - 250	- 25 250
Inkubation	1 Std bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln.		
Separation Waschlösung Separation	- - -		Absaugen (oder dekantieren) 2,0 ml Absaugen (oder dekantieren)
Auswertung	Messen der Röhrchen 60 Sekunden		

DIAsource Katalognummer: KIP0451	Beipackzettelnummer: 1700460/de	Nummer der Originalausgabe: 110608/1

Revisionsdatum : 2011-06-08

CE

it

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

ANDROSTENEDIONE-RIA-CT

I. USO DEL KIT

Kit radioimmunologico per la determinazione quantitativa in vitro del 4-Androsten-3, 17-Dione (Androstenedione) in siero o plasma.

II. INFORMAZIONI DI CARATTERE GENERALE

A. Nome commerciale: DIAsource ANDROSTENEDIONE-RIA-CT Kit

B. Numero di catalogo: KIP0451: 96 test

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 biologica

Il 4-Androsten-3, 17-dione (Androstenedione) è uno steroide C19. Viene prodotto dalle ghiandole surrenali e dalle gonadi. Il Androstenedione è un precursore immediato del Androstenedione sterone e dell'estrone, che possono ambedue essere convertiti successivamente in estradiolo. A causa della presenza di un gruppo 17-oxo (piuttosto che idrossile), Androstenedione presenta una attività androgena relativamente debole, stimata = 20% del testosterone. Nonostante mostri una debole attività androgena, i livelli serici di Androstenedione possono superare quelli di testosterone in condizioni normali o di malattia, le percentuali di secrezione e produzione di Androstenedione superano quelle di testosterone nelle donne e si verifica una significativa conversione extra-surrenale di Androstenedione in testosterone. Inoltre, l'affinità della SHBG (Sex Hormone-Binding Globulin) per il Androstenedione è molto minore rispetto a quella per il testosterone o per l'estradiolo (1 - 3).
Il ruolo fisiologico di Androstenedione non è ancora ben definito. I livelli serici di Androstenedione sono alti nel siero fetale e neonatale, diminuiscono durante l'infanzia e aumentano durante la pubertà. Nella pubertà normale e negli uomini adulti, la parte maggiore di Androstenedione deriva dai testicoli, direttamente o dalla conversione del testosterone, mentre nelle donne normali adulte, quantità essenzialmente equivalenti di Androstenedione vengono prodotte dalle surrenali e dalle ovaie (2,3). Livelli aumentati di Androstenedione potrebbero giocare un ruolo importante nello sviluppo dei peli sessuali secondari durante l'adrenarca. I livelli serici di Androstenedione mostrano una significativa variazione diurna in dipendenza della secrezione di ACTH. La produzione di Androstenedione ovarico viene stimolata dall'ormone luteinizzante e i livelli serici di Androstenedione variano in base al ciclo mestruale (3). La produzione di Androstenedione surrenale cala gradualmente con l'età avanzata sia negli uomini che nelle donne. Inoltre, la produzione di Androstenedione ovarico cala dopo la menopausa (3).

B. Applicazioni cliniche

La misurazione del Androstenedione fornisce un utile indicatore della biosintesi degli androgeni: Livelli elevati di Androstenedione sono stati dimostrati in corso di iperplasia surrenale congenita virilizzante; inoltre i livelli di Androstenedione possono essere più indicativi rispetto ai livelli di 17-idrossi-progesterone nel monitoraggio del trattamento di questa condizione [es., variazioni diurne meno marcate e minore soppressione dopo breve esposizione a glucocorticoidi (4)]. I livelli serici di Androstenedione sono anche aumentati in corso di sindrome dell'ovaio policistico, ipertecosi stromale ovarica, deficit di 3b-idrossisteroide deidrogenasi e delle altre cause di irsutismo nella donna (3,6 e 7). Per definizione, i livelli di Androstenedione sono normali nell'irsutismo idiopatico. Livelli serici elevati di Androstenedione potrebbero anche riscontrarsi nei tumori surrenalici e ovarici virilizzanti (3). In uno studio prospettico di oltre 1000 uomini, è stata dimostrata una relazione dose-risposta di Androstenedione e rischio di cancro della prostata (5); ulteriori studi saranno necessari per confermare questi riscontri.

IV. PRINCIPIO DEL METODO

Una quantità definita di Androstenedione marcata con ^{125}I compete con il Androstenedione presente in calibratore e campioni per un numero definito di siti di un anticorpo adsorbito sulla superficie interna di provette di polistirene. Dopo 1 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 Androstenedione nei campioni viene calcolata per interpolazione sulla curva calibratore.

V. REATTIVI FORNITI

Reattivi	Kit da 96 test	Codice colore	Volume di ricostituzione
Provette sensibilizzate con anticorpo anti DELTA 4	2 x 48	giallo	Pronte per l'uso
Ag | **^{125}I** Marcato: Androstenedione marcato con ^{125}I (grado HPLC), in tampone contenente caseina bovina e sodio azide (<0,1%)	1 flacone 26 ml 111 kBq	rosso	Pronte per l'uso
CAL | **0** Calibratore zero in siero umano e timolo	1 flacone liofilizzati	giallo	Aggiungere 0,5 ml di acqua distillata
CAL | **N** Calibratore 1-5 di Androstenedione, (le concentrazioni esatte degli calibratore sono riportate sulle etichette dei flaconi), in siero umano e timolo	5 flaconi liofilizzati	giallo	Aggiungere 0,5 ml di acqua distillata
WASH | **SOLN** | **CONC** Tampone di lavaggio (TRIS-HCl)	1 flacone 10 ml	bruno	Diluire 70 x con acqua distillata usando un agitatore magnetico
CONTROL | **N** Controlli: N = 1 o 2, in siero umano e timolo	2 flaconi liofilizzati	argento	Aggiungere 0,5 ml di acqua distillata

Note : Usare lo calibratore zero per diluire i campioni

VI. REATTIVI NON FORNITI

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

1. Acqua distillata.
2. Pipette per dispensare 50 µl e 500 µl (Si raccomanda di utilizzare pipette accurate con puntale in plastica monouso).
3. Agitatore tipo vortex.
4. Agitatore magnetico.
5. Agitatore rotante (400 rpm).
6. Pipetta a ripetizione automatica 5 ml per i lavaggi.
7. Sistema di aspirazione dei campioni (facoltativo).
8. Contatore gamma con finestra per ^{125}I (efficienza minima 70%)

VII. PREPARAZIONE DEI REATTIVI

A. **Calibratori:** Ricostituire i calibratori con 0,5 ml di acqua distillata.
B. **Controlli:** Ricostituire i controlli con 0,5 ml di acqua distillata.
C. **Soluzione di lavoro del tampone di lavaggio:** Preparare la quantità necessaria di soluzione di lavoro del tampone di lavaggio aggiungendo 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-scongelamento 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 e plasma a 2-8°C.
- Se non si desidera eseguire il dosaggio entro 24 ore dal prelievo, si raccomanda di conservare i campioni a –20°C.
- Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelamento dei campioni.
- Il siero e il plasma forniscono gli stessi valori.

  Y (Hep. plasma) = 0,94 x (siero) + 0,02 r = 0,98 n = 17
  Y (EDTA plasma) = 1,01 x (siero) – 0,03 r = 0,95 n = 17

X. METODO DEL DOSAGGIO

A. **Avvertenze generali**

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

B. Metodo del dosaggio

1. Numerare le provette sensibilizzate necessarie per dosare in duplicato ogni calibratore, campione o controllo. Numerare 2 provette non sensibilizzate per la determinazione dell'attività totale.
2. Agitare brevemente su vortex calibratore, campioni e controlli. Dispensare 25 µl di calibratore, campioni e controlli nelle rispettive provette.
3. Dispensare 250 µl di Androstenedione marcato con ^{125}I in tutte le provette, comprese quelle per l'attività totale.
4. Scuotere gentilmente il portaprovette per liberare eventuali bolle d'aria intrappolate nel liquido contenuto nelle provette.
5. Incubare 1 ore a temperatura ambiente in agitazione.
6. Aspirare il liquido contenuto in tutte le provette, tranne in quelle per l'attività totale, facendo attenzione che il puntale dell'aspiratore raggiunga il fondo delle provette e che aspiri tutto il liquido.
7. 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.
8. Lasciare decantare le provette in posizione verticale per due minuti circa e aspirare eventuali gocce di liquido residue.
9. Contare tutte le provette per 1 minuto con il contatore gamma.

XI. CALCOLO DEI RISULTATI

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

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

3. Usando carta semilogaritmica a 3 cicli o logit-log e ponendo in ordinata i rapporti di competizione. B/B0 (%) per ogni calibratore e in ascissa le rispettive concentrazioni di Androstenedione, tracciare la curva di taratura, scartare i valori palesemente discordanti.
4. È possibile utilizzare un sistema di interpolazione dati automatizzato. Con un sistema automatico di interpolazione dati, utilizzare la curva a 4 parametri.
5. Per interpolazione sulla curva di taratura dei rapporti di competizione di campioni e controlli, determinare le rispettive concentrazioni di Androstenedione.
6. Per ogni dosaggio determinare la capacità legante B0/T.

XII. CARATTERISTICHE TIPICHE

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

Androstenedione-RIA-CT		cpm	B/Bo (%)
Attività totale		48670	
Calibratore	0,0 ng/ml	14867	100,0
	0,1 ng/ml	13196	88,8
	0,4 ng/ml	9450	63,6
	1,0 ng/ml	5910	39,8
	4,0 ng/ml	2746	18,5
	11,0 ng/ml	987	6,6

XIII. CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO

A. Sensibilità

La sensibilità, calcolata come concentrazione apparente di un campione con cpm pari alla media meno 2 deviazioni calibratore di 20 replicati dello calibratore zero, è risultata essere 0,03 ng/ml.

B. Specificità

Le percentuali di cross-reattività stimata rispetto alla concentrazione in grado di produrre un'inibizione al 50% sono rispettivamente:

Composto	Cross-Reattività (%)
Androsterone	0,0566
Cortisolo	0,0148
Corticosterone	0,0047
Cortisone	0,0099
DHEA	0,0155
DHEA-SO_4	0,0009
21-Deossicortisone	0,0006
Estradiolo-17β	ND
Estriolo	ND
Estrone	0,0270
Etiocolanolone	0,0422
17α-idrossipregnenolone	ND
17α-idrossiprogesterone	0,0840
Isoandrosterone	0,0112
Pregnenolone	ND
Progesterone	0,0168
Spironolattone	0,0006
5α-Diidrotestosterone	0,0105
Testosterone	0,2406

Nota : Questa tabella mostra la cross-reattività relativa all'anti Androstenedione
ND : non dosabile

C. Precisione

INTRA SAGGIO

Siero	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	10	0,36 ± 0,02	4,5
B	10	6,04 ± 0,19	3,2

INTER SAGGIO

Siero	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	10	0,42 ± 0,04	9,0
B	10	1,90 ± 0,11	5,9

SD : Deviazione Standard; CV: Coefficiente di Variazione

D. Accuratezza

TEST DI DILUIZIONE

Campione	Diluizione	Concentrazione teorica (ng/ml)	Concentrazione misurata (ng/ml)
Serum 1			
	1/1	-	4,64
	1/2	2,32	2,01
	1/4	1,16	0,97
	1/8	0,58	0,55
	1/16	0,29	0,30
	1/32	0,14	0,20
Serum 2			
	1/1	-	8,94
	1/2	4,47	3,89
	1/4	2,24	2,05
	1/8	1,12	0,98
	1/16	0,56	0,49
	1/32	0,28	0,27
	1/64	0,14	0,18
	1/128	0,07	0,09

I campioni sono stati diluiti con calibratore zero.

TEST DI RECUPERO

Campione	Androstenedione aggiunto (ng/ml)	Androstenedione recuperato (ng/ml)	Recupero (%)
Serum	8,0	7,7	96
	4,0	4,0	100
	2,0	1,9	95
	1,0	1,0	100
	0,5	0,4	80

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

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

Come mostrato nella seguente tabella, il dosaggio si mantiene accurato anche quando un campione viene aggiunto nelle provette sensibilizzate 24 minuti dopo l'aggiunta del calibratore.

TEMPO TRASCORSO

Serum (ng/ml)	0'	12'	24'
	0,49	0,55	
	1,96	2,13	
	0,45		0,45
	1,69		2,08

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.

Popolazione	N	Media ng/ml	Intervallo
BAMBINI	25	0,4	0,1 – 0,9
MASCHI	64	2,0	0,5 – 4,8
FEMMINE:	250	2,1	0,5 – 4,7
Fase follicolare	45	1,9	0,9 – 3,0
Picco ovulatorio	14	2,9	1,9 – 4,7
Fase luteale	27	2,0	1,1 – 4,2
Sindrome ovarica policistica	25	3,6	2,2 – 6,5
Postmenopausa	45	1,7	0,3 – 3,7

(*) 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

1. **Dorfman RI, Shipley RA :** Androgens. **John Wiley and Sons, New York, pp. 116-128, 1956.**
2. **Horton R, Tait J :** Androstenedione production and interconversion rates measured in peripheral blood and studies on the possible site of its conversion to testosterone. **J Endocrinol Invest 45:301-313,1966.**
3. **Pang S, Riddick L : Hirsutism. IN Lifshitz T (ed) :** Pediatric Endocrinology, A Clinical Guide, second edition. **Marcel Dekker, Incl., New York, pp. 259-291, 1990.**
4. **Cavallo A, Corn C, Bryan GT, Meyer WJ III :** The use of plasma androstenedione in monitoring therapy of patients with congenital adrenal hyperplasia. **J Pediatr 95:33-37, 1979. Bull NY Acad Med 53, 347, 1977**
5. **Barett-Connor E, Garland C, McPhililips JB, Kaw K-T, Wingard DL :** A prospective, population based study of androstenedione, estrogens and prostate cancer**. Canc res 50:169-173, 1990.**
6. **Rittmaster RS, Thompson DL :** Effects of leuprolide and esametehasone o hair growth and hormone levels in hirsute women : the relative importance of the ovary and adrenal in the pathogenesis of hirsutism. **J Clin Endocrinol Metab 70:112-116, 1993.**
7. **Zwicker H, Rittmaster RS :** Androsterone sulfate : Physiology and signifiance in hirsute women. **J Clin Endocrinol Metab 76:112-116, 1993.**

XVIII. SCHEMA DEL DOSAGGIO

	Attività totale ml	Calibratore ml	Campioni Controlli ml
Calibratore (0 - 5)	-	25	-
Campioni, controlli	-	-	25
Marcato	250	250	250
Incubazione	1 ore a temperatura ambiente in agitazione.		
Separazione		Aspirare	
Soluzione di lavoro del tampone di lavaggio		2 ml	
Separazione		Aspirare	
Conteggio	Contare le provette per 1 minuto		

Numero di catalogo di DIAsource : KIP0451	P.I. numero : 1700460/it	Revisione numero : 110608/1

Data di revisione : 2011-06-08

CE

es

Leer el protocolo completo antes de usar.

ANDROSTENEDIONE-RIA-CT

I. INSTRUCCIONES DE USO

Radioinmunoensayo para la determinación cuantitativa in vitro de 4-Androsten-3,17-Dione (Androstenedione) humana en suero y plasma.

II. INFORMACIÓN GENERAL

A. Nombre: DIAsource ANDROSTENEDIONE-RIA-CT Kit

B. Número de Catálogo: KIP0451 : 96 tests

C. Fabricado por: DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgium.

Para cuestiones técnicas y información sobre pedidos contactar :
Tel : +32 (0)67 88.99.99 Fax : +32 (0)67 88.99.96

III. INFORMACIÓN CLÍNICA

A. Actividad biológica

El 4-Androsten-3, 17-dione (Androstenedione) es un esteroide con 19 C. Se produce en la glándula suprarrenal y en las gónadas. El Androstenedione es un precursor directo de la testosterona y de la estrona, que pueden ser convertidas en estradiol. Debido a la presencia de un grupo 17-oxo (más bien que hidroxilo), el Androstenedione tiene una actividad andrógena relativamente débil, estimada a ≤ 20% de la testosterona. Aunque es un andrógeno débil, los niveles de Androstenedione en suero pueden superar la testosterona tanto en condiciones clínicas como en situaciones normales, la secreción y la producción de Androstenedione superan las de la testosterona en mujeres, y aparece una conversión extra-suprarrenal importante de Androstenedione en testosterona. Además, la afinidad de la globulina ligadora de hormonas sexuales para el Androstenedione es muy inferior a la afinidad para la testosterona o para el estradiol (1 – 3).

El papel fisiológico de Androstenedione no es bastante definido. Los niveles de Androstenedione en suero son elevados en suero fetal y neonatal, disminuen durante la niñez y aumentan durante la pubertad. En hombres adultos y púberos normales, la porción principal de Androstenedione es derivada del testículo, sea directamente sea de la conversión de la testosterona, mientras que en mujeres adultas normales se producen cantidades esencialmente equivalentes de Androstenedione por la glándula suprarrenal y los ovarios (2,3). Niveles elevados de Androstenedione pueden desempeñar un papel en el desarrollo de cabello sexual secundario durante la adrenarquia. Los niveles de Androstenedione en suero tienen una variación diurna importante dependiente de la secreción de ACTH. La producción de Androstenedione en los ovarios es estimulada por la hormona luteinizante, y los niveles de Androstenedione en suero varian con el ciclo menstrual (3). La producción suprarrenal de Androstenedione disminue progresivamente con la edad tanto en hombres como en mujeres. Además, la producción de Androstenedione en los ovarios disminue después de la menopausia (3).

B. Aplicaciones clínicas

La medición de Androstenedione ofrece un marcador útil de la biosíntesis andrógena: niveles elevados de Androstenedione aparecen en caso de hiperplasia suprarrenal congénita virilizante; además, los niveles de Androstenedione pueden tener ventajas en comparación con los niveles de 17-hidroxi-progesterona en la observación de esta enfermedad, p.e. una variación diurna menos importante y una suppresión limitada después de una breve exposición glucocorticoide (4). Los niveles de Androstenedione en suero son elevados también en el síndrome de ovario policístico, la hipertecosis estromal del ovario, la deficiencia de 3b-hidroxisteroide dehidrogenasa, y otras causas de hirsutismo en mujeres (3,6 & 7). Por definición, los niveles de Androstenedione son normales en caso de hirsutismo idiopático. Niveles de Androstenedione en suero pueden aparecer también en caso de tumores virilizantes suprarrenales y ováricos (3). En un estudio prospectivo de más de 1000 hombres, una relación dosis-respuesta entre el androstenedione y el riesgo de cáncer prostático ha sido probada (5); necesitamos estudios suplementarios para confirmar estos resultados.

IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

Una cantidad fija de Androstenedione marcada con I^{125} compite con el Androstenedione a medir, presente en la muestra ó en el calibrador, por los puntos de unión del anticuerpo inmovilizado en las paredes de un tubo de poliestireno. Después de 1 hora 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 Androstenedione de las muestras se determinan por interpolación de la dosis en la curva de calibración.

V. REACTIVOS SUMINISTRADOS

Reactivos	Kit 96 test	Código de Color	Reconstitución
Tubos recubiertos con anti DELTA 4	2 x 48	amarillo	**Listo** para uso
Ag | **^{125}I** TRAZADOR:Androstenedione marcado con I^{125} (grado HPLC) en tampón con caseina bovina y azida (<0,1%)	1 vial 26 ml 111 kBq	rojo	**Listo** para uso
CAL | **0** Calibrador cero en suero humano con thymol	1 vial liofilizados	amarillo	**Añadir** 0,5 ml de agua destilada
CAL | **N** Calibradores Androstenedione - N = 1 al 5 (mirar los valores exactos en las etiquetas) en suero humano con thymol	5 viales liofilizados	amarillo	**Añadir** 0,5 ml de agua destilada
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 suero humano con thymol	2 viales liofilizados	plateado	**Añadir** 0,5 ml de agua destilada

Nota: Para diluciones de muestras utilizar calibrador cero.

VI. MATERIAL NO SUMINISTRADO

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

1. Agua destilada
2. Pipetas de 50µl y 500 µl (Se recomienda el uso de pipetas precisas con puntas desechables de plástico)
3. Vortex
4. Agitador magnético
5. Agitador de tubos (400 rpm)
6. Jeringa automática 5 ml (tipo Cornwall) para el lavado
7. Sistema de aspiración (opcional)
8. Contador de radiaciones gamma para medir I^{125} (mínima eficiencia 70%)

VII. PREPARACIÓN REACTIVOS

A. **Calibradores**: Reconstituir los calibradores con 0,5 ml de agua destilada.
B. **Controles**: Reconstituir los controles con 0,5 ml de agua destilada.
C. **Solución de lavado de trabajo**: Preparar el volumen necesario de Solución de lavado de trabajo mezclando 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 ó reconstituir todos los componentes de los kits son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, si se guardan a 2-8ºC.
- Después de su reconstitución los calibradores y controles son estables durante una semana a 2-8ºC. Para periodos más largos, alicuotar y guardar a –20ºC. 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 2-8ºC.
- Las alteraciones de los reactivos en el aspecto físico pueden indicar inestabilidad ó deterioro.

IX. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

- Las muestras de suero y plasma deben ser guardadas a 2-8ºC.
- Si el ensayo no se realiza en 24 hrs., almacenar las muestras a –20º.
- Evitar congelar y descongelar sucesivamente.
- Suero o plasma presentan resultados similares.
  Y (Hep. plasma) = 0,94 x (serum) + 0,02 r = 0,98 n = 17
  Y (EDTA plasma) = 1,01 x (serum) – 0,03 r = 0,95 n = 17

X. PROTOCOLO

A. Notas de manejo

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

B. Protocolo

1. Marcar los tubos recubiertos por duplicado para cada unos de los estándares, muestras y controles. Para la determinación de las Cuentas Totales, marcar 2 tubos normales.
2. Agitar brevemente los calibradores, muestras y controles y dispensar 25 µl de cada uno en sus respectivos tubos.
3. Dispensar 250 µl de Androstenedione marcadó con I^{125} en cada tubo, incluyendo los tubos no recubiertos a las Cuentas Totales.
4. Agitar suavemente la gradilla de tubos para soltar cualquier barbuja cautiva de las paredes de los tubos.
5. Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación constante.
5. Aspirar el contenido de cada tubo (excepto los de Cuentas Totales). Asegurarse que la punta de la pipeta de aspiración toca el fondo del tubo con el fin de aspirar todo el líquido.
6. 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
7. Dejar los tubos en posición inversa durante 2 minutos y aspirar el liquido restante.
8. 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. Calcular la radiactividad enlazada como un porcentaje de la unión con respecto al calibrador cero (0) de acuerdo con la siguiente formula:

$$B/B0\,(\%) = \frac{\text{Cuentas (Calibrador ó muestra)}}{\text{Cuentas (Calibrador Cero)}} \text{x}100$$

3. Utilizando papel 3 ciclo semilogarítmico ó logit-log, representar los valores de (B/B0%) de cada calibrador frente a las contraciones del Androstenedione de cada calibrador, rechazando los extremos claros.

4. Métodos computarizados de computación de resultados pueden ser utilizados para la construcción de la curva de calibración. Si se utiliza un sistema automático de calculo de resultados, se recomienda usar la representación gráfica " 4 parámetros".
5. Por interpolación de los valores (B/B%) de las muestras, se determinan los valores de las concentraciones de las mismas desde la curva de calibración.
6. El porcentaje total de enlace del trazador en ausencia de Androstenedione no marcado (B0/T) debe ser calculado en cada ensayo.

XII. EJEMPLO DE RESULTADOS

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

Androstenedione-RIA-CT		cpm	B/Bo (%)
Cuentas Totales		48670	
Calibrador	0,0 ng/ml	14867	100,0
	0,1 ng/ml	13196	88,8
	0,4 ng/ml	9450	63,6
	1,0 ng/ml	5910	39,8
	4,0 ng/ml	2746	18,5
	11,0 ng/ml	987	6,6

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 0,03 ng/ml.

B. Especificidad

El porcentaje de reacción cruzada estimada por la comparación de la concentración (indicando una inhibición de 50 %) es respectivamente :

Componente	Reacción-cruzada (%)
Androsterona	0,0566
Cortisol	0,0148
Corticosterona	0,0047
Cortisona	0,0099
DHEA	0,0155
DHEA-SO_4	0,0009
21-Deoxicortisona	0,0006
Estradiol-17β	ND
Estriol	ND
Estrona	0,0270
Etiocholanolona	0,0422
17α-hidroxipregnenolona	ND
17α-Hidroxiprogesterona	0,0840
Isoandrosterona	0,0112
Pregnenolona	ND
Progesterona	0,0168
Spironolactona	0,0006
5α-Dihidrotestosterona	0,0105
Testosterona	0,2406

Nota: Esta tabla presenta la reacción cruzada para el anti Androstenedione
ND : no es detectable

C. Precision

PRECISION INTRA-ENSAYO

Suero	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	10	0,36 ± 0,02	4,5
B	10	6,04 ± 0,19	3,2

PRECISION INTER-ENSAYO

Suero	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	10	0,42 ± 0,04	9,0
B	10	1,90 ± 0,11	5,9

SD : Desviación Estándar; CV: Coeficiente de Variación

D. Exactitud

TEST DILUCIÓN

Muestra	Dilución	Concent. Teórica (ng/ml)	Concent. Medida (ng/ml)
Serum 1			
	1/1	-	4,64
	1/2	2,32	2,01
	1/4	1,16	0,97
	1/8	0,58	0,55
	1/16	0,29	0,30
	1/32	0,14	0,20
Serum 2			
	1/1	-	8,94
	1/2	4,47	3,89
	1/4	2,24	2,05
	1/8	1,12	0,98
	1/16	0,56	0,49
	1/32	0,28	0,27
	1/64	0,14	0,18
	1/128	0,07	0,09

Las muestras fueron diluidas con el Calibrador cero.

TEST DE RECUPERACIÓN

Muestra	Androstenedione añadido (ng/ml)	Androstenedione Recuperado (ng/ml)	Recuperado (%)
Serum	8,0	7,7	96
	4,0	4,0	100
	2,0	1,9	95
	1,0	1,0	100
	0,5	0,4	80

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

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

Como se muestra a continuación la precisión del ensayo se mantiene incluso en el caso de dispensar la muestra 24 minutos después de haberse adicionado el calibrador a los tubos cubiertos.

TIEMPO DE ESPERA

Serum (ng/ml)	0'	12'	24'
	0,49	0,55	
	1,96	2,13	
	0,45		0,45
	1,69		2,08

XIV. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

- Si los resultados obtenidos para el Control 1 y/ó 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 in duplo de las muestras se apoyan en las prácticas de laboratorio corrientes.

XV. *INTERVALOS DE REFERENCIA*

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

sujetos	N	Media ng/ml	Alcance
NIÑOS	25	0,4	0,1 – 0,9
HOMBRES	64	2,0	0,5 – 4,8
MUJERES:	250	2,1	0,5 – 4,7
Fase folicular	45	1,9	0,9 – 3,0
Pico ovulatorio	14	2,9	1,9 – 4,7
Fase luteal	27	2,0	1,1 – 4,2
Síndrome de ovario policístico	25	3,6	2,2 – 6,5
Postmenopáusicas	45	1,7	0,3 – 3,7

(*) Alcance basados en percentilos de 2.5% & 97.5%

XVI. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Seguridad

Para uso solo en diagnóstico in vitro.

Este kit contiene I^{125} (vida media : 60 días) emisor de rayos X (28 keV) y de rayos γ (35.5 keV) ionizantes.

Este producto radiactivo solo puede ser manejado y utilizado por personas autorizadas; la compra, almacenaje, uso y cambio de productos radiactivos están sujetos a la legislación del país del usuario. En ningún caso el producto deberá ser suministrado a humanos y animales.

Todo el manejo de producto radiactivo se hará en una área señalizada, diferente de la de paso regular. Deberá de utilizarse un libro de registros de productos radiactivos utilizados. El material de laboratorio, vidrio que podría estar contaminado radiactivamente deberá de descontaminarse para evitar la contaminación con otros isótopos.

Cualquier derramamiento radiactivo deberá ser limpiado de inmediato de acuerdo con los procedimientos de seguridad. Los desperdicios radiactivos deberán ser almacenados de acuerdo con las regulaciones y normativas vigentes de la legislación a la cual pertenezca el laboratorio. El ajustarse a las normas básicas de seguridad radiológica facilita una protección adecuada.

Los componentes de sangre humana utilizados en este kit han sido testados por métodos aprobados por la CEE y/ó la FDA dando negativo a HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 y 2. No se conoce ningún método que asegure que los derivados de la sangre humana no transmitan hepatitis, SIDA ó otras infecciones. Por lo tanto el manejo de los reactivos y muestras se hará de acuerdo con los procedimientos de seguridad locales.

Todos los productos animales y derivados han sido obtenidos a partir de animales sanos. Componentes bovinos originales de países donde BSE no ha sido informado. Sin embargo, los componentes conteniendo substancias animales deberán ser consideradas como potencialmente infecciosas.

Evitar cualquier contacto de los reactivos con la piel (azida sódica como conservante). La azida en este kit puede reaccionar con el plomo y cobre de las cañerías y producir azidas metálicas altamente explosivas. Durante el proceso de lavado, hacer circular mucha cantidad de agua por el sumidero para evitar el almacenamiento de la azida.

No fumar, beber, comer ó utilizar cosméticos en el área de trabajo. No pipetear con la boca. Utilizar ropa de protección y guantes.

XVII. BIBLIOGRAFIA

1. Dorfman RI, Shipley RA : **Androgens.** John Wiley and Sons, New York, pp. 116-128, 1956.
2. Horton R, Tait J : **Androstenedione production and interconversion rates measured in peripheral blood and studies on the possible site of its conversion to testosterone.** J Endocrinol Invest 45:301-313,1966.
3. Pang S, Riddick L : Hirsutism. IN Lifshitz T (ed) : **Pediatric Endocrinology, A Clinical Guide, second edition.** Marcel Dekker, Incl., New York, pp. 259-291, 1990.
4. Cavallo A, Corn C, Bryan GT, Meyer WJ III : **The use of plasma androstenedione in monitoring therapy of patients with congenital adrenal hyperplasia.** J Pediatr 95:33-37, 1979. Bull NY Acad Med 53, 347, 1977
5. Barett-Connor E, Garland C, McPhililips JB, Kaw K-T, Wingard DL : **A prospective, population based study of androstenedione, estrogens and prostate cancer**. Canc res 50:169-173, 1990.
6. Rittmaster RS, Thompson DL : **Effects of leuprolide and esametehasone o hair growth and hormone levels in hirsute women : the relative importance of the ovary and adrenal in the pathogenesis of hirsutism.** J Clin Endocrinol Metab 70:112-116, 1993.
7. Zwicker H, Rittmaster RS : **Androsterone sulfate : Physiology and signifiance in hirsute women.** J Clin Endocrinol Metab 76:112-116, 1993.

XVIII. RESUMEN DEL PROTOCOLO

	CUENTAS TOTALES (µl)	CALIBRADORES (µl)	MUESTRA(S) CONTROL(S) (µl)
Calibradores (0 al 5)	-	25	-
Muestras, controles	-	-	25
Trazador	250	250	250
Incubación	1 hora a temperatura ambiente en agitación constante.		
Separación	-	aspirar	
Solución de lavado de trabajo	-	2,0 ml	
Separación	-	aspirar	
Contaje	Contar los tubos durante 60 segundos		

DIAsource Catalogo Nr : KIP0451	P.I. Numero : 1700460/es	Revisión nr : 110608/1

Fecha de la revisión : 2011-06-08

CE

pt

Leia todo o protocolo antes de utilizar.

ANDROSTENEDIONE-RIA-CT

I. UTILIZAÇÃO PREVISTA

Radioimunoensaio para adeterminação quantitativa *in vitro* do 4-Androstene-3, 17-Dione (Androstenediona) humano no soro e no plasma.

II. INFORMAÇÕES GERAIS

A. Nome do proprietário : DIAsource-Kit ANDROSTENEDIONE-RIA-CT

B. Número do catálogo : KIP0451 : 96 testes

C. Produzido por : DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Bélgica.

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

III. SIGNIFICADO CLÍNICO

A Atividade Biológica

Androstenediona (4-androstene-3,17-dione) é um C19 esteróide. É produzido pelas glândulas adrenais e gônadas. Androstenediona é um precursor imediato de estrógeno e testosterona, os quais podem ser subsequentemente convertidos em estradiol. Devido a presença do grupo 17-oxo (mais do que hidroxil) , Androstenediona tem relativamente fraca atividade androgênica, estimada em $\leq$ 20% de testosterona. Embora seja um fraco andrógeno, níveis de Androstenediona no soro podem exceder a testosterona em estados normais e de doenças, a secreção e produção de Androstenediona excedem a testosterona em mulheres, e uma significante conversão extra-adrenal de Androstenediona para testosterona ocorre. Além disso, a afinidade de globulinas ligadas a hormônios sexuais pela Androstenediona é muito menor que para testosterona ou estradiol. (1 – 3).

O papel fisiológico da Androstenediona não é muito bem definido. Níveis sorológicos de Androstenediona são altos no soro fetal e de neonatos, decrescendo durante a infância e aumentando durante a puberdade. Em homens adolescentes e adultos, a maior porção de Androstenediona é derivada dos testículos, ou diretamente da conversão de testosterona, enquanto em mulheres adultas normais, quantidades essencialmente equivalentes de Androstenediona são produzidas pela glândula adrenal e ovário (2,3). Aumento nos níveis de Androstenediona pode ter papel no desenvolvimento de pelos pubianos secundários durante a adrenarca. Níveis sorológicos de Androstenediona mostram variações diurnas significativas dependente de ACTH. A produção de Androstenediona ovariana é estimulada pelo hormônio luteinizante, e os níveis sorológicos variam com o ciclo menstrual (3). A produção adrenal de Androstenediona declina gradualmente com avanço da idade em homens e mulheres. Em adição, a produção ovariana de Androstenediona decresce após a menopausa. (3).

B. *Aplicações Clínicas*

Dosagem de Androstenediona fornece um proveitoso marcador de biosíntese de andrógeno: Níveis elevados de Androstenediona tem sido demonstrados em hiperplasia adrenal congênita virilizante.; em adição níveis de Androstenediona podem ter vantagens sobre níveis de 17-hydroxy-progesterona no monitoramento do tratamento nestas condições, e.x. Menor marcação na variação diurna e menor supressão após breve exposição à glicocorticoides. (4). Níveis de Androstenediona estão também aumentados na síndrome do ovário policístico, hipertecosi estromal ovariana, deficiência dehidrogenase 3 b-hidroxiesteroide, e outras causas de hirsutismo em mulheres (3,6 & 7). Por definição, níveis Androstenediona são normais em hirsutismo idiopático. Níveis elevados no soro de Androstenediona podem ocorrer também em tumores ovarianos virilizantes (3). Em um estudo prospectivo com 1000 homens, relação entre a dose-resposta de androstenediona e o risco de câncer de próstata foi demonstrado (5); estudos adicionais serão necessários para confirmar estes achados.

IV. *PRINCÍPIO DO MÉTODO*

Uma quantidade fixa de Androstenediona marcado com ^{125}I compete com o Androstenediona a ser medido, que esteja presente na amostra ou no calibrador, para uma quantidade fixa de locais de anticorpo, que é imobilizado nas paredes dos tubos de poliestireno. Após 1 hora de incubação a temperatura ambiente no shaker, a reacção de competição termina com a operação de aspiração. A seguir os tubos são lavados com 2ml de solução de lavagem de trabalho e novamente aspirados. Traça-se uma curva de calibração e as concentrações de Androstenediona nas amostras são determinadas por interpolação da dose a partir da curva de calibração.

V. REAGENTES FORNECIDOS

Reagentes	Kit 96 Testes	Código de cor	Reconstituição
Tubos revestidos com anti Androstenedione	2 x 48	amarelo	**Pronto para utilizar**
Ag | **^{125}I** Marcador: Androstenediona marcado com ^{125}I (grau HPLC) em tampão com caseina bovina e azida (<0.1%)	1 recipiente 26 ml 111 kBq	roxo	**Pronto para utilizar**
CAL | **0** Calibrador Zero em soro human e timol	1 recipiente liofilizado	amarelo	**Adicione** 0,5 ml de água destilada
CAL | **N** Calibradores Androstenediona - N = 1 para 5 (ver os valores exactos nos rótulos do recipiente) em soro human e timol	5 recipientes liofilizados	amarelo	**Adicione** 0,5 ml de água destilada
WASH | **SOLN** | **CONC** Solução de lavagem (TRIS-HCl)	1 recipiente 10 ml	castanho	**Dilua** 70 x com água destilada (use um agitador magnético).
CONTROL | **N** Controlos - N = 1 ou 2 Em soro humano e timol	2 recipientes liofilizados	prateado	**Adicione** 0,5 ml de água destilada

Note : Use o calibrador zero para diluições de amostras.

VI. MATERIAL NÃO FORNECIDO

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

1. Água destilada
2. Pipetas automáticas: 25 µl, 250 µl, 500 µl e 2 ml (recomenda-se a utilização de pipetas precisas, com pontas descartáveis)
3. Misturador de vortex
4. Agitador magnético
5. Shaker em tubo (400 rpm)
6. Pipeta automática de 5 ml para lavagem (tipo Cornwall)
7. Sistema de aspiração (opcional)
8. Qualquer contador gamma capaz de medir ^{125}I pode ser utilizado (min alcance de 70%).

VII. PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

A. **Calibradores:** Reconstitua os calibradores com 0.5 ml de água destilada.
B. **Controlos** : Reconstitua os controlos com 0,5 ml de água destilada.
C. **Solução de lavagem de trabalho** : Prepare um volume adequado de Solução de lavagem de trabalho ao adicionar 69 volumes de água destilada para 1 volume de solução de lavagem (70x). Use um agitador magnético para homogeneizar. Rejeite a solução não utilizada no final do dia.

VIII. ARMAZENAMENTO E PRAZO DE VALIDADE DOS REAGENTES

- Antes de abrir e reconstituir, todos os componentes do kit são estáveis até ao final do prazo de validade, indicado no rótulo desde que mantido entre 2 to 8°C.
- Após reconstituição, os controlos e calibradores são estáveis durante 1 semana entre 2 a 8°C. Durante períodos de armazenamento mais longos, devem ser feitas alíquotas e mantidas a –20°C por máximo 3 meses
- A solução de lavagem de trabalho deve ser feita e utilizada no mesmo dia.
- Depois da 1ª utilização o marcador é estável até final do prazo de validade, desde que mantido no recipiente original, bem fechado entre 2 to 8°C.
- Alterações no aspecto dos reagentes do kit podem indicar instabilidade ou degradação.

IX. RECOLHA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

- Amostras de soro ou plasma devem ser mantidas entre 2-8°C.
- Se a análise não for realizada em 24 hrs, recomenda se conservar em alicotas a -20°C.
- Evite ciclos de congelamento e descongelamento sucessivos.
- Soro e plasma fornecem resultados similares:
  Y (Hep. plasma) = 0.94 x (soro) + 0.02 r = 0.98 n = 17
  Y (plasma com EDTA) = 1.01 x (soro) – 0.03 r = 0.95 n = 17

X. PROCEDIMENTO

A. Notas de manipulação

Não utilize o kit ou qualquer componente depois da expiração do prazo de validade. Não misture componentes de diferentes lotesAntes de utilizar todos os componentes devem estar à temperatura ambiente (TA).
Misture bem os reagentes e as amostras, por agitação ou rotação suaves. Para evitar contaminações cruzadas utilize uma ponta de pipeta limpa e descartável, para adição de cada componente.
Pipetas de alta precisão ou equipamento automático de pipetagem melhoram a precisão. Respeite os períodos de incubação.
Prepare uma curva de calibração para cada análise, não utilize dados de análises prévias.

B. Procedimento

1. Rotule os tubos revestidos em duplicado, para cada calibrador, amostra, controlo. Para a determinação das contagens totais, rotule 2 tubos normais.
2. Agite ligeiramente no vortex calibradores, amostras e controlos e dispense 25µl de cada, para os tubos respectivos.
3. Dispense 250 µl de Androstenediona marcado com I^{125} para cada tubo, incluindo os tubos normais para as contagens totais.
4. Agite suavemente o suporte dos tubos, para libertar possíveis bolhas de ar.
5. Incube por 1 hora a temperatura ambiente com agitação contínua.
6. Aspire o conteúdo de cada tubo (excepto os das contagens totais). Assegure-se que a ponta plástica do aspirador atinge o fundo do tubo revestido, para remover todo o líquido.
7. Lave os tubos com 2 ml de solução de lavagem de trabalho (excepto os das contagens totais) e aspire. Evite formação de espuma quando adiciona a solução de lavagem.
8. Depois da lavagem, deixe os tubos direitos durante 2 minutos e seguidamente aspire a última porção de líquido.
9. Conte os tubos num contador gamma durante 60 segundos.

XI. CÁLCULO DOS RESULTADOS

1. Calcule a média das determinações em duplicata.
2. Calcule a radioactividade de ligação como uma percentagem da ligação determinada no ponto do calibrador zero (0), de acordo com a fórmula seguinte:

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

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

XII. DADOS TÍPICOS

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

ANDROSTENEDIONE-RIA-CT		cpm	B/Bo (%)
Contagens total		48670	
Calibrador	0,0 ng/ml	14867	100,0
	0,1 ng/ml	13196	88,8
	0,4 ng/ml	9450	63,6
	1,0 ng/ml	5910	39,8
	4,0 ng/ml	2746	18,5
	11,0 ng/ml	987	6,6

XIII. DESEMPENHO E LIMITES

A. Limite de detecção

Foram analisados 20 calibradores zero , juntamente com um conjunto de outros calibradores.
O limite de detecção, definido como a concentração aparente, 2 DP abaixo das contagens médias com zero ligações, foi de 0,03 ng/ml.

B. Especificidade

A especificidade do anticorpo policlonal usado neste ensaio foi avaliada por RIA e expresso como a proporção entre a quantidade de Androstenediona, que produz 50% de inibição de Androstenediona ligada e marcada, e a quantidade de componentes de reagentes cruzados (análogos), dando a mesma inibição.

Composto	Reactividade-cruzada (%)
Androsterona	0,0566
Cortisol	0,0148
Corticosterona	0,0047
Cortisona	0,0099
DHEA	0,0155
DHEA-SO_4	0,0009
21-Deoxicortisona	0,0006
Estradiol-17β	ND
Estriol	ND
Estrona	0,0270
Etiocholanolone	0,0422
17α-hidroxipregnenolona	ND
17α-Hidroxiprogesterona	0,0840
Isoandrosterona	0,0112
Pregnenolona	ND
Progesterona	0,0168
Spironolactona	0,0006
5α-Dihidrotestosterona	0,0105
Testosterona	0,2406

Nota : Esta tabela mostra a reação cruzada para o anti Androstenediona.
ND : não detectável

C. Precisão

PRECISÃO INTRA-ENSAIO

Soro	N	<X> ± DP (ng/ml)	CV (%)
A	10	0,36 ± 0,02	4,5
B	10	6,04 ± 0,19	3,2

PRECISÃO INTER-ENSAIO

Soro	N	<X> ± DP (ng/ml)	CV (%)
A	10	0,42 ± 0,04	9,0
B	10	1,90 ± 0,11	5,9

DP: Desvio Padrão; CV: Coeficiente de variação

D. Exactidão

TESTE DE DILUIÇÃO

Amostra	Diluição	Conc. teórico. (ng/ml)	Conc. medida (ng/ml)
Soro 1			
	1/1	-	4,64
	1/2	2,32	2,01
	1/4	1,16	0,97
	1/8	0,58	0,55
	1/16	0,29	0,30
	1/32	0,14	0,20
Soro 2			
	1/1	-	8,94
	1/2	4,47	3,89
	1/4	2,24	2,05
	1/8	1,12	0,98
	1/16	0,56	0,49
	1/32	0,28	0,27
	1/64	0,14	0,18
	1/128	0,07	0,09

As amostras foram diluídas com calibrador zero.

TESTE DE RECUPERAÇÃO

Amostra	Androstenediona adicionado (ng/ml)	Androstenediona recuperado (ng/ml)	Recuperação (%)
Soro	8,0	7,7	96
	4,0	4,0	100
	2,0	1,9	95
	1,0	1,0	100
	0,5	0,4	80

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

E. Intervalo de atraso de tempo entre o ultimo calibrador e a dispensa de amostra

Conforme demonstrado a seguir, os resultados das analyses continuam precisos, mesmo quando é dispensada uma amostra 24 minutos depois da adição do calibrador aos tubos revestidos.

INTERVALO DE ATRASO DE TEMPO

Soro (ng/ml)	0'	12'	24'
	0,49	0,55	
	1,96	2,13	
	0,45		0,45
	1,69		2,08

XIV. CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO

- Se os resultados obtidos para o controlo 1 e/ou controlo 2 não estão dentro do intervalo especificado no rótulo do recipiente, os resultados não podem ser utilizados, a menos que seja dada uma explicação satisfatória para a discrepância encontrada.
- Se for desejável, cada laboratório pode fazer os seus prórios conjuntos de amostras de controlo, que podem ser mantidas congeladas em alíquotas. Não faça ciclos de congelação/descongelação mais do que 2 vezes.
- Aceitação do critério para a diferença entre os resultados em duplicatas das amostras devem ser realizadas em Boas Práticas de Laboratório

XV. INTERVALOS DE REFERÊNCIA

Estes valores são dados apenas por segurança; cada laboratório deve estabelecer seus próprios valores normais
Os valores são expressos como 2,5% para 97,5% percentils.

Sujeitos	N	Média ng/ml	Padrão
CRIANÇAS	25	0,4	0,1 – 0,9
MACHOS	64	2,0	0,5 – 4,8
FÊMEAS	250	2,1	0,5 – 4,7
Fase folicular	45	1,9	0,9 – 3,0
Pico ovulatório	14	2,9	1,9 – 4,7
Fase luteal	27	2,0	1,1 – 4,2
Síndrome ovariana policística	25	3,6	2,2 – 6,5
Pós menopausa	45	1,7	0,3 – 3,7

XVI. AVISOS E PRECAUÇÕES

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

XVII. BIBLIOGRAFIA

1. Dorfman RI, Shipley RA : **Androgens.** John Wiley and Sons, New York, pp. 116-128, 1956.
2. Horton R, Tait J : **Androstenedione production and interconversion rates measured in peripheral blood and studies on the possible site of its conversion to testosterone.** J Endocrinol Invest 45:301-313,1966.
3. Pang S, Riddick L : Hirsutism. IN Lifshitz T (ed) : **Pediatric Endocrinology, A Clinical Guide, second edition.** Marcel Dekker, Incl., New York, pp. 259-291, 1990.
4. Cavallo A, Corn C, Bryan GT, Meyer WJ III : **The use of plasma androstenedione in monitoring therapy of patients with congenital adrenal hyperplasia.** J Pediatr 95:33-37, 1979. Bull NY Acad Med 53, 347, 1977
5. Barett-Connor E, Garland C, McPhililips JB, Kaw K-T, Wingard DL : **A prospective, population based study of androstenedione, estrogens and prostate cancer**. Canc res 50:169-173, 1990.
6. Rittmaster RS, Thompson DL : **Effects of leuprolide and esametehasone o hair growth and hormone levels in hirsute women : the relative importance of the ovary and adrenal in the pathogenesis of hirsutism.** J Clin Endocrinol Metab 70:112-116, 1993.
7. Zwicker H, Rittmaster RS : **Androsterone sulfate : Physiology and signifiance in hirsute women.** J Clin Endocrinol Metab 76:112-116, 1993.

XVIII. RESUMO DO PROTOCOLO

	CONTA-GENS TOTAIS (µl)	CALIBRA-DORES (µl)	CONTROLOS DAS AMOSTRAS (µl)
Calibradores (0 to 5) Amostras, controlos Marcador	- - 250	25 - 250	- 25 250
Incubação	1 hora a temperatura ambiente com agitação contínua		
Separação Solução de lavagem de trabalho Separação	-	Aspirat 2,0 ml Aspirat cuidadosamente	
Contagem	Contar os tubos durante 60 segundos		

Nº do catálogo DIAsource:	Nº de P.I::	Nº de revisão:
KIP0451	1700460/pt	110608/1

Data da revisão: 2011-06-08

CE

el

Διαβάστε ολόκληρο το πρωτόκολλο πριν από τη χρήση.

ANDROSTENEDIONE-RIA-CT

I. ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ

Ραδιοανοσοπροσδιορισμός για την *in vitro* ποσοτική μέτρηση της ανθρώπινης 4-ανδροστεν-3,17-διόνης (Ανδοστενεδιόνη) στον ορό και το πλάσμα.

II. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Α. Εμπορική ονομασία: Κιτ ANDROSTENEDIONE-RIA-CT της DIAsource

Β. Αριθμός καταλόγου: KIP0451: 96 προσδιορισμοί

Γ. Κατασκευάζεται από την: DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgium.

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

III. ΚΛΙΝΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

Α. Βιολογική δράση

Η 4-ανδροστεν-3, 17-διόνη (Ανδοστενεδιόνη) είναι ένα C19 στεροειδές. Παράγεται στα επινεφρίδια και τις γονάδες. Η Ανδοστενεδιόνη είναι άμεσος πρόδρομος για τη τεστοσετρόνη και οιστρόνη, που μπορούν να μετατραπούν αμφότερες στη συνέχεια σε οιστραδιόλη. Λόγω της παρουσίας της 17-οξο- (αντί της υδροξύλιο-) ομάδας, η Ανδοστενεδιόνη έχει σχετικά ασθενή ανδρογόνο δράση, που υπολογίζεται σε ≤ 20% της τεστοσετρόνης. Παρότι πρόκειται για ασθενές ανδρογόνο, τα επίπεδα της Ανδοστενεδιόνη στον ορό ενδέχεται να υπερβαίνουν αυτά της τεστοσετρόνης τόσο σε φυσιολογικές καταστάσεις όσο και σε καταστάσεις νόσων. Οι ρυθμοί έκκρισης και παραγωγής της τεστοσετρόνης υπερβαίνουν εκείνα της τεστοσετρόνης στις γυναίκες και λαμβάνει χώρα σημαντική εξω-επινεφριδιακή μετατροπή της Ανδοστενεδιόνη σε τεστοσετρόνη. Επιπλέον, η συγγένεια της φυλοδεσμευτικής σφαιρίνης για τη Ανδοστενεδιόνη είναι πολύ μικρότερη από ότι για τη τεστοσετρόνη ή την οιστραδιόλη (1 – 3).

Ο φυσιολογικός ρόλος της Ανδοστενεδιόνη δεν έχει οριστεί πλήρως. Τα επίπεδα της Ανδοστενεδιόνη είναι υψηλά στον ορό εμβρύων και νεογέννητων, μειώνονται στην παιδική ηλικία και αυξάνονται στην εφηβεία. Σε φυσιολογικούς εφήβους και ενήλικους άνδρες, η κύρια ποσότητα της Ανδοστενεδιόνη προέρχεται από τους όρχεις, είτε άμεσα είτε μετά από μετατροπή της τεστοσετρόνης, ενώ σε φυσιολογικές ενήλικες γυναίκες, ουσιαστικά ισοδύναμες ποσότητες Ανδοστενεδιόνη παράγονται από τα επινεφρίδια και τις ωοθήκες (2,3). Τα αυξημένα επίπεδα της Ανδοστενεδιόνη ενδέχεται να παίζουν κάποιο ρόλο στην ανάπτυξη της δευτερογενούς τριχοφυίας των σεξουαλικών οργάνων στην αδρεναρχή. Τα επίπεδα της Ανδοστενεδιόνη στον ορό εμφανίζουν σημαντική ημερήσια διακύμανση που εξαρτάται από της έκκριση της ACTH. Η παραγωγή της Ανδοστενεδιόνη από τις ωοθήκες διεγείρεται από την ωχρινοτρόπο ορμόνη και τα επίπεδα της Ανδοστενεδιόνη στον ορό ποικίλλουν ανάλογα με τον έμμηνο κύκλο (3). Η παραγωγή της Ανδοστενεδιόνη από τα επινεφρίδια μειώνεται βαθμιαία όσο περνούν τα χρόνια τόσο στους άνδρες όσο και στις γυναίκες. Επιπλέον, η παραγωγή της Ανδοστενεδιόνη από τις ωοθήκες μειώνεται μετά την εμμηνόπαυση (3).

Β. Κλινικές εφαρμογές

Η μέτρηση της Ανδοστενεδιόνη παρέχει ένα χρήσιμο δείκτη της βιοσύνθεσης ανδρογόνων: Αυξημένα επίπεδα Ανδοστενεδιόνη έχουν εμφανιστεί σε αρρενοποιητική συγγενή υπερπλασία των επινεφριδίων. Ακόμη, η μέτρηση των επιπέδων της Ανδοστενεδιόνη έχει πλεονεκτήματα έναντι της μέτρησης των επιπέδων της 17-υδροξυ-προγεστερόνης για την παρακολούθηση της θεραπείας αυτής της κατάστασης, π.χ. λιγότερο έντονη ημερήσια διακύμανση και μικρότερη καταστολή μετά από σύντομη έκθεση σε γλυκοκορτικοειδή (4). Τα επίπεδα της Ανδοστενεδιόνη αυξάνονται επίσης στο σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών, στην υπερθήκωση των στρωματικών κυττάρων των ωοθηκών, στην ανεπάρκεια της 3β-υδροξυστεροειδικής δεϋδρογονάσης και σε άλλες αιτίες δασυτριχισμού στις γυναίκες (3,6 & 7). Εξ ορισμού, τα επίπεδα της Ανδοστενεδιόνη είναι φυσιολογικά στον ιδιοπαθή δασυτριχισμό. Αυξημένα επίπεδα της Ανδοστενεδιόνη στον ορό ενδέχεται να εμφανιστούν επίσης σε περίπτωση αρρενοποιητικών όγκων των ωοθηκών (3). Σε μια προοπτική μελέτη, που περιελάμβανε άνω των 1000 ανδρών, καταδείχθηκε μια εξαρτώμενη από τη δόση σχέση ανάμεσα στην ανδροστενεδιόνη και σε κίνδυνο για καρκίνο του προστάτη (5). Για την επιβεβαίωση αυτών των ευρημάτων θα απαιτηθούν κι άλλες μελέτες.

IV. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Μια σταθερή ποσότητα Ανδοστενεδιόνη σημασμένης με ^{125}I ανταγωνίζεται με τη Δέλτα 4 που θα μετρηθεί, η οποία υπάρχει στο δείγμα ή στο βαθμονομητή, για σταθερή ποσότητα θέσεων αντισωμάτων που είναι ακινητοποιημένα στο τοίχωμα ενός σωληναρίου πολυστυρενίου. Μετά από επώαση 1 ώρας σε αναδευτήρα σε θερμοκρασία δωματίου, η αντίδραση ανταγωνισμού τερματίζεται με ένα βήμα αναρρόφησης. Τα σωληνάρια κατόπιν πλένονται με 2 ml διαλύματος πλύσης εργασίας και αναρροφούνται. Παριστάνεται γραφικά μια καμπύλη βαθμονόμησης και προσδιορίζονται οι συγκεντρώσεις της Ανδοστενεδιόνη των δειγμάτων με αναγωγή συγκεντρώσεων από την καμπύλη βαθμονόμησης.

V. ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Αντιδραστήρια	**Κιτ 96 προσδιορι-σμών**	**Χρωμα-τικός κωδικός**	**Ανασύσταση**
Σωληνάρια επιστρωμένα με αντι-Ανδοστενεδιόνη	2 x 48	κίτρινο	**Έτοιμο** για χρήση
Ag | **^{125}I** ΙΧΝΗΘΕΤΗΣ: Ανδοστενεδιόνη σημασμένη με ^{125}I (κατηγορίας HPLC) σε ρυθμιστικό διάλυμα με βόεια καζεΐνη και αζίδιο (<0,1%)	1 φιαλίδιο 26 ml 111 kBq	κόκκινο	**Έτοιμο** για χρήση
CAL | **0** Μηδενικός βαθμονομητής σε ανθρώπινο ορό και θυμόλη και	1 φιαλίδιο λυοφιλοποι-ημένο	κίτρινο	**Προσθέστε** 0,5 ml απεσταγμένου νερού
CAL | **N** Βαθμονομητές - N = 1 έως 5 (δείτε τις ακριβείς τιμές πάνω στις ετικέτες των φιαλιδίων) σε ανθρώπινο ορό και θυμόλη	5 φιαλίδια λυοφιλοποι-ημένο	κίτρινο	**Προσθέστε** 0,5 ml απεσταγμένου νερού
WASH | **SOLN** | **CONC** Διάλυμα πλύσης (TRIS-HCl)	1 φιαλίδιο 10 ml	καφέ	**Αραιώστε** 70 x με απεσταγμένο νερό (χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα).
CONTROL | **N** Οροί ελέγχου - N = 1 ή 2 σε ανθρώπινο ορό και θυμόλη	2 φιαλίδια λυοφιλοποι-ημένο	ασημί	**Προσθέστε** 0,5 ml απεσταγμένου νερού

Σημείωση: Χρησιμοποιείτε το μηδενικό βαθμονομητή για αραιώσεις ορών.

VI. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

Τα ακόλουθα υλικά απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται στο κιτ:

1. Απεσταγμένο νερό
2. Πιπέτες για διανομή: 50 μl και 500 μl (συνιστάται η χρήση πιπετών ακριβείας με αναλώσιμα πλαστικά ρύγχη)
3. Αναμείκτης στροβιλισμού
4. Μαγνητικός αναδευτήρας
5. Αναδευτήρας σωληναρίων (400 rpm)
6. Αυτόματη σύριγγα των 5 ml (τύπου Cornwall) για πλύση
7. Σύστημα αναρρόφησης (προαιρετικό)
8. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιοσδήποτε μετρητής γ ακτινοβολίας με δυνατότητα μέτρησης της ^{125}I (ελάχιστη απόδοση 70%).

VII. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ

Α. Βαθμονομητές: Ανασυστήστε τους βαθμονομητές με 0,5 ml απεσταγμένου νερού.

Β. Οροί ελέγχου: Ανασυστήστε τους ορούς ελέγχου με 0,5 ml απεσταγμένου νερού.

Γ. Διάλυμα πλύσης εργασίας: Προετοιμάστε επαρκή όγκο διαλύματος πλύσης εργασίας με προσθήκη 69 όγκων απεσταγμένου νερού σε 1 όγκο διαλύματος πλύσης (70x). Χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα για την ομογενοποίηση. Απορρίψτε το μη χρησιμοποιημένο διάλυμα πλύσης εργασίας στο τέλος της ημέρας.

VIII. ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΛΗΞΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- Πριν από το άνοιγμα ή την ανασύσταση, όλα τα συστατικά του κιτ παραμένουν σταθερά έως την ημερομηνία λήξης, η οποία αναγράφεται στην ετικέτα, εφόσον διατηρούνται σε θερμοκρασία 2 έως 8° C.
- Μετά την ανασύσταση, οι οροί ελέγχου παραμένουν σταθεροί επί 7 ημέρες στους 2-8° C.
  Για μεγαλύτερες περιόδους φύλαξης, θα πρέπει να δημιουργηθούν κλάσματα/δόσεις μιας χρήσης και να διατηρηθούν σε θερμοκρασία –20° C επί 3 μήνες το μέγιστο. Αποφεύγετε τους επακόλουθους κύκλους κατάψυξης-απόψυξης.
- Φρέσκο, παρασκευασμένο διάλυμα πλύσης εργασίας θα πρέπει να χρησιμοποιείται την ίδια ημέρα.
- Μετά την πρώτη χρήση του, ο ιχνηθέτης παραμένει σταθερός έως την ημερομηνία λήξης, εφόσον διατηρείται στο αρχικό, ερμητικά κλειστό φιαλίδιο σε θερμοκρασία 2 έως 8° C.
- Τυχόν μεταβολές της φυσικής εμφάνισης των αντιδραστηρίων του κιτ ενδέχεται να υποδηλώνουν αστάθεια ή αλλοίωση.

IX. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

- Τα δείγματα ορού ή πλάσματος πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία 2-8° C.
- Εάν η εξέταση δεν πραγματοποιηθεί εντός 24 ωρών, συνιστάται η φύλαξη στους -20° C.
- Αποφεύγετε τους επακόλουθους κύκλους κατάψυξης-απόψυξης.
- Ο ορός ή το πλάσμα παρέχουν παρόμοια αποτελέσματα.
  Y (Ηπ. πλάσμα) = 0,94 x (ορός) + 0,02 r = 0,98 n = 17
  Y (πλάσμα με EDTA) = 1,01 x (ορός) – 0,03r = 0,95 n = 17

X. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Α. Σημειώσεις σχετικά με το χειρισμό

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

Β. Διαδικασία

1. Σημάνετε επιστρωμένα σωληνάρια εις διπλούν για κάθε βαθμονομητή, ορό ελέγχου και δείγμα. Για τον προσδιορισμό των μετρήσεων του ιχνηθέτη ^{125}I ("total"), σημάνετε 2 κοινά (μη επιστρωμένα) σωληνάρια.
2. Αναμείξτε για λίγο (με αναμείκτη στροβιλισμού τύπου vortex) ορούς ελέγχου και δείγματα και διανείμετε 25 μl από έκαστο σε αντίστοιχα σωληνάρια.
3. Διανείμετε 250 μl Ανδοστενεδιόνη σημασμένης με ^{125}I σε κάθε σωληνάριο, συμπεριλαμβάνοντας τα μη επιστρωμένα σωληνάρια που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ^{125}I ("total") .
4. Ανακινήστε απαλά με το χέρι τη βάση στήριξης των σωληναρίων για να απελευθερώσετε τυχόν παγιδευμένες φυσαλίδες αέρα.
5. Επωάστε για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με συνεχή ανάδευση.
6. Αναρροφήστε (ή μεταγγίστε) το περιεχόμενο κάθε σωληναρίου (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ^{125}I ["total"]). Βεβαιωθείτε ότι το πλαστικό ρύγχος του αναρροφητή φθάνει στον πυθμένα του επιστρωμένου σωληναρίου προκειμένου να αφαιρεθεί όλη η ποσότητα του υγρού.
7. Πλύνετε τα σωληνάρια με 2 ml διαλύματος πλύσης εργασίας (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ^{125}I ["total"]) και αναρροφήστε (ή μεταγγίστε). Αποφύγετε το σχηματισμό αφρού κατά τη διάρκεια της προσθήκης του διαλύματος πλύσης εργασίας.
8. Αφήστε τα σωληνάρια να σταθούν σε όρθια θέση για δύο λεπτά και αναρροφήστε τη σταγόνα υγρού που απομένει.
9. Μετρήστε τα σωληνάρια σε μετρητή γ ακτινοβολίας για 60 δευτερόλεπτα.

XI. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

1. Υπολογίστε τη μέση τιμή των διπλών προσδιορισμών.

2. Υπολογίστε τη δεσμευμένη ραδιενέργεια ως ποσοστό της δέσμευσης που προσδιορίζεται στο σημείο μηδενικού βαθμονομητή (0) σύμφωνα με τον ακόλουθο τύπο:

$$B/B0(\%) = \frac{\text{Κρούσεις (ΒΒαθμονομητής ή δείγμα)}}{\text{Κρούσεις (ΜΜηδενικόβαθμονομητής)}} x100$$

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

XII. ΤΥΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

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

DELTA 4-RIA-CT		cpm	B/Bo (%)
Κρούσεις του ιχνηθέτη ^{125}I ("total")		48670	
Βαθμονομητής	0,0 ng/ml	14867	100,0
	0,1 ng/ml	13196	88,8
	0,4 ng/ml	9450	63,6
	1,0 ng/ml	5910	39,8
	4,0 ng/ml	2746	18,5
	11,0 ng/ml	987	6,6

XIII. ΑΠΟΔΟΣΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

Α. Όριο ανίχνευσης

Μετρήθηκαν είκοσι μηδενικοί βαθμονομητές μαζί με ένα σύνολο άλλων βαθμονομητών.

Το όριο ανίχνευσης, οριζόμενο ως η φαινομενική συγκέντρωση δύο τυπικών αποκλίσεων κάτω από τις μέσες μετρήσεις σε μηδενική δέσμευση, ήταν 0,03 ng/ml.

Β. Ειδικότητα

Το ποσοστό διασταυρούμενης αντίδρασης, που υπολογίζεται με σύγκριση της συγκέντρωσης που αποδίδει αναστολή 50%, είναι αντίστοιχα:

Ένωση	Διασταυρούμενη αντίδραση (%)
Ανδορεστερόνη	0,0566
Κορτιζόλη	0,0148
Κορτικοστερόνη	0,0047
Κορτιζόνη	0,0099
DHEA	0,0155
DHEA-SO4	0,0009
21-δεοξυκορτιζόνη	0,0006
17β-οιστραδιόλη	Μη ανιχν.
Οιστριόλη	Μη ανιχν.
Οιστρόνη	0,0270
Αιτιοχολανολόνη	0,0422
17α-υδροξυπρεγνενολόνη	Μη ανιχν.
17α-υδροξυπρογεστερόνη	0,0840
Ισοανδροστερόνη	0,0112
Πρεγνενολόνη	Μη ανιχν.
Προγεστερόνη	0,0168
Σπιρονολακτόνη	0,0006
5α-διυδροτεστοστερόνη	0,0105
Τεστοστερόνη	0,2406

Σημείωση: Στον πίνακα αυτό παρουσιάζεται η διασταυρούμενη αντιδραστικότητα για την αντι-Ανδοστενεδιόνη.
Μη ανιχν: μη ανιχνεύσιμο

Γ. Ακρίβεια

ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΙΔΙΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ

ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΜΕΤΑΞΥ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΩΝ

Ορός	N	<X> ± Τ.Α. (ng/ml)	Σ.Δ. (%)	Ορός	N	<X> ± Τ.Α. (ng/ml)	Σ.Δ. (%)
A	10	0,36 ± 0,02	4,5	A	10	0,42 ± 0,04	9,0
B	10	6,04 ± 0,19	3,2	B	10	1,90 ± 0,11	5,9

Τ.Α.: Τυπική απόκλιση, Σ.Δ.: Συντελεστής διακύμανσης

Δ. Ορθότητα

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΡΑΙΩΣΗΣ

Δείγμα	Αραίωση	Θεωρητική συγκέντρωση (ng/ml)	Μετρηθείσα συγκέντρωση (ng/ml)
Ορός 1			
	1/1	-	4,64
	1/2	2,32	2,01
	1/4	1,16	0,97
	1/8	0,58	0,55
	1/16	0,29	0,30
	1/32	0,14	0,20
Ορός 2			
	1/1	-	8,94
	1/2	4,47	3,89
	1/4	2,24	2,05
	1/8	1,12	0,98
	1/16	0,56	0,49
	1/32	0,28	0,27
	1/64	0,14	0,18
	1/128	0,07	0,09

Τα δείγματα αραιώθηκαν με μηδενικό βαθμονομητή.

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ

Δείγμα	Προστεθείσα Ανδοστενεδιόνη (ng/ml)	Ανακτηθείσα Ανδοστενεδιόνη (ng/ml)	Ανακτηθείσα (%)
Ορός	8,0	7,7	96
	4,0	4,0	100
	2,0	1,9	95
	1,0	1,0	100
	0,5	0,4	80

Από όσο είναι δυνατό να γνωρίζουμε, δεν υπάρχει διεθνές υλικό αναφοράς για την παράμετρο αυτή.

Ε. Μεσοδιάστημα μεταξύ της διανομής τελευταίου βαθμονομητή και δείγματος

Όπως φαίνεται στη συνέχεια, τα αποτελέσματα του προσδιορισμού παραμένουν αξιόπιστα ακόμα και όταν διανέμεται ένα δείγμα 24 λεπτά μετά την προσθήκη του βαθμονομητή στα επιστρωμένα σωληνάρια.

ΜΕΣΟΔΙΑΣΤΗΜΑ

Ορός (ng/ml)	0'	12'	24'
	0,49	0,55	
	1,96	2,13	
	0,45		0,45
	1,69		2,08

XIV. ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΣ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

- Εάν τα αποτελέσματα που λαμβάνονται για τον ορό ελέγχου 1 ή/και τον ορό ελέγχου 2 δε βρίσκονται εντός του πεδίου τιμών που καθορίζεται στην ετικέτα του φιαλιδίου, τα αποτελέσματα δεν είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν, εκτός εάν έχει δοθεί ικανοποιητική εξήγηση για την ασυμφωνία.
- Εάν είναι επιθυμητό, κάθε εργαστήριο μπορεί να δημιουργήσει τα δικά του μείγματα δειγμάτων ελέγχου (pools), τα οποία πρέπει να διατηρούνται κατεψυγμένα σε κλάσματα/δόσεις μιας χρήσης.
- Τα κριτήρια αποδοχής για τη διαφορά μεταξύ των διπλών αποτελεσμάτων των δειγμάτων θα πρέπει να βασίζονται σε ορθές εργαστηριακές πρακτικές.

XV. ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Οι τιμές αυτές παρέχονται μόνον ως οδηγός. Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να καθιερώσει το δικό του πεδίο φυσιολογικών τιμών.

Άτομα	**N**	**Μέση τιμή ng/ml**	**Πεδίο τιμών**
ΠΑΙΔΙΑ	25	0,4	0,1 – 0,9
ΑΝΔΡΕΣ	64	2,0	0,5 – 4,8
ΓΥΝΑΙΚΕΣ:	250	2,1	0,5 – 4,7
Ωοθυλακική φάση	45	1,9	0,9 – 3,0
Ανώτατο επίπεδο ωοθυλακικής φάσης	14	2,9	1,9 – 4,7
Ωχρινική φάση	27	2,0	1,1 – 4,2
Σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών	25	3,6	2,2 – 6,5
Μετεμμηνοπαυσιακές	45	1,7	0,3 – 3,7

(*) Το πεδίο τιμών εκφράζεται ως ποσοστά επί τοις εκατό 2,5 % και 97,5 %.

XVI. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

Ασφαλείας

Μόνο για διαγνωστική χρήση *in vitro*.

Το κιτ αυτό περιέχει το ^{125}I (Χρόνος ημιζωής: 60 ημέρες), μια ραδιενεργή ουσία η οποία εκπέμπει ιονίζουσα ακτινοβολία X (28 keV) και γ (35.5 keV).

Αυτό το ραδιενεργό προϊόν είναι δυνατό να μεταφερθεί και να χρησιμοποιηθεί μόνο από εξουσιοδοτημένα άτομα. Η αγορά, φύλαξη, χρήση και ανταλλαγή ραδιενεργών προϊόντων υπόκεινται στη νομοθεσία της χώρας του τελικού χρήστη. Σε καμία περίπτωση δεν πρέπει να χορηγείται το προϊόν σε ανθρώπους ή ζώα.

Όλος ο χειρισμός του ραδιενεργού υλικού θα πρέπει να εκτελείται σε καθορισμένο χώρο, μακριά από χώρους τακτικής διέλευσης. Στο εργαστήριο πρέπει να διατηρείται ημερολόγιο για την παραλαβή και τη φύλαξη ραδιενεργών υλικών. Εξοπλισμός και γυάλινα σκεύη του εργαστηρίου, τα οποία θα μπορούσαν να μολυνθούν με ραδιενεργές ουσίες, θα πρέπει να φυλάσσονται σε ξεχωριστό χώρο για την πρόληψη επιμόλυνσης των διαφόρων ραδιοϊσοτόπων.

Τυχόν διαρροές ραδιενεργών υγρών πρέπει να καθαρίζονται αμέσως σύμφωνα με τις διαδικασίες ασφάλειας από ραδιενέργεια. Τα ραδιενεργά απόβλητα πρέπει να απορρίπτονται σύμφωνα με τους τοπικούς κανονισμούς και τις κατευθυντήριες οδηγίες των αρχών που έχουν δικαιοδοσία στο εργαστήριο. Η τήρηση των βασικών κανόνων ασφάλειας από ραδιενέργεια παρέχει επαρκή προστασία.

Τα συστατικά ανθρώπινου αίματος που περιλαμβάνονται στο κιτ αυτό έχουν ελεγχθεί με μεθόδους εγκεκριμένες στην Ευρώπη ή/και από τον FDA και έχει διαπιστωθεί ότι είναι αρνητικά ως προς την παρουσία HbsAg, αντι-HCV, αντι-HIV-1 και 2. Καμία γνωστή μέθοδος δεν είναι δυνατό να παρέχει πλήρη διασφάλιση ότι παράγωγα του ανθρώπινου αίματος δε θα μεταδώσουν ηπατίτιδα, AIDS ή άλλες λοιμώξεις. Επομένως, ο χειρισμός αντιδραστηρίων, δειγμάτων ορού ή πλάσματος θα πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τις τοπικές διαδικασίες περί ασφάλειας.

Όλα τα ζωικά προϊόντα και παράγωγα έχουν συλλεχθεί από υγιή ζώα. Τα βόεια συστατικά προέρχονται από χώρες όπου δεν έχει αναφερθεί BSE. Παρ' όλ' αυτά, συστατικά που περιέχουν ζωικές ουσίες θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικώς μολυσματικά.

Αποφεύγετε οποιαδήποτε επαφή του δέρματος με αντιδραστήρια (χρησιμοποιείται αζίδιο του νατρίου ως συντηρητικό). Το αζίδιο στο κιτ αυτό ενδέχεται να αντιδράσει με μόλυβδο και χαλκό των υδραυλικών σωληνώσεων και να σχηματίσει με τον τρόπο αυτό ιδιαίτερα εκρηκτικά αζίδια μετάλλων. Κατά τη διάρκεια του βήματος πλύσης, εκπλύνετε την αποχέτευση με μεγάλη ποσότητα νερού, για την πρόληψη τυχόν συσσώρευσης αζιδίου.

Μην καπνίζετε, μην πίνετε, μην τρώτε και μη χρησιμοποιείτε καλλυντικά στο χώρο εργασίας. Μην διανέμετε με πιπέτα χρησιμοποιώντας το στόμα σας. Χρησιμοποιείτε προστατευτικό ρουχισμό και γάντια μιας χρήσης**.**

XVII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Dorfman RI, Shipley RA : **Androgens.** John Wiley and Sons, New York, pp. 116-128, 1956.
2. Horton R, Tait J : **Androstenedione production and interconversion rates measured in peripheral blood and studies on the possible site of its conversion to testosterone.** J Endocrinol Invest 45:301-313,1966.
3. Pang S, Riddick L : Hirsutism. IN Lifshitz T (ed) : **Pediatric Endocrinology, A Clinical Guide, second edition.** Marcel Dekker, Incl., New York, pp. 259-291, 1990.
4. Cavallo A, Corn C, Bryan GT, Meyer WJ III : **The use of plasma androstenedione in monitoring therapy of patients with congenital adrenal hyperplasia.** J Pediatr 95:33-37, 1979. Bull NY Acad Med 53, 347, 1977
5. Barett-Connor E, Garland C, McPhililips JB, Kaw K-T, Wingard DL : **A prospective, population based study of androstenedione, estrogens and prostate cancer**. Canc res 50:169-173, 1990.
6. Rittmaster RS, Thompson DL : **Effects of leuprolide and esametehasone o hair growth and hormone levels in hirsute women : the relative importance of the ovary and adrenal in the pathogenesis of hirsutism.** J Clin Endocrinol Metab 70:112-116, 1993.
7. Zwicker H, Rittmaster RS : **Androsterone sulfate : Physiology and signifiance in hirsute women.** J Clin Endocrinol Metab 76:112-116, 1993.

XVIII. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ

	ΚΡΟΥΣΕΙΣ "TOTAL" µl	**ΒΑΘΜΟΝΟ-ΜΗΤΕΣ µl**	**ΔΕΙΓΜΑ (ΤΑ) ΟΡΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ µl**
Βαθμονομητές (0 έως 5) Δείγματα, οροί ελέγχου Ιχνηθέτης	- - 250	25 - 250	- 25 250
Επώαση	1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με συνεχή ανάδευση		
Διαχωρισμός Διάλυμα πλύσης εργασίας Διαχωρισμός	-	Αναρρόφηση (ή μετάγγιση) 2,0 ml Αναρρόφηση (ή μετάγγιση)	
Μέτρηση	Μέτρηση σωληναρίων επί 60 δευτερόλεπτα		

Αρ. καταλόγου DIAsource:	Αριθμός P.I.:	Αρ. αναθεώρησης:
KIP0451	1700460/el	110608/1

ημερομηνία αναθεώρησης : 2011-06-08

CE

pl

Przed zastosowaniem należy przeczytać cały protokół.

ANDROSTENEDIONE-RIA-CT

I. PRZEZNACZENIE

Oznaczenie radioimmunoenzymatyczne do ilościowego pomiaru poziomu 4-androsteno-3,17-dionu (androstenodionu) w ludzkiej surowicy i osoczu, metodą *in vitro*.

II. INFORMACJE OGÓLNE

A. Nazwa firmowa: DIAsource Androstenedione-RIA-CT

B. Numer katalogowy: KIP0451 : 96 oznaczeń

C. Wyprodukowano przez: DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgia.

Dział pomocy technicznej oraz informacje dotyczące zamówień:
Tel.: +32 (0)67 88.99.99 Fax: +32 (0)67 88.99.96

III. INFORMACJE KLINICZNE

A. Aktywność biologiczna

4-androsteno-3,17-dion (androstenodion) jest dziewiętnastowęglowym sterydem. Jest wytwarzany w nadnerczach i gonadach. Androstenodion jest bezpośrednim prekursorem testosteronu i estrogenu, które mogą być przekształcane do estradiolu. Z uwagi na obecność tlenu w pozycji 17. (bardziej, niż ze względu na obecność grupy hydroksylowej), androstenodion przejawia względnie słabą aktywność androgenną, szacowaną na około ≤ 20% testosteronu. Chociaż androstenodion jest słabym androgenem, zarówno w stanach prawidłowych, jak i chorobowych, poziomy hormonu w surowicy mogą przekraczać poziom testosteronu. U kobiet, wydzielanie i produkcja androstenodionu jest większa niż testosteronu, ponadto zachodzi dodatkowa, pozanadnerczowa konwersja androstenodionu do testosteronu. Oprócz tego, powinowactwo białka wiążącego hormony płciowe (sex hormone-binding globulin) do androstenodionu, jest znacznie mniejsze, niż dla testosteronu bądź estradiolu (1-3).

Fizjologiczna rola androstenodionu nie została w pełni określona. Poziomy androstenodionu są wysokie w surowicy płodów i noworodków, zmniejszają się w dzieciństwie a wzrastają w okresie dojrzewania. U zdrowych mężczyzn w okresie dojrzewania i dorosłych, androstenodion jest wytwarzany głównie w jądrach albo bezpośrednio, albo w wyniku konwersji testosteronu, podczas gdy u zdrowych, dorosłych kobiet androstenodion jest produkowany głównie w nadnerczach i w jajniku. Podwyższone poziomy androstenodionu mogą mieć wpływ na rozwój drugorzędowego owłosienia płciowego w trakcie dojrzewania. Poziomy androstenodionu w surowicy przejawiają znaczącą zmienność, w zależności od wydzielania ACTH. Hormon luteinizujący stymuluje produkcję androstenodionu w jajnikach, dlatego poziomy androstenodionu w surowicy zmieniają się w czasie cyklu miesiączkowego. Zarówno u kobiet, jak i u mężczyzn, wytwarzanie androstenodionu w nadnerczach stopniowo zmniejsza się z wiekiem. Ponadto, wytwarzanie androstenodionu w jajnikach maleje po menopauzie (3).

B. Zastosowania kliniczne

Pomiar poziomu androstenodionu jest przydatny w ocenie syntezy biologicznej androgenów. Podwyższone poziomy androstenodionu obserwowano we wrodzonej, wirylizującej hiperplazji nadnerczy. Ze względu na mniej zaznaczoną zmienność dobową i mniejszą supresję po krótkiej ekspozycji na glikokortykosterydy, w leczeniu tego zespołu pomiary poziomów androstenodionu mogą być bardziej przydatne, niż pomiary poziomów 17-hydroksy-progesteronu. Poziomy androstenodionu w surowicy są również zwiększone w zespole policystycznych jajników, nadmiernej aktywności tkanki otoczkowej zrębu jajników, niedoboru dehydrogenazy 3b-hydroksysterydowej i innych stanach będących przyczyną hirsutyzmu u kobiet. Zgodnie z definicją, poziomy androstenodionu są prawidłowe w hirsutyzmie idiopatycznym. Podwyższone poziomy androstenodionu w surowicy mogą również występować w guzach wirylizujących nadnerczy i jajników (3). W prospektywnym badaniu 1000 mężczyzn przedstawiono zależność od dawki androstenodionu, w odniesieniu do ryzyka raka gruczołu krokowego. Aby potwierdzić te doniesienia, konieczne będzie przeprowadzenie dalszych badań.

IV. ZAGADNIENIA DOTYCZĄCE METODY

W celu pomiaru substancji obecnej w próbce lub w kalibratorze, odpowiednia ilość cząsteczek androstenodionu oznakowanych ^{125}I współzawodniczy z androstenodionem o określoną ilość miejsc na przeciwciałach unieruchomionych na ściance probówki polistyrenowej. Ze względu na wysoką swoistość opłaszczonych przeciwciał nie jest wymagane zastosowanie ani ekstrakcji, ani chromatografii. Po jednogodzinnej inkubacji w temperaturze pokojowej w wytrząsarce, wykonanie aspiracji przerywa reakcję kompetycyjną. Następnie probówki są płukane przy pomocy 2 ml roztworu płuczącego i aspirowane. Wykreślana jest krzywa kalibracyjna a stężenia androstenodionu w próbkach są określane na podstawie nałożenia dawki na krzywą kalibracyjną.

V. ODCZYNNIKI DOSTARCZONE

Odczynniki	Zestaw 96 oznaczeń	Kolor	Rekonstytucja
Probówki opłaszczone anty-androstenedionu	2 x 48	żółty	**Gotowe** do zastosowania.
Ag | **^{125}I** ZNACZNIK IZOTOPOWY: Androstenodion oznakowany jodem^{125} (poziom HPLC) w buforze zawierającym kazeinę bydlęcą i azydek (<0,1%).	1 fiolka 26 ml 111 kBq	czerwony	**Gotowy** do zastosowania.
CAL | **0** Kalibrator zerowy na bazie surowicy ludzkiej z zawartością tymolu.	1 fiolka materiał liofilizowany	żółty	**Dodać** 0,5 ml wody destylowanej
CAL | **N** Kalibratory - N = od 1 do 5 (dokładne wartości na etykietach fiolek) na bazie surowicy ludzkiej z zawartością tymolu.	5 fiolek materiał liofilizowany	żółty	**Dodać** 0,5 ml wody destylowanej
WASH | **SOLN** | **CONC** Roztwór płuczący (TRIS HCl)	1 fiolka 10 ml	brązowy	**Rozcieńczyć** 70x wodą destylowaną (wykorzystać mieszadło magnetyczne).
CONTROL | **N** Kontrole - N = od 1 do 2 na bazie surowicy ludzkiej z zawartością tymolu.	2 fiolki materiał liofilizowany	srebrny	**Dodać** 0,5 ml wody destylowanej

Uwaga: Do rozcieńczeń próbek należy stosować kalibrator zerowy.

VI. MATERIAŁY WYMAGANE, ALE NIEDOSTARCZONE

Poniższe materiały są wymagane, ale nie są dostarczone w zestawie:

1. Woda destylowana
2. Pipety do dozowania: 25 µl, 250 µl, 500 µl i 2 ml (zaleca się korzystanie z dokładnych pipet z jednorazowymi końcówkami plastikowymi)
3. Mieszadło wirowe
4. Mieszadło magnetyczne
5. Wytrząsarka probówek (400 obr/min)
6. Strzykawka automatyczna o objętości 5 ml (rodzaj Cornwall) do płukania
7. Układ do aspiracji (opcjonalnie)
8. Może być wykorzystywany jakikolwiek licznik gamma odpowiedni do pomiaru ^{125}I (minimalny uzysk 70%)

VII. PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

A. **Kalibratory**: Rekonstytuować kalibrator zerowy przy pomocy 0,5 ml wody destylowanej a inne kalibratory przy pomocy 0,5 ml wody destylowanej.

B. **Kontrole**: Kontrole należy rekonstytuować przy pomocy 0,5 ml wody destylowanej.

C. **Roboczy roztwór płuczący**: Właściwą objętość roboczego roztworu płuczącego należy przygotować, dodając 69 objętości wody destylowanej do 1 objętości roztworu płuczącego (70x). Do homogenizacji należy wykorzystać mieszadło magnetyczne. Niewykorzystany roboczy roztwór płuczący należy wylać pod koniec dnia.

VIII. PRZECHOWYWANIE I DATA WAŻNOŚCI ODCZYNNIKÓW

- Przed otwarciem lub rekonstytucją wszystkie składniki zestawu zachowują trwałość do daty ważności przedstawionej na etykiecie, jeżeli są przechowywane w temperaturze od 2 do 8°C.
- Po rekonstytucji, kalibratory i kontrole zachowują trwałość przez 1 tydzień, pod warunkiem przechowywania w temperaturze od 2 do 8°C. W razie konieczności przechowywania przez dłuższy okres czasu, należy przygotować niewielkie objętości kontroli, co pozwala przechowywać je w temperaturze -20 °C przez 3 miesiące. Unikać powtarzanych cykli zamrażania-odmrażania.
- Świeżo przygotowany roboczy roztwór płuczący powinien być wykorzystany w tym samym dniu.
- Po jego pierwszym zastosowaniu, znacznik izotopowy zachowuje trwałość do podanej daty ważności, jeżeli jest przechowywany w oryginalnej, dobrze zamkniętej fiolce w temperaturze od 2 do 8°C.
- Zmiany w wyglądzie fizycznym odczynników w zestawie mogą wskazywać na ich niestabilność lub zużycie.

IX. POBIERANIE I PRZYGOTOWANIE MATERIAŁU DO BADANIA

- Próbki surowicy lub osocza muszą być przechowywane w temperaturze 2-8°C.
- Jeżeli oznaczenie nie jest wykonywane w ciągu 24 godzin, zaleca się przechowywanie w małych objętościach w temperaturze -20°C.
- Należy unikać powtarzanych cykli zamrażania-odmrażania.
- Surowica i osocze prowadzą do podobnych wyników.
  Y (osocze heparynizowane) = 0,94 x (surowica) + 0,02 r = 0,98 n = 17
  Y (osocze z EDTA) = 1,01 x (surowica) – 0,03 r = 0,95 n = 17

X. PROCEDURA

A. Uwagi dotyczące obsługi

Nie wolno wykorzystywać składników zestawu po upływie podanej daty ważności.
Nie wolno mieszać materiałów pochodzących z różnych serii zestawów.
Przed wykorzystaniem wszystkie odczynniki powinny osiągnąć temperaturę pokojową.
Wszystkie odczynniki i próbki należy dokładnie wymieszać przez delikatne potrząsanie lub obracanie.
Aby uniknąć zanieczyszczenia krzyżowego, do dodawania poszczególnych odczynników i próbek należy wykorzystywać czyste końcówki jednorazowe pipet. Pipety wysokiej precyzji lub pipety automatyczne poprawiają precyzję wykonania oznaczenia.
Należy przestrzegać czasów inkubacji.
Należy przygotować krzywą kalibracyjną dla każdego cyklu pomiarowego; nie wolno wykorzystywać danych z poprzednich oznaczeń.

B. Procedura

1. Dla każdego kalibratora, próbki i kontroli, należy oznaczyć opłaszczone probówki w badaniach podwójnych. W celu określenia całkowitych zliczeń, należy oznaczyć 2 standardowe probówki.
2. Należy szybko wymieszać, wirując: kalibratory, próbki i kontrole, i dozować po 25 µl każdej substancji do odpowiednich probówek.
3. Do każdej probówki, w tym do probówek nieopłaszczonych do całkowitego zliczania, należy dodać po 250 µl androstenodionu oznakowanego jodem125.
4. Należy delikatnie potrząsnąć statywem, w celu uwolnienia uwięzionych pęcherzyków powietrza.
5. Należy inkubować przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej ciągle wytrząsając.
6. Należy aspirować (lub odlać) zawartość każdej probówki (z wyjątkiem probówek do całkowitego zliczania). Aby usunąć cały płyn, należy upewnić się, że plastykowa końcówka aspiratora osiągnęła dno opłaszczonej probówki.
7. Przy pomocy 2 ml roboczego roztworu płuczącego (z wyjątkiem probówek do całkowitego zliczania), należy przepłukać probówki i aspirować zawartość (lub odlać ją). W trakcie dodawania roboczego roztworu płuczącego, należy unikać wytwarzania piany.
8. Probówki należy pozostawić na dwie minuty w pozycji stojącej do góry i aspirować pozostałe krople płynu.
9. Probówki należy zliczać w liczniku gamma przez 60 sekund.

XI. OBLICZANIE WYNIKÓW

1. Należy obliczyć średnią oznaczeń podwójnych.
2. Należy obliczyć związaną radioaktywność, jako odsetek wiązania określonego w zerowym punkcie kalibracji (0), zgodnie z poniższym wzorem:

$$B/B0(\%) = \frac{\text{Liczba zliczeń (dla kalibratora lub próbki)}}{\text{Liczba zliczeń (dla kalibratora zerowego)}} \times 100$$

3. Na 3 arkuszach półlogarytmicznych lub papierze milimetrowym, należy wykreślić wartości (B/B0(%)) dla każdego punktu kalibratora, jako funkcję stężenia androstenodionu każdego punktu kalibratora. Należy odrzucić oczywiste wartości graniczne.
4. Do opracowania krzywej kalibracyjnej mogą być wykorzystane również metody wspomagania komputerowego. Jeżeli ma być zastosowane automatyczne przetwarzanie wyników, zaleca się dopasowanie krzywej logistycznej 4 parametrowej.
5. Nakładając wartości (B/B0 (%)) próbki, należy określić stężenia androstenodionu w próbkach z krzywej kalibracyjnej.
6. Dla każdego oznaczenia należy sprawdzić odsetek całkowitego związanego znacznika izotopowego, przy braku nieoznakowanego androstenodionu (B0/T).

XII. PRZYKŁAD DANYCH TYPOWYCH

Poniższe dane są przedstawione wyłącznie w celach przykładowych i nie powinny być nigdy stosowane zamiast rzeczywistych krzywych kalibracyjnych.

ANDROSTENEDION-RIA-CT		cpm	B/Bo (%)
Zliczanie całkowite		48670	
Kalibrator	0,0 ng/ml	14867	100,0
	0,1 ng/ml	13196	88,8
	0,4 ng/ml	9450	63,6
	1,0 ng/ml	5910	39,8
	4,0 ng/ml	2746	18,5
	11,0 ng/ml	987	6,6

XIII. DZIAŁANIE I OGRANICZENIA

A. Granica wykrywania

Dwadzieścia kalibratorów zerowych oznaczano wraz z zestawem innych kalibratorów.
Granica wykrywania, zdefiniowana jako odmienne stężenie dwóch odchyleń standardowych poniżej przeciętnej wartości zliczania, przy wiązaniu zerowym, kształtowała się na poziomie 0,03 ng/ml.

B. Swoistość

Swoistość przeciwciała poliklonalnego, wykorzystywanego w tym oznaczeniu, została oceniona za pomocą metody RIA jako stosunek ilości androstenodionu, która prowadzi do 50% zahamowania wiązania znakowanego androstenodionu, do ilości związków (analogów) reagujących krzyżowo, która daje taki sam poziom zahamowania.

Związek	Reaktywność krzyżowa (%)
Androsteron	0,0566
Kortyzol	0,0148
Kortykosteron	0,0047
Kortyzon	0,0099
DHEA	0,0155
DHEA-SO_4	0,0009
21-Deoksykortyzon	0,0006
17β–Estradiol	n.w.
Estriol	n.w.
Estron	0,0270
Etiocholanolon	0,0422
17α-hydroksypregnenolon	n.w.
17α-hydroksyprogesteron	0,0840
Izoandrosteron	0,0112
Pregnenolon	n.w.
Progesteron	0,0168
Spironolakton	0,0006
5α-dihydrotestosteron	0,0105
Testosteron	0,2406

Uwaga: W tej tabeli przedstawiono reaktywność krzyżową dla anty androstenodionu.
n.w. : niewykrywalne

C. Precyzja

PRECYZJA W SERII				PRECYZJA MIĘDZY SERIAMI			
Surowica	**N**	**<X> ± SD (ng/ml)**	**CV (%)**	**Surowica**	**N**	**<X> ± SD (ng/ml)**	**CV (%)**
A	10	0,36 ± 0,02	4,5	A	10	0,42 ± 0,04	9,0
B	10	6,04 ± 0,19	3,2	B	10	1,90 ± 0,11	5,9

SD: Odchylenie standardowe; CV: Współczynnik zmienności

D. Dokładność

BADANIE ROZCIEŃCZENIA

Próbka	Rozcieńczenie	Stęż. teoretyczne (ng/ml)	Stęż. zmierzone (ng/ml)
Surowica 1	1/1	-	4,64
	1/2	2,32	2,01
	1/4	1,16	0,97
	1/8	0,58	0,55
	1/16	0,29	0,30
	1/32	0,14	0,20
Surowica 2	1/1	-	8,94
	1/2	4,47	3,89
	1/4	2,24	2,05
	1/8	1,12	0,98
	1/16	0,56	0,49
	1/32	0,28	0,27
	1/64	0,14	0,18
	1/128	0,07	0,09

Próbki zostały rozcieńczone przy pomocy kalibratora zerowego.

BADANIE ODZYSKU

Próbka	dodano androstenodion (ng/ml)	Odzyskany androstenodion (ng/ml)	Odzysk (%)
Surowica	8,0	7,7	96
	4,0	4,0	100
	2,0	1,9	95
	1,0	1,0	100
	0,5	0,4	80

Według naszej wiedzy, dla tego parametru nie ma żadnego międzynarodowego materiału referencyjnego.

E. Opóźnienie pomiędzy oznaczeniem ostatniego kalibratora i dozowaniem próbki

Jak wykazano, wyniki pomiaru pozostają dokładne nawet wówczas, gdy od momentu dodania kalibratora do opłaszczonych probówek minęły 24 minuty.

OPÓŹNIENIE CZASOWE

Surowica (ng/ml)	0'	12'	24'
	0,49	0,55	
	1,96	2,13	
	0,45		0,45
	1,69		2,08

XIV. WEWNĘTRZNA KONTROLA JAKOŚCI

- Jeżeli wyniki uzyskane dla kontroli 1 i 2 nie znajdują się w zakresie określonym na etykiecie fiolki, wyniki nie mogą zostać wykorzystane, dopóki nie uda się znaleźć właściwego wyjaśnienia tego odchylenia.
- Jeżeli to konieczne, każde laboratorium może wykonać własne próbki zbiorcze w celach kontrolnych, które powinny być zamrożone w małych objętościach.
- Dopuszczalne kryteria, dotyczące różnicy pomiędzy wynikami oznaczeń podwójnych próbek, powinny być zgodne z zasadami prawidłowej pracy w laboratorium.

XV. ZAKRESY REFERENCYJNE

Wartości są przedstawione wyłącznie w celach orientacyjnych, każde laboratorium powinno opracować własne wartości referencyjne.
Zakres jest oparty na percentylach od 2,5% do 97,5%.

osobnicy	N	Mediana (ng/ml)	Zakres
DZIECI	25	0,4	0,1 – 0,9
MĘŻCZYŹNI	64	2,0	0,5 – 4,8
KOBIETY	250	2,1	0,5 – 4,7
Faza follikularna	45	1,9	0,9 – 3,0
Pik owulacyjny	14	2,9	1,9 – 4,7
Faza lutealna	27	2,0	1,1 – 4,2
Zespół policystycznych jajników	25	3,6	2,2 – 6,5
Okres pomenopauzalny	45	1,7	0,3 – 3,7

XVI. ŚRODKI OSTROŻNOŚCI I OSTRZEŻENIA

Bezpieczeństwo
Tylko do diagnostyki *in vitro*.
Zestaw zawiera ^{125}I (Okres połowicznego rozpadu: 60 dni), emitujący promieniowanie jonizujące X (28 keV) i γ (35.5 keV).
Ten produkt radioaktywny może być transportowany i wykorzystany wyłączne przez osoby autoryzowane; zakup, przechowywanie, stosowanie i wymiana produktów radioaktywnych podlega regulacjom prawnym kraju użytkownika końcowego. W żadnym wypadku produkt nie może być podawany ludziom lub zwierzętom.
Obsługa materiałów radioaktywnych powinna być przeprowadzana w miejscach do tego przeznaczonych, z dala od miejsc ogólnej użyteczności. W laboratorium musi być przechowywany rejestr przyjęć i przechowywania materiałów radioaktywnych. Wyposażenie laboratorium oraz szkło, które może być skażone substancjami radioaktywnymi, powinno być oddzielone, w celu uniknięcia krzyżowego zanieczyszczenia różnych radioizotopów.
Wszelkie plamy z substancji radioaktywnych muszą być natychmiast oczyszczone, zgodnie z procedurami dotyczącymi bezpieczeństwa radiologicznego. Odpady radioaktywne muszą być usuwane zgodnie z miejscowymi przepisami i ogólnie przyjętymi wytycznymi obowiązującymi w laboratorium. Przestrzeganie podstawowych zasad bezpieczeństwa radiologicznego zapewnia wystarczające zabezpieczenie.
Składniki zawierające ludzką krew, dostarczone w zestawie, zostały przebadane metodami zaaprobowanymi przez instytucje europejskie i/lub FDA. Stwierdzono, że nie zawierają one HbsAg, przeciwciał anty-HCV, anty-HIV-1 i 2. Żadna ze znanych metod nie może dać całkowitej pewności, że materiały pochodzenia ludzkiego nie przeniosą czynników zakaźnych wirusowego zapalenia wątroby, AIDS i innych. Dlatego, postępowanie z odczynnikami i próbkami surowicy lub osocza, powinno być zgodne z miejscowymi procedurami dotyczącymi bezpieczeństwa.
Produkty pochodzenia zwierzęcego były pobierane od zdrowych zwierząt. Składniki bydlęce pochodzą z krajów, w których nie odnotowano występowania BSE. Pomimo to, składniki zawierające substancje pochodzenia zwierzęcego powinny być traktowane jako potencjalnie zakaźne.
Należy unikać kontaktu skóry z odczynnikami (zawierają azydek sodowy jako środek konserwujący). Azydek znajdujący się w zestawie, może reagować z miedzią i ołowiem w układzie kanalizacyjnym, tworząc związki o właściwościach wybuchowych. W czasie płukania odprowadzany płyn należy płukać dużymi objętościami wody, aby zapobiec kumulacji azydków.
Nie wolno palić, spożywać napojów ani pokarmów bądź używać kosmetyków w miejscu pracy. Nie pipetować ustami. Zakładać ubranie ochronne i rękawiczki jednorazowe.

XVII. BIBLIOGRAFIA

1. Dorfman RI, Shipley RA : **Androgens.** John Wiley and Sons, New York, pp. 116-128, 1956.

2. Horton R, Tait J : **Androstenedione production and interconversion rates measured in peripheral blood and studies on the possible site of its conversion to testosterone.** J Endocrinol Invest 45:301-313,1966.

3. Pang S, Riddick L : Hirsutism. IN Lifshitz T (ed) : **Pediatric Endocrinology, A Clinical Guide, second edition.** Marcel Dekker, Incl., New York, pp. 259-291, 1990.

4. Cavallo A, Corn C, Bryan GT, Meyer WJ III : **The use of plasma androstenedione in monitoring therapy of patients with congenital adrenal hyperplasia.** J Pediatr 95:33-37, 1979. Bull NY Acad Med 53, 347, 1977

5. Barett-Connor E, Garland C, McPhililips JB, Kaw K-T, Wingard DL : **A prospective, population based study of androstenedione, estrogens and prostate cancer**. Canc res 50:169-173, 1990.

6. Rittmaster RS, Thompson DL : **Effects of leuprolide and esametehasone o hair growth and hormone levels in hirsute women : the relative importance of the ovary and adrenal in the pathogenesis of hirsutism.** J Clin Endocrinol Metab 70:112-116, 1993.

7. Zwicker H, Rittmaster RS : **Androsterone sulfate : Physiology and signifiance in hirsute women.** J Clin Endocrinol Metab 76:112-116, 1993.

XVIII. PODSUMOWANIE PROTOKOŁU

	CAŁKOWITA LICZBA ZLICZEŃ µl	**KALIBRATORY µl**	**PRÓBKI KONTROLE µl**
Kalibratory (0 - 5) Próbki, kontrole Znacznik izotopowy	- - 250	25 - 250	- 25 250
Inkubacja	1 godzina w temperaturze pokojowej w wytrząsając.		
Rozdzielenie Roboczy roztwór płuczący Rozdzielenie	- - -	Aspiracja (lub odlewanie) 2,0 ml Aspiracja (lub odlewanie)	
Zliczanie	Zliczanie probówek przez 60 sekund		

Nr katalogowy DIAsource	Numer P.I.	Nr aktualizacji :
KIP0451	1700460/pl	110608/1

Data wydania : 2011-06-08

bu

CE

Прочетете целия протокол преди употреба

ANDROSTENEDIONE-RIA-CT

I. УПОТРЕБА

Радиоимунно изследване (RIA) за количествено измерване *in vitro* на съдържанието на човешки 4-андростен-3, 17-дион (андростендион) в серум и плазма.

II. ОБЩА ИНФОРМАЦИЯ

A. **Патентовано име:** DIAsource ANDROSTENEDIONE-RIA-CT Kit

B. **Каталожен номер:** KIP0451: 96 теста

C. **Произведено от:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue De l'Industrie 8 B-1400 Nivelles, Belgium.

За техническа помощ или поръчка:
Тел.: +32 (0)67 88.99.99 Факс: +32 (0)67 88.99.96

III. КЛИНИЧЕН ПРЕГЛЕД

A. Биологична активност

4-андростен-3, 17-дион (андростендион) представлява стероид C19. Той се произвежда в надбъбречната жлеза и гонадите. Андростендионът е непосредствен прекурсор на тестостерона и естрона, които впоследствие могат да се превърнат в естрадиол. Поради наличието на 17-оксо (а не на хидроксилна) група, андростендионът притежава относително слаба андрогенна активност, възлизаща на ≤ 20% от тази на тестостерона. Въпреки слабата андрогенна активност, серумните нива на андростендион могат да надвишават тези на тестостерона при нормални и болестни състояния, нормите на секреция и производство на андростендион надвишават тези на тестостерона при жените и се наблюдава значителна конверсия на андростендиона в надбъбречната жлеза в тестостерон извън надбъбречната жлеза. Нещо повече, афинитетът на свързващия полови хормони глобулин към андростендиона е много по-малък от афинитета му към тестостерона или естрадиола (1 – 3).
Физиологичната роля на андростендиона не е достатъчно добре изяснена. Серумните нива на андростендион са високи в ембрионалния и неонаталния серум, намаляват през детството и се увеличават през пубертета. При нормалните юноши и възрастни мъже голямата част от андростендиона се получава от тестисите, или директно, или чрез конверсия от тестостерон, докато при нормалните възрастни жени еквивалентни по същество количества андростендион се произвеждат в надбъбречната жлеза и яйчниците (2,3). Увеличените нива на андростендиона могат да играят значителна роля при вторичното полово окосмяване в етапа на физиологичното полово съзряване. Серумните нива на андростендиона показват значителна денонощна променливост в зависимост от секрецията на АСТН (адренокортикотропен хормон). Произвеждането на андростендион в яйчниците се стимулира от лутеинизиращия хормон (lg), като серумните нива на андростендион варират съобразно менструалния цикъл (3). Произвеждането на андростендиона в надбъбречната жлеза постепенно намалява с увеличаването на възрастта при мъжете и жените. Освен това, производството на андростендион в яйчниците намалява след менопаузата (3).

B. Клинични приложения

Измерването на стойностите на андростендиона е полезен маркер за андрогенната биосинтезата: повишени нива на андростендион се наблюдават при вирилизираща вродена хиперплазия на надбъбречната жлеза (водеща до повишаване и ускоряване на половата зрялост); освен това измерването на нивата на андростендиона има предимства пред измерването на нивата на 17-хидрокси-прогестерона при наблюдаване лечението на това състояние, като например установяването на по-слаба амплитуда на денонощната променливост и по-слабо потискане след кратко прилагане на глюкокортикоиди (4). Серумните нива на андростендион се увеличават и при синдрома на поликистозни яйчници, при хипертекоза на стромата на яйчниците, дефицит на 3b-хидроксистероидна дехидрогеназа, както и при други причини за свръхокосмяването при някои жени (3,6 & 7). По дефиниция нивата на андростендион са нормални при идиопатично свръхокосмяване. Повишени серумни нива на андростендион могат да възнинат и при вирилизиращи тумори на надбъбречната жлеза и яйчниците (3). При изследване на повече от 1000 мъже бе наблюдавана зависимост „доза-реакция" между количеството на андростендиона и риска от рак на простатата (5); за потвърждаване на тези открития ще бъдат необходими допълнителни изследвания.

IV. ПРИНЦИПИ НА МЕТОДА

Определено количество натоварен с ^{125}I андростендион се конкурира с наличния в проба или калибратор андростендион, подлежащ на измерване, за определено количество центрове на специфични антитела, имобилизирани към стените на полистиролова епруветка. След едночасова инкубация на стайна температура върху клатещо устройство конкурентната реакция приключва с аспирация. След това епруветките се измиват с 2 ml Работен Измиващ Разтвор и се аспирират. Начертава се калибрационна крива, а концентрациите на андростендион в пробите се определят чрез интерполация на дозата от калибрационната крива.

V. ИЗПОЛЗВАНИ РЕАГЕНТИ

Реагенти	Количество 96 теста	Цветен код	Приготвяне
Епруветки, покрити с анти-АНДРОСТЕНДИОН	2 x 48	жълт	**Готов** за употреба
Ab | **^{125}I** ПРОСЛЕДЯВАЩО ВЕЩЕСТВО: АНДРОСТЕНДИОН, натоварен с ^{125}йод (HPLC скала) в буфер с волски казеин и азид (<0.1%)	1 флакон 26 ml 111 kBq	червен	**Готов** за употреба
CAL | **0** Нулев Калибратор в човешки серум с тимол	1 флакон лиофилизирани	жълт	**Добавете** 0,5 ml дестилирана вода
CAL | **N** Калибратор - N = 1 до 5 (виж точните стойности на етикета на флаконите) Нулев Калибратор в човешки серум с тимол	5 флакона лиофилизирани	жълт	**Добавете** 0,5 ml дестилирана вода
WASH | **SOLN** | **CONC** Измиващ разтвор (TRIS-HCl)	1 флакон 10 ml	кафяв	**Разредете** 70x с дестилирана вода (използвайте магнитен сепаратор)
CONTROL | **N** Контроли 1 и 2 в човешки серум, тимол	2 флакона лиофилизирани	сребърен	**Добавете** 0.5 ml дестилирана вода

Забележка: Използвайте нулевия калибратор за серумните разреждания.

VI. СРЕДСТВА, КОИТО НЕ СЕ ОСИГУРЯВАТ

Следните материали са необходими, но не се осигуряват в набора:

1. Дестилирана вода
2. Пипети от: 25 µl, 250 µl, 500 µl и 2 ml (препоръчва се използването на прецизни пипети с накрайници за еднократна употреба).
3. Завихрящ смесител
4. Магнитен сепаратор
5. Клатещо устройство за епруветки (400 оборота в минута)
6. 5 ml автоматична спринцовка (тип Cornwall) за измиване
7. Аспирационна система (по избор).
8. Всякакъв гама брояч, който може да измери употребеното количество ^{125}I (минимален капацитет от 70%)

VII. ПРИГОТВЯНЕ НА РЕАГЕНТА

A. Калибратори : Реконституирайте калибраторите с 0,5 ml дестилирана вода.

B. Контроли: Реконституирайте контролите с 0,5 ml дестилирана вода.

C. Работен измиващ разтвор: Подгответе адекватен обем от работния измиващ разтвор чрез добавянето на 69 обема дестилирана вода към 1 обем от измиващия разтвор (70x). Използвайте магнитен сепаратор, за да хомогенизирате. Изхвърлете неупотребеното количество от работния измиващ разтвор в края на деня.

VIII. СЪХРАНЕНИЕ И СРОК НА ГОДНОСТ НА РЕАГЕНТИТЕ

- Всички компоненти на кита са стабилни до датата на срока на годност, посочен на опаковката, при температура на съхранение от 2 °C до 8°C преди отваряне или реконституиране.
- След реконституиране, калибраторите и контролите са стабилни за срок от 7 дни при температури 2-8°C. За по-дълги срокове на съхранение, се определя кратно и се съхранява при температура -20 °C за максимум 3 месеца. Избягвайте последващи цикли на замразяване-размразяване.
- Прясно приготвения Работен измиващ разтвор трябва да бъде използван същия ден.
- След първата употреба, трейсера е стабилен до изтичане срока на годност, ако се съхранява в оригиналния добре затворен флакон при температури 2-8°C.
- Промени във физическия вид на реагентите на кита индицират нестабилност или негодност.

IX. СЪБИРАНЕ НА ПРОБИТЕ И ОБРАБОТКА

- Серумните или плазмените проби трябва да се съхраняват при температури 2-8°C.
- Ако тестът не се направи в рамките на 24 часа, се препоръчва съхранение при температура -20°C.
- Избягвайте последващи цикли на замразяване-размразяване.
- Серумът и плазмата дават сходни резултати:

  Y (Хеп. плазма) = 0,94 x (серум) + 0,02 r = 0,98 n = 17

  Y (EDTA плазма) = 1,01 x (серум) – 0,03 r = 0,95 n = 17

X. ПРОЦЕДУРА

A. Общи бележки

Не използвайте кита или компонентите му след датата на изтичане срока на годност. Не смесвайте материали от различни партиди китове. Преди употреба оставете всички реагенти на стайна температура.

Внимателно смесвайте всички реагенти с пробите чрез нежно раклащане или въртеливо размесване. За да избегнете кръстосана контаминация, използвайте чист пипетен накрайник за еднократна употреба за добавянето на всеки реагент към съответната проба.

Високо прецизираните пипети или автоматичните пипети биха подобрили точността. Съобразявайте се с времето за инкубация.

Подгответе калибрационна крива за всяко измерване и не използвайте данни от предишни измервания.

B. Процедура

1. Означете две по две покритите епруветки за всеки калибратор, контрола и проба. За определяне на общия брой импулси, обозначете 2 нормални епруветки.
2. Разклатете за кратко време калибраторите, контролите и пробите и разпределете по 25 µl от всяко в съответните епруветки.
3. Разпределете 250 µl андростендион, натоварен с 125йод във всяка епруветка, включително в непокритите епруветки за общото преброяване.
4. Разклатете нежно с ръка контейнера с епруветките, за да освободите всяко останало въздушно мехурче.
5. Инкубирайте за 1 час на стайна температура при непрекъснато разклащане.
6. Аспирирайте (или прелейте) съдържанието на всяка епруветка (освен епруветките за определяне на общия брой импулси). Уверете се, че пластмасовият край на аспиратора достига дъното на покритата епруветка, за да може да отстрани цялата течност.
7. Измийте епруветките с 2 ml Работен Разтвор за измиване (с изключение на общия брой) и аспирирайте (или прелейте). Избягвайте разпенване по време на добавянето на Работния Разтвор за измиване.
8. Оставете епруветките в изправено положение за две минути и аспирирайте останалите капки течност.
9. Отчетете епруветките в гама брояч за 60 секунди.

XI. ИЗЧИСЛЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

1. Изчислете средното аритметично на резултатите, получени от две по две епруветките.
2. Изчислете свързващата радиоактивност като процент от свързването, определен при нулевата калибрационна точка (0) според следната формула :
3. Използвайки 3 циклична семи-логаритмична или logit-log графична хартия, нанесете (B/B0(%)) стойностите за всяка калибрационна точка

като функция на АНДРОСТЕНДИОН концентрацията на всяка калибрационна точка. Отхвърлете очевидните отклонения..

$$B/B0\ (\%) = \frac{\text{брой (Калибратор и проба)}}{\text{брой (Нулев Калибрато)}} \times 100$$

4. Компютърно асистирани методи също могат да бъдат използвани, за да се построи калибрационната крива. Ако се използва автоматичен метод на обработка на резултатите, се препоръчва подходяща 4-параметрова логистична крива.
5. Чрез интерполация на (B/B0 (%)) стойностите от пробата се определят АНДРОСТЕНДИОН концентрациите на пробите от калибрационната крива.
6. Процентът на общото проследяващо вещество, свързано при липса на ненатоварен АНДРОСТЕНДИОН (B0/T), трябва да се провери за всяко изследване.

XII. ХАРАКТЕРНИ ДАННИ

Данните, изложени по-долу са само за илюстрация и никога не бива да се използват вместо истинската калибрационна крива.

ANDROSTENEDIONE-RIA-CT		cpm	B/Bo (%)
Общ брой		48670	
Калибратор	0,0 ng/ml	14867	100,0
	0,1 ng/ml	13196	88,8
	0,4 ng/ml	9450	63,6
	1,0 ng/ml	5910	39,8
	4,0 ng/ml	2746	18,5
	11,0 ng/ml	987	6,6

XIII. ИЗПЪЛНЕНИЕ И ОГРАНИЧЕНИЯ

А. Определен лимит
Двадесет нулеви калибратора са били изпитани заедно с комплект от други калибратори. Определения лимит, дефиниран като явната концентрация на две стандартни отклонения над средния брой при нулево свързване, е бил 0,03 ng/ml.

В. Специфичност
Специфичността на използваното за това изследване поликлонално антитяло бе определено на базата на радиоимунно изследване (RIA), като съотношение между количеството на андростендиона, предизвикващ 50% инхибиране на свързването на натоварения андростендион, и количеството на съединенията с кръстосана реактивност (аналози), предизвикващи същото инхибиране.

Съединения	Кръстосана реактивност (%)
Андростерон	0,0566
Кортизол	0,0148
Кортикостероид	0,0047
Кортизон	0,0099
DHEA (дехидроепиандростерон)	0,0155
DHEA-SO_4	0,0009
21-деоксикортизон	0,0006
Естрадиол-17β	ND
Естриол	ND
Естрон	0,0270
Етиохоланолон	0,0422
17α-хидроксипрегненолон	ND
17α-хидроксипрогестерон	0,0840
Изоандростерон	0,0112
Прегненолон	ND
Прогестерон	0,0168
Спиронолактон	0,0006
5α-дихидротестостерон	0,0105
Тестостерон	0,2406

Забележка: тази таблица показва кръстосаната реактивност за анти АНДРОСТЕНДИОН
ND : неизмерим

Г. Прецизност

ПО ВРЕМЕ НА ИЗПИТВАНЕТО / МЕЖДУ ИЗПИТВАНЕТО

Серум	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Серум	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	10	0,36 ± 0,02	4,5	A	10	0,42 ± 0,04	9,0
B	10	6,04 ± 0,19	3,2	B	10	1,90 ± 0,11	5,9

SD : Стандартно отклонение; CV: Коефициент на вариация

D. Точност

ТЕСТ С РАЗРЕЖДАНЕ

Проба	Разреждане	Теоретична концентрация (ng/ml)	Измерена концентрация (ng/ml)
A	1/1	-	4,64
	1/2	2,32	2,01
	1/4	1,16	0,97
	1/8	0,58	0,55
	1/16	0,29	0,30
	1/32	0,14	0,20
B	1/1	-	8,94
	1/2	4,47	3,89
	1/4	2,24	2,05
	1/8	1,12	0,98
	1/16	0,56	0,49
	1/32	0,28	0,27
	1/64	0,14	0,18
	1/128	0,07	0,09

Пробите бяха разредени с нулев калибратор

ВЪЗСТАНОВИТЕЛЕН ТЕСТ

Проба	добавен АНДРОСТЕНДИОН (ng/ml)	Възстановен АНДРОСТЕНДИОН (ng/ml)	Възстановен (%)
1	8,0	7,7	96
	4,0	4,0	100
	2,0	1,9	95
	1,0	1,0	100
	0,5	0,4	80

Доколкото ни е известно, за този параметър не съществува международен референтен материал.

Д. Закъснение
Както е показано по-долу, резултатите от изпитването остават точни дори когато пробата е разпределена 24 минути след като калибраторът е бил добавен към покритата епруветка.

Закъснение

Серум (ng/ml)	0'	12'	24'
	0,49	0,55	
	1,96	2,13	
	0,45		0,45
	1,69		2,08

XIV. ВЪТРЕШЕН КАЧЕСТВЕН КОНТРОЛ

- Ако резултатите, получени за Контрола 1 и/или Контрола 2 не са в рамките на нивото, указано на етикета на флакона, то резултатите не могат да бъдат използвани, освен ако не се предостави задоволително обяснение на това несъответствие.
- По желание, всяка лаборатория може да си направи собствен комплект от контролни проби, които трябва да се съхраняват замразени в кратни съотношения.
- Критериите за приемане на разликата от двойните резултати на пробите трябва да се опират на Добрата Лабораторна Практика.

XV. РЕФЕРЕНТНИ ИНТЕРВАЛИ

Стойностите, показани по-долу, са предоставени само за напътствие; всяка лаборатория трябва да установи свои собствен нормален обхват на стойности.

Диапазоните са изразени като процентни стойности: от 2,5% до 97,5%.

Субекти	Брой	Средно аритметично ng/ml	Диапазон
ДЕЦА	25	0,4	0,1 – 0,9
МЪЖЕ	64	2,0	0,5 – 4,8
ЖЕНА	250	2,1	0,5 – 4,7
Фоликуларна фаза	45	1,9	0,9 – 3,0
Овулационен пик	14	2,9	1,9 – 4,7
Лутеинова фаза	27	2,0	1,1 – 4,2
Поликистоза на яйчниците	25	3,6	2,2 – 6,5
След менопауза	45	1,7	0,3 – 3,7

XVI. ПРЕДПАЗНИ МЕРКИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

Безопасност
Само за *in vitro* диагностика.
Този набор съдържа ^{125}I (полуживот: 60 дни), емитиращ йонизиращи X (28 keV) и γ (35.5 keV) лъчения.
Този радиоактивен продукт може да се пренася и да се използва само от оторизирани лица; покупката, съхранението, употребата и размяната на радиоактивни продукти са предмет на законодателството на държавата, на крайния потребител. Този продукт не бива в никакъв случай да се прилага на хора или животни.
Боравенето с радиактивния продукт трябва да се извършва в определена за целта територия, далеч от регулярни зони на преминаване. В лабораторията трябва да се поддържа дневник за получаването и съхранението на радиоактивни материали. Лабораторната екипировка и стъклария, които могат да бъдат контаминирани с радиоактивни субстанции, трябва да бъдат отделени с цел да се избегне кръстосана контаминация с различни радиоизотопи.
Всякакви радиоактивни пръски трябва да се почистват незабавно в съответствие с процедурите за радиационна безопасност. Радиоактивните отпадъци трябва да се изхвърлят, следвайки местните наредби и ръководства на властите, упражнявящи юрисдикцията, над лабораториите. Придържането към основните правила за радиционна безопасност осигуряват адекватна защита.
Човешките кръвни компоненти, включени в кита, са били тестувани чрез одобрени от Европейски и/или FDA (Американска агенция по храните и лекарствата) методи и са дали отрицателен резултат за HbsAg, анти-HCV, анти-HIV-1 и 2. Няма известен метод, който да дава пълна гаранция за това, че човешките кръвни деривати не пренасят хепатит, СПИН или други инфекции. Ето защо, боравенето със реагентите, серумните или плазмените проби трябва да бъде в съответсвие с местните процедури по безопасност.
Всички животински продукти и деривати са били събирани от здрави животни. Волските компоненти са с произход от страни, където BSE (волска серумна енцефалопатия) не е била установявана. Независимо от това, компонентите, съдържащи животински субстанции трябва да се третират като потенциално инфекциозни.
Избягвайте какъвто и да било кожен контакт с реагентите (съдържат натриев азид като консервант). Азидът в този кит може да реагира с оловото и медта във водопроводните инсталации като по този начин се получават силно експлозивни метални азиди. По време на измивния етап, промийте със силна и обилна струя вода канализацията, за да избегнете формирането на азиди.
Не пушете, не пийте, не яжте и не си слагайте козметика в работната територия. Не пипетирайте с уста. Използвайте защитно облекло и ръкавици за еднократна употреба.

XVII. БИБЛИОГРАФИЯ

1. Dorfman RI, Shipley RA : **Androgens.** John Wiley and Sons, New York, pp. 116-128, 1956.
2. Horton R, Tait J : **Androstenedione production and interconversion rates measured in peripheral blood and studies on the possible site of its conversion to testosterone.** J Endocrinol Invest 45:301-313,1966.
3. Pang S, Riddick L : Hirsutism. IN Lifshitz T (ed) : **Pediatric Endocrinology, A Clinical Guide, second edition.** Marcel Dekker, Incl., New York, pp. 259-291, 1990.
4. Cavallo A, Corn C, Bryan GT, Meyer WJ III : **The use of plasma androstenedione in monitoring therapy of patients with congenital adrenal hyperplasia.** J Pediatr 95:33-37, 1979. Bull NY Acad Med 53, 347, 1977
5. Barett-Connor E, Garland C, McPhililips JB, Kaw K-T, Wingard DL : **A prospective, population based study of androstenedione, estrogens and prostate cancer.** Canc res 50:169-173, 1990.
6. Rittmaster RS, Thompson DL : **Effects of leuprolide and esametehasone o hair growth and hormone levels in hirsute women : the relative importance of the ovary and adrenal in the pathogenesis of hirsutism.** J Clin Endocrinol Metab 70:112-116, 1993.
7. Zwicker H, Rittmaster RS : **Androsterone sulfate : Physiology and signifiance in hirsute women.** J Clin Endocrinol Metab 76:112-116, 1993.

XVIII. ОБОБЩЕНИЕ НА ПРОТОКОЛА

	ОБЩА АКТИВНОСТ µl	**КАЛИБРАТОРИ µl**	**ПРОБА (И) КОНТРОЛИ µl**
Калибратори (0-5) Проби, контроли Трейсър	- - 250	25 - 250	- 25 250
Инкубация	1 час на стайна температура при непрекъснато разклащане.		
Сепарация Измиващ разтвор Сепарация	- - -	Аспирирайте 2.0 ml Аспирирайте внимателно	
Броене	Отчетете епруветките за 60 секунди		

DIAsource каталог номер: KIP0451	P.I. номер: 1700460/bu	Номер на ревизия: 110608/1

Дата на ревизия: 2011-06-08

CE

hu

Használat előtt olvassa el a teljes használati utasítást.

ANDROSTENEDIONE-RIA-CT

I. VIZSGÁLAT CÉLJA

Immunradiometriás eljárás emberi vérsavó vagy vérplazma 4-androszten-3,17-dion (androsztendion) tartalmának *in vitro* mennyiségi meghatározására.

II. ÁLTALÁNOS INFORMÁCIÓK

A. Bejegyzett név: DIAsource ANDROSTENEDIONE-RIA-CT Reagenskészlet

B. Katalógusszám: KIP0451 : 96 vizsgálat

C. Gyártó : DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie 8, B-1400 Nivelles, Belgium.

Gyakorlati jellegű vagy rendeléssel kapcsolatos kérdésekkel hívja a következő számot:
Tel : +32 (0)67 88.99.99 Fax : +32 (0)67 88.99.96

III. KLINIKAI HÁTTÉR

A. Élettani szerep

4-Androszten-3,17-dion (androsztendion) egy 19 szénatomot tartalmazó (C_{19}) szteroid, amit a mellékvese és az ivarmirigyek termelnek. Az androsztendionból a szervezetben közvetlenül tesztoszteron, vagy ösztron szintetizálódik, melyek ezután ösztradiollá alakulhatnak át. Mivel az androsztendion 17-oxo csoportot tartalmaz (hidroxil helyett), androgén hatása viszonylag gyenge, a tesztoszteronénak körülbelül 20%-a. Ennek ellenére szintje magasabb lehet a tesztoszteronénál egészséges szervezetben és bizonyos betegségek esetén is. Nőkben az androsztendion a tesztoszteronnál nagyobb mennyiségben termelődik és választódik ki, majd jelentős része a mellékvesén kívül tesztoszteronná alakul. Ráadásul a nemi hormon kötő fehérje (SHBG) affinitása az androsztendionhoz jóval gyengébb, mint a tesztoszteronhoz vagy az ösztradiolhoz (1-3).

Az androsztendion pontos élettani szerepe még nem tisztázott. A vér androsztendion-szintje magzati és újszülött korban magas, a gyermekkor során csökken, majd a pubertás alatt újra megemelkedik. Egészséges pubertás korú és felnőtt férfiakban az androsztendion legnagyobb része a herékben keletkezik, vagy közvetlenül, vagy pedig tesztoszteron átalakításával. Egészséges felnőtt nőkben hasonló mennyiségű androsztendion termelődik a mellékvesékben és a petefészkekben (2, 3). A magasabb androsztendion-szint szerepet játszhat az adrenarche idején a szeméremszőrzet kialakulásában. A vér androsztendion-koncentrációja nagy mértékű napi ingadozást mutat az ACTH (adrenokortikotrop hormon) elválasztásának függvényében. A petefészkek androsztendion-termelését a luteinizáló hormon serkenti, ezért a vér androsztendion-szintje a menstruációs ciklus fázisaival is változik (3). A mellékvesékben az androsztendion termelése a kor előrehaladtával nőkben és férfiakban egyaránt fokozatosan csökken. Menopauza után a petefészkek androsztendion-szintézise is lecsökken (3).

B. Klinikai felhasználás

Az androsztendion szintjének mérése hasznos információt szolgáltat a mellékvese hormonok bioszintéziséről: az androsztendion magas szintje megfigyelhető virilizáló congenitalis mellékvese hyperplasia esetén; a betegség követésére az androsztendion-szint mérése alkalmasabb módszer lehet, mint a 17-hidroxi-progeszteroné, mert kisebb mértékű a napi ingadozása és a glükokortikoid rövid ideig tartó adagolása utáni szuppresszió (4). A vérben az androsztendion szintje emelkedett polycystás ovárium szindróma, a petefészek stromalis hyperthecocisa, 3b-hidroxiszteroid-dehidrogenáz hiány, illetve nők más okból kialakult hirsutismusa esetén is (3,6 & 7). Idiopathiás hirsutismus esetén az androsztendion koncentrációja alapvetően normális. Előfordulhat magas androsztendion-szint virilizáló mellékvese-, és petefészektumorok során is (3). Egy több mint 1000 férfin végzett prospektív vizsgálat dózis-válasz összefüggést mutatott ki az androsztendion és a prosztata-rák kialakulása között (5), de az eredmények megerősítéséhez további vizsgálatok szükségesek.

IV. A MÓDSZER ELVE

Ismert mennyiségű ^{125}I-dal jelölt androsztendion verseng a mintában vagy a kalibrátorban található androsztendionnal a polisztirén csövek falához rögzített ismert mennyiségű ellenanyag kötőhelyeiért. A csöveket egy órán át szobahőmérsékleten rázatva kell inkubálni, majd a folyadékot el kell távolítani. Ekkor a kompetitív reakció leáll. A csöveket ezután át kell mosni 2 ml hígított mosóoldattal, majd a folyadékot ismét el kell távolítani. A kalibrátorok segítségével felrajzolható egy kalibrációs görbe, amiről a minták androsztendion-koncentrációi interpolációval olvashatók le.

V. A REAGENSKÉSZLET TARTALMA

Reagens	Mennyiség 96 mintához	Szín	Feloldás
Anti-androsztendionnal borított csövek	2 x 48	sárga	Használatra **kész**
Ag | **^{125}I** TRACER: ^{125}I-dal jelölt androsztendion (HPLC tisztaságú) szarvasmarha kazeint és azidot tartalmazó pufferben (<0.1%)	1 ampulla 26 ml 111 kBq	piros	Használatra **kész**
CAL | **0** Nulla kalibrátor thymolt tartalmazó emberi vérsavóban	1 ampulla liofilizált	sárga	**Adjon hozzá** 0,5 ml desztillált vizet
CAL | **N** Androsztendion kalibrátorok - N = 1 - 5 (a pontos értékeket l. az ampullák címkéin) thymolt tartalmazó emberi vérsavóban	5 ampulla liofilizált	sárga	**Adjon hozzá** 0,5 ml desztillált vizet
WASH | **SOLN** | **CONC** Mosóoldat (TRIS-HCl)	1 ampulla 10 ml	barna	**Hígítsa** 70 x desztillált vízzel (használjon mágneses keverőt).
CONTROL | **N** Kontrollok - N = 1 vagy 2 thymolt tartalmazó emberi vérsavóban	2 ampulla liofilizált	ezüst	**Adjon hozzá** 0,5 ml desztillált vizet

Megjegyzés : Minták hígításához használja a nulla kalibrátort.

VI. A FELHASZNÁLÓ ÁLTAL BIZTOSÍTOTT ESZKÖZÖK

A következő eszközöket a készlet nem tartalmazza, de szükségesek a vizsgálat elvégzéséhez:

1. Desztillált víz
2. Pipetták: 25 µl, 250 µl, 500 µl és 2 ml beméréséhez (ajánlott pontos pipetták és eldobható műanyag pipettahegyek használata)
3. Vortex
4. Mágneses keverő
5. Rázógép (400 rpm)
6. 5 ml automata fecskendő (Cornwall) a mosáshoz
7. Vízlégszivattyú (választható)
8. Bármely, ^{125}I mérésére alkalmas gamma-sugárzásmérő (minimális hozam 70%).

VII. REAGENSEK ELŐKÉSZÍTÉSE

A. **Kalibrátorok** : Oldja fel a kalibrátorokat 0.5 ml desztillált vízben
B. **Kontrollok** Oldja fel a kontrollokat 0.5 ml desztillált vízben.
C. **Hígított mosóoldat**: Készítsen megfelelő mennyiségű hígított mosóoldatot úgy, hogy 69 rész desztillált vízhez 1 rész mosóoldatot (70x) kever. Homogenizálja mágneses keverő segítségével. A napi vizsgálatok végeztével öntse ki a megmaradt hígított mosóoldatot.

VIII. A REAGENSEK TÁROLÁSA ÉS ELTARTHATÓSÁGA

- Felnyitás és feloldás nélkül a reagensek 2-8°C-on tárolva a címkén feltüntetett időpontig eltarthatók.
- Feloldás után a kalibrátorok és kontrollok 2-8°C-on egy hétig, több csőbe szétosztva -20°C-on lefagyasztva legfeljebb 3 hónapig eltarthatók. Kerülje a többszöri lefagyasztást és felolvasztást.
- A frissen készült hígított mosóoldatot még aznap fel kell használni.
- Amennyiben felnyitás után a tracert az eredeti, jól lezárt ampullában 2-8°C-on tárolja, akkor a címkén feltüntetett időpontig eltartható.
- A reagensek fizikai tulajdonságainak megváltozása valószínűleg azt jelzi, hogy megromlottak.

IX. MINTAVÉTEL ÉS ELŐKÉSZÍTÉS

- Tárolja a vérsavó vagy vérplazma mintákat 2-8°C-on.
- Amennyiben nem végzi el a vizsgálatot 24 órán belül, ajánlott a mintákat -20°C-on szétosztva tárolni.
- Kerülje a minták többszöri lefagyasztását és felolvasztását.
- Savó és plazma minták hasonló eredményt adnak:
  Y (Hep.-os plazma) = 0.94 x (savó) + 0.02 r = 0.98 n = 17
  Y (EDTA-s plazma) = 1.01 x (savó) – 0.03 r = 0.95 n = 17

X. ELJÁRÁS

A. Tudnivalók

Ne használja a reagenseket a lejárati idejükön túl. Ne keverjen össze eltérő gyártási számú reagenskészletekből származó anyagokat. Használat előtt várja meg, amíg a reagensek szobahőmérsékletre melegednek.
Óvatos mozgatással vagy keveréssel alaposan homogenizálja a reagenseket. Minden reagens és minta beméréséhez használjon tiszta eldobható pipettahegyet, hogy elkerülje az anyagok beszennyeződését.
Nagypontosságú pipetták, vagy automata pipettázó készülék használata javítja a vizsgálat pontosságát. Tartsa be a megadott inkubációs időket.
Minden vizsgálathoz készítsen új kalibrációs görbét, ne használja korábbi mérések adatait.

B. A vizsgálat menete

1. Feliratozzon 2-2 csövet a kalibrátorok, a minták és a kontrollok számára. A teljes radioaktivitás méréséhez használjon 2 reagens nélküli csövet (totálok).
2. Rövid vortexelés után mérjen 25 µl-t a kalibrátorokból, kontrollokból és mintákból a megfelelő csövekbe.
3. Mérjen 250 µl tracert minden csőbe (a totálokba is).
4. Kézzel óvatosan rázza meg a kémcsőállványt, hogy a csövekben maradt levegőbuborékok eltávozzanak.
5. Folyamatos rázatás mellett inkubálja a csöveket szobahőmérsékleten 1 órán át.
6. Szívja le (vagy öntse le) a csövek tartalmát (kivéve a totálok). Ügyeljen, hogy a vízlégszivattyú műanyag hegye leérjen a csövek aljáig, és így az összes folyadékot eltávolítsa.
7. Mossa a csöveket 2 ml hígított mosóoldattal (kivéve a totálokat), majd távolítsa el a folyadékot. Vigyázzon, hogy a mosóoldat beméréskor ne habosodjon.
8. Hagyja állni a csöveket 2 percig, majd távolítsa el a megmaradt folyadékcseppet.
9. Mérje a radioaktivitást gamma-sugárzásmérővel 60 másodpercig.

XI. EREDMÉNYEK KISZÁMÍTÁSA

1. Számolja ki a párhuzamos mérések átlagát.
2. Számítsa ki a megkötött radioaktivitás százalékos értékét a nulla kalibrátorra kapott eredmény felhasználásával az alábbi képlet alapján:

   B/B0 % = [kontroll vagy minta cpm / B0 (nulla kalibrátor) cpm] x 100

3. Féllogaritmikus vagy logit-log milliméterpapíron ábrázolja a kalibrátorok B/B0(%) értékeit a hozzájuk tartozó androsztendion-koncentrációk függvényében. Hagyja figyelmen kívül a nyilvánvalóan kieső értékeket.
4. Számítógép segítségével is felrajzolható a kalibrációs görbe. Ez esetben használjon 4-paraméteres logisztikus görbeillesztést.
5. A kalibrációs görbe alapján határozza meg a minták androsztendion-koncentrációját B/B0(%) értékeik interpolációjával.
6. Minden vizsgálat során határozza meg a jelöletlen androsztendion nélkül bekötődő tracer százalékos mennyiségét (B0/T).

XII. JELLEMZŐ MÉRÉSI EREDMÉNYEK

A következő adatok csak példaként szolgálnak, soha ne használja őket a valós idejű kalibráció helyett.

ANDROSTENEDIONE-RIA-CT		cpm	B/Bo (%)
Teljes radioaktivitás		48670	
Kalibrátor	0.0 ng/ml	14867	100.0
	0.1 ng/ml	13196	88.8
	0.4 ng/ml	9450	63.6
	1.0 ng/ml	5910	39.8
	4.0 ng/ml	2746	18.5
	11.0 ng/ml	987	6.6

XIII. A VIZSGÁLAT JELLEMZŐI ÉS KORLÁTAI

A. A kimutathatóság alsó határa

Húsz nulla kalibrátort vizsgáltak meg más kalibrátorokkal együtt.
A kimutathatóság alsó határa 0,03 ng/ml-nek bizonyult, ami a nulla kalibrátor cpm értékeinek átlagából számolható ki a standard deviáció kétszeresének levonásával.

B. Specificitás

A reagenskészletben használt poliklonális ellenanyagok specificitását RIA módszerrel határozták meg úgy, hogy kiszámolták a jelölt androsztendion bekötődését 50%-ban gátló androsztendion-mennyiségnek, és az azonos mértékű gátlást okozó keresztreagáló vegyületek (analógok) mennyiségének hányadosát.

Vegyület	Keresztreaktivitás (%)
Androszteron	0.0566
Kortizol	0.0148
Kortikoszteron	0.0047
Kortizon	0.0099
DHEA	0.0155
DHEA-SO_4	0.0009
21-deoxikortizon	0.0006
17β–Ösztradiol	NK
Ösztriol	NK
Ösztron	0.0270
Etiocholanolone	0.0422
17α-hidroxipregnenolon	NK
17α-hidroxiprogeszteron	0.0840
Izoandroszteron	0.0112
Pregnenolon	NK
Progeszteron	0.0168
Spironolakton	0.0006
5α-dihidroteszteron	0.0105
Tesztoszteron	0.2406

Megjegyzés: A fenti táblázat anti-androsztendion keresztreaktivitását mutatja
N.K.: nem kimutatható

C. Reprodukálhatóság

VIZSGÁLATON BELÜLI VIZSGÁLATOK KÖZÖTTI

Savó	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Savó	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	10	0.36 ± 0.02	4.5	A	10	0.42 ± 0.04	9.0
B	10	6.04 ± 0.19	3.2	B	10	1.90 ± 0.11	5.9

SD: standard deviáció; CV: variációs koefficiens

D. Pontosság

HÍGÍTÁSI VIZSGÁLAT

Minta	Hígítás	Elméleti koncentráció (ng/ml)	Mért koncentráció (ng/ml)
1. vérsavó			
	1/1	-	4.64
	1/2	2.32	2.01
	1/4	1.16	0.97
	1/8	0.58	0.55
	1/16	0.29	0.30
	1/32	0.14	0.20
2. vérsavó			
	1/1	-	8.94
	1/2	4.47	3.89
	1/4	2.24	2.05
	1/8	1.12	0.98
	1/16	0.56	0.49
	1/32	0.28	0.27
	1/64	0.14	0.18
	1/128	0.07	0.09

A minták hígítása a nulla kalibrátorral történt.

VISSZANYERÉS

Minta	Hozzáadott androsztendion (ng/ml)	Visszanyert androsztendion (ng/ml)	Visszanyerés (%)
Vérsavó	8.0	7.7	96
	4.0	4.0	100
	2.0	1.9	95
	1.0	1.0	100
	0.5	0.4	80

Ismereteink szerint jelenleg nem létezik nemzetközi referencia anyag ennek a paraméternek a vizsgálatára.

E. Az utolsó kalibrátor és a minták bemérése között eltelt idő

Ahogy ezt az alábbi adatok is mutatják, a vizsgálat eredményeit nem befolyásolja, ha egy minta bemérése akár 24 perccel az utolsó kalibrátor után történik.

ELTELT IDŐ

Vérsavó (ng/ml)	0'	12'	24'
	0.49	0.55	
	1.96	2.13	
	0.45		0.45
	1.69		2.08

XIV. BELSŐ MINŐSÉGELLENŐRZÉS

- Ha a kontroll 1-re és 2-re kapott eredmények kívül esnek az ampullák címkéin feltüntetett tartományon, a vizsgálat eredményei nem használhatók fel, kivéve, ha ismert az eltérés pontos oka.
- Igény esetén bármely laboratórium készíthet egy saját, kontrollként szolgáló savó-poolt, amit azután szétosztva, lefagyasztva kell tárolni.
- A párhuzamos vizsgálatok eredményei közötti eltérés elfogadható mértékét a GLP (Good Laboratory Practises) alapján kell meghatározni.

XV. REFERENCIATARTOMÁNY

Az alábbi értékek csak irányadó jellegűek, minden laboratóriumnak meg kell határoznia saját referenciatartományát.
Az referenciatartomány a 2,5%-os és a 97,5%-os percentilis értékek közé esik.

Vizsgált csoport	N	Átlag ng/ml	Tartomány
GYERMEKEK	25	0.4	0.1 – 0.9
FÉRFIAK	64	2.0	0.5 – 4.8
NŐK	250	2.1	0.5 – 4.7
Follicularis fázis	45	1.9	0.9 – 3.0
Ovuláció	14	2.9	1.9 – 4.7
Lutealis fázis	27	2.0	1.1 – 4.2
Polycystás ovárium szindróma	25	3.6	2.2 – 6.5
Postmenopauza	45	1.7	0.3 – 3.7

XVI. MUNKAVÉDELEM

Biztonsági előírások

Csak in vitro diagnosztikai felhasználásra.
A kit röntgen (28 keV) és gamma (35.5 keV) sugárzó ^{125}I izotópot (felezési idő: 60 nap) tartalmaz.
A reagenskészletben található radioaktív anyagot csak arra jogosult személyek vehetik át és használhatják fel. Radioaktív termékek beszerzésére, tárolására, használatára, és cseréjére az adott ország törvényei érvényesek. A reagensek alkalmazása embereken és állatokon is minden körülmények között tilos.
Minden, radioaktív reagenssel végzett műveletet egy arra kijelölt, elkülönített helyen kell elvégezni. A laboratóriumba érkezett radioaktív anyagok átvételéről és tárolásáról vezetett jegyzőkönyvet a laboratórium területén kell tartani. Azokat a laboratóriumi eszközöket és üvegedényeket, amelyek radioaktív anyaggal szennyeződhettek, különítse el, hogy elkerülje a különböző radioizotópokkal történő keresztszennyeződést.

Amennyiben bármilyen radioaktív anyag kiömlik, azonnal takarítsa fel az erre vonatkozó előírásoknak megfelelő módon. A keletkező radioaktív hulladékot a helyi szabályoknak és az illetékes hatóságok erre vonatkozó útmutatásának megfelelően kell kidobni. Ha betartja a radioaktív anyagok kezelésére vonatkozó alapvető szabályokat, megfelelően védett lesz a sugárfertőzéstől.
A készlet emberi vérből készült reagenseit európai szabványok szerinti és/vagy az FDA által minősített módszerrel HBsAg-tól, valamint anti-HCV, és anti-HIV-1 és 2 ellenanyagoktól mentesnek találták. Azonban egyetlen ma ismert módszer alapján sem állítható biztosan, hogy az emberi vérből készült anyagok nem okozhatnak hepatitist, AIDS-et vagy más fertőző betegséget. Ezért minden ilyen reagenst és minden savó-, illetve plazmamintát a fertőző anyagokra vonatkozó helyi biztonsági előírásoknak megfelelően kell kezelni.
Minden állati eredetű reagens és termék egészséges állatokból származik. A szarvasmarha eredetű reagensek olyan országokból származnak, ahonnan eddig nem jelentettek BSE esetet. Ennek ellenére minden állati eredetű anyagot tartalmazó reagenst potenciálisan fertőzésveszélyesként kell kezelni.
Vigyázzon, hogy a reagensek bőrre ne kerüljenek (tartósítószer: nátrium-azid). A reagensekben található nátrium-azid robbanásveszélyes fém-azidokat képezhet ólom és réz csővezetékek anyagával. A csövek mosásakor nagy mennyiségű vízzel együtt öntse ki ezeket az anyagokat, hogy megelőzze az azid felgyülemlését.
Ne dohányozzon, ne fogyasszon ételt vagy italt, illetve ne használjon kozmetikumokat a laboratóriumban. Ne pipettázzon szájjal. Munka közben viseljen laborköpenyt és egyszer használatos kesztyűt.

XVII. IRODALOM

1. Dorfman RI, Shipley RA : **Androgens.** John Wiley and Sons, New York, pp. 116-128, 1956.

2. Horton R, Tait J : **Androstenedione production and interconversion rates measured in peripheral blood and studies on the possible site of its conversion to testosterone.** J Endocrinol Invest 45:301-313,1966.

3. Pang S, Riddick L : Hirsutism. IN Lifshitz T (ed) : **Pediatric Endocrinology, A Clinical Guide, second edition.** Marcel Dekker, Incl., New York, pp. 259-291, 1990.

4. Cavallo A, Corn C, Bryan GT, Meyer WJ III : **The use of plasma androstenedione in monitoring therapy of patients with congenital adrenal hyperplasia.** J Pediatr 95:33-37, 1979. Bull NY Acad Med 53, 347, 1977

5. Barett-Connor E, Garland C, McPhililips JB, Kaw K-T, Wingard DL : **A prospective, population based study of androstenedione, estrogens and prostate cancer**. Canc res 50:169-173, 1990.

6. Rittmaster RS, Thompson DL : **Effects of leuprolide and esametehasone o hair growth and hormone levels in hirsute women : the relative importance of the ovary and adrenal in the pathogenesis of hirsutism.** J Clin Endocrinol Metab 70:112-116, 1993.

7. Zwicker H, Rittmaster RS : **Androsterone sulfate : Physiology and signifiance in hirsute women.** J Clin Endocrinol Metab 76:112-116, 1993.

XVIII. AZ ELJÁRÁS ÖSSZEFOGLALÁSA

	Totálok µl	**Kalibrátorok µl**	**Minták, kontrollok µl**
Kalibrátorok (0-5) Minták, kontrollok Tracer	- - 250	25 - 250	- 25 250
Inkubáció	1 óra szobahőmérsékleten folyamatos rázatással		
Folyadék eltávolítása Hígított mosóoldat Folyadék eltávolítása	-	Leszívás 2.0 ml Óvatos leszívás	
Mérés	Radioaktivitás mérése 60 másodpercig		

DIAsource Katalógusszám :	P.I. Szám :	Verziószám :
KIP0451	1700460/hu	110608/1

Frissitès idõpontja : 2011-06-08

	Used symbols
	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	Immunoadsorbent
DIL CAL	Calibrator diluent
REC SOLN	Reconstitution solution
PEG	Polyethylene glycol
EXTR SOLN	Extraction solution
ELU SOLN	Elution solution
GEL	Bond Elut Silica cartridges
PRE SOLN	Pre-treatment solution
NEUTR SOLN	Neutralization solution
TRACEUR BUF	Tracer buffer
	Microtiterplate
Ab HRP	HRP Conjugate
Ag HRP	HRP Conjugate
Ab HRP CONC	HRP Conjugate concentrate
Ag HRP CONC	HRP Conjugate concentrate
CONJ BUF	Conjugate buffer
CHROM TMB CONC	Chromogenic TMB concentrate
CHROM TMB	Chromogenic TMB solution
SUB BUF	Substrate buffer
STOP SOLN	Stop solution
INC SER	Incubation serum
BUF	Buffer
Ab AP	AP Conjugate
SUB PNPP	Substrate PNPP
BIOT CONJ CONC	Biotin conjugate concentrate
AVID HRP CONC	Avidine HRP concentrate
ASS BUF	Assay buffer
Ab BIOT	Biotin conjugate
Ab	Specific Antibody
SAV HRP CONC	Streptavidin HRP concentrate
NSB	Non-specific binding
2nd Ab	2nd Antibody
ACID BUF	Acidification Buffer
DIST	Distributor

	Symboles utilisés
	Consulter les instructions d'utilisation
	Température de conservation
	Utiliser jusque
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	Immunoadsorbant
DIL CAL	Diluant de calibrateur
REC SOLN	Solution de reconstitution
PEG	Glycol Polyéthylène
EXTR SOLN	Solution d'extraction
ELU SOLN	Solution d'elution
GEL	Cartouches Bond Elut Silica
PRE SOLN	Solution de pré-traitement
NEUTR SOLN	Solution de neutralisation
TRACEUR BUF	Tampon traceur
	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

	Gebruikte symbolen
	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	Immunoadsorbent
DIL | CAL	Kalibratorverdunner
REC | SOLN	Reconstitutieoplossing
PEG	Polyethyleen glycol
EXTR | SOLN	Extractieoplossing
ELU | SOLN	Elutieoplossing
GEL	Bond Elut Silica kolom
PRE | SOLN	Pre-behandelingsoplossing
NEUTR | SOLN	Neutralisatieoplossing
TRACEUR | BUF	Tracerbuffer
	Microtiterplaat
Ab | HRP	HRP Conjugaat
Ag | HRP	HRP Conjugaat
Ab | HRP | CONC	HRP Conjugaat geconcentreerd
Ag | HRP | CONC	HRP Conjugaat geconcentreerd
CONJ | BUF	Conjugaat buffer
CHROM | TMB | CONC	Chromogene TMB geconcentreerd
CHROM | TMB	Chromogene Oplossing TMB
SUB | BUF	Substraatbuffer
STOP | SOLN	Stopoplossing
INC | SER	Incubatieserum
BUF	Buffer
Ab | AP	AP Conjugaat
SUB | PNPP	Substraat PNPP
BIOT | CONJ | CONC	Geconcentreerd Biotine conjugaat
AVID | HRP | CONC	Geconcentreerd Avidine-HRP conjugaat
ASS | BUF	Assay buffer
Ab | BIOT	Biotine conjugaat
Ab	Specifiek antilichaam
SAV | HRP | CONC	Streptavidine-HRP concentraat
NSB	Aspecifieke binding
2nd Ab	2de antilichaam
ACID | BUF	Verzuringsbuffer

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

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

	Símbolos utilisados
	Consultar las instrucciones de uso
	Limitación de temperatura
	Fecha de caducidad
LOT	Codigo 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
	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

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

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

	Stosowane symbole
	Przed zastosowaniem zapoznać się z instrukcją
	Temperatura przechowywania
	Zużyć przed
LOT	Kod serii
REF	Numer katalogowy
CONTROL	Kontrola
I V D	Urządzenie medyczne do diagnostyki in vitro
	Producent
	Zawartość wystarczająca do <n> testów
WASH SOLN CONC	Roztwór płuczący stężony
CAL 0	Kalibrator zerowy
CAL N	Kalibrator nr
CONTROL N	Kontrola nr
Ag 125I	Znacznik izotopowy
Ab 125I	Znacznik izotopowy
Ag 125I CONC	Znacznik izotopowy stężony
Ab 125I CONC	Znacznik izotopowy stężony
	Probówki
INC BUF	Wymagana inkubacja buforu
ACETONITRILE	Acetonitryl
SERUM	Surowica
DIL SPE	Rozcieńczalnik próbki
DIL BUF	Bufor do rozcieńczania
ANTISERUM	Antysurowica
IMMUNOADSORBENT	Immunoadsorbent
DIL CAL	Rozcieńczalnik kalibratora
REC SOLN	Roztwór do rozcieńczania
PEG	Glikol poli(oksy)etylenowy
EXTR SOLN	Roztwór ekstrakcyjny
ELU SOLN	Roztwór elucyjny
GEL	Kolumny krzemionkowe Bond Elut
PRE SOLN	Roztwór do przygotowania wstępnego
NEUTR SOLN	Roztwór neutralizujący
TRACEUR BUF	Bufor znacznika
	mikropłytka
Ab HRP	Koniugat peroksydazy chrzanowej
Ag HRP	Koniugat peroksydazy chrzanowej
Ab HRP CONC	Koncentrat koniugatu peroksydazy chrzanowej
Ag HRP CONC	Koncentrat koniugatu peroksydazy chrzanowej
CONJ BUF	Bufor do koniugacji
CHROM TMB CONC	Koncentrat chromogenu TMB (czterometylobenzydyny)
CHROM TMB	Roztwór chromogenu TMB (czterometylobenzydyny)
SUB BUF	Bufor substratu
STOP SOLN	Roztwór zatrzymujący reakcję
INC SER	Wymagana inkubacja surowicy
BUF	Bufor
Ab AP	Koniugat AP (fosfatazy alkalicznej)
SUB PNPP	p-nitrofenylofosforan substratowy
BIOT CONJ CONC	Koncentrat koniugatu biotyny
AVID HRP CONC	Koncentrat peroksydazy chrzanowej z awidyną
ASS BUF	Bufor do oznaczania
Ab BIOT	Koniugatu biotyny
Ab	Przeciwciało swoiste
SAV HRP CONC	Koncentrat streptawidyny HRP
NSB	Wiązanie nieswoiste
2nd Ab	Drugie przeciwciało
ACID BUF	Bufor zakwaszający

	Използвани символи
	Вижте инструкцията за работа
	Температура на съхранение
	Използвайте с
LOT	Партиден код
REF	Каталожен номер
CONTROL	Контрол
I V D	Ин витро диагностично медицинско изделие
	Производител
	Съдържание достатъчно за <n> теста
WASH SOLN CONC	Концентриран измиващ разтвор
CAL 0	Нулев калибратор
CAL N	Калибратор #
CONTROL N	Контрол #
Ag 125I	Трейсър
Ab 125I	Трейсър
Ag 125I CONC	Концентриран маркер
Ab 125I CONC	Концентриран маркер
	Епруветки
INC BUF	Инкубационен буфер
ACETONITRILE	Ацетонитрил
SERUM	Серум
DIL SPE	Разредител за пробите
DIL BUF	Буфер за разреждане
ANTISERUM	Антисерум
IMMUNOADSORBENT	Имуноабсорбент
DIL CAL	Разредител за калибратора
REC SOLN	Пресъздаващ разтвор
PEG	Полиетилен гликол
EXTR SOLN	Екстрактов разтвор
ELU SOLN	Разтвор за елюиране
GEL	Силикагелни пълнители
PRE SOLN	Пред-лечебен разтвор
NEUTR SOLN	Неутрализиращ ратвор
TRACEUR BUF	Маркерен буфер
	Микротитърна пластина
Ab HRP	HRP конюгат / Конюгат на хрянова пероксидаза
Ag HRP	HRP конюгат / Конюгат на хрянова пероксидаза
Ab HRP CONC	HRP конюгиран концентрат
Ag HRP CONC	HRP конюгиран концентрат
CONJ BUF	Буфер за конюгата
CHROM TMB CONC	Хромогенен TMB концентрат
CHROM TMB	Хромогенен TMB разтвор
SUB BUF	Субстратен буфер
STOP SOLN	Стоп разтвор
INC SER	Инкубационен серум
BUF	Буфер
Ab AP	AP конюгат / конюгат на алкална фосфатаза
SUB PNPP	Субстрат PNPP / пара нитрофенил фосфат
BIOT CONJ CONC	Биотин конюгиран концентрат
AVID HRP CONC	Авидин HRP концентрат
ASS BUF	Буфер за пробите
Ab BIOT	Биотин конюгат
Ab	специфично антитяло
SAV HRP CONC	стрептавидин HRP концентрат
NSB	не специфично свързване
2nd Ab	второ антитяло
ACID BUF	киселинизиращ буфер

	Használt szimbólumok
	Olvassa el a használati útmutatót
	Tárolási hőmérséklet
	Lejárati idő
LOT	Gyártási kód
REF	Katalógus szám
CONTROL	Kontrol
I V D	In vitro diagnosztikai eszköz
	Gyártó
	Tartalma <n> teszt elvégzésére elegendő
WASH SOLN CONC	Mosó folyadék koncentrátum
CAL 0	Zero kalibrátor
CAL N	Kalibrátor #
CONTROL N	Kontrol #
Ag 125I	Nyomjelző izotóp
Ab 125I	Nyomjelző izotóp
Ag 125I CONC	Nyomjelző izotóp koncentrátum
Ab 125I CONC	Nyomjelző izotóp koncentrátum
	Csövek
INC BUF	Inkubáló puffer
ACETONITRILE	Acetonitril
SERUM	Szérum
DIL SPE	Mintahigító
DIL BUF	Higító puffer
ANTISERUM	Antiszérum
IMMUNOADSORBENT	Immunadszorbens
DIL CAL	Kalibrátor higító
REC SOLN	Mintaelőkészítő oldat
PEG	Polietilén glikol
EXTR SOLN	Extrakciós oldat
ELU SOLN	Eluáló oldat
GEL	Bond Elut Silica szilikagél patronok
PRE SOLN	Előkezelő oldat
NEUTR SOLN	Semlegesítő oldat
TRACEUR BUF	Nyomjelző izotóp higító puffer
	Mikrotiter lemez
Ab HRP	HRP konjugátum
Ag HRP	HRP konjugátum
Ab HRP CONC	HRP konjugátum koncentrátum
Ag HRP CONC	HRP konjugátum koncentrátum
CONJ BUF	Konjugátum puffer
CHROM TMB CONC	Kromogén TMB koncentrátum
CHROM TMB	Kromogén TMB oldat
SUB BUF	Szubsztrát puffer
STOP SOLN	Stop oldat
INC SER	Inkubációs szérum
BUF	Puffer
Ab AP	AP konjugátum
SUB PNPP	Szubsztrát PNPP
BIOT CONJ CONC	Biotin konjugátum koncentrátum
AVID HRP CONC	Avidin HRP koncentrátum
ASS BUF	Vizsgálati puffer
Ab BIOT	Biotin konjugátum
Ab	Specifikus ellenanyag
SAV HRP CONC	Sztreptavidin HRP koncentrátum
NSB	Nem-specifikus kötődés
2nd Ab	Másodlagos ellenanyag
ACID BUF	Savas puffer