



# **3 $\alpha$ -Diol G-RIA-CT**

***KIP0151***

**Distributed By:**



Immuno-Biological Laboratories, Inc. (IBL-America)  
8201 Central Ave. NE, Suite P  
Minneapolis, Minnesota 55432, USA  
Phone: (888) 523-1246  
Fax.: (763) 780-2988  
Email: [info@ibl-america.com](mailto:info@ibl-america.com)  
Web: [www.ibl-america.com](http://www.ibl-america.com)

---

**LOT** : 110706/1



Read entire protocol before use.

## 3 $\alpha$ -Diol G-RIA-CT

### I. INTENDED USE

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

### II. GENERAL INFORMATION

- A. **Proprietary name :** DIAsource 3 $\alpha$ -Diol G-RIA-CT Kit
- B. **Catalog number :** KIP0151 : 96 tests
- C. **Manufactured by :** DIAsource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

**For technical assistance or ordering information contact :**  
Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.90

### III. CLINICAL BACKGROUND

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

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

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


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

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

#### IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

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

#### V. REAGENTS PROVIDED

| Reagents   | 96 Test Kit      | Colour Code      | Reconstitution             |                 |                            |  |
|--|------------------|------------------|----------------------------|-----------------|----------------------------|--|
|  Tubes coated with anti 3 $\alpha$ -Diol G  | 2 x 48           | grey             | Ready for use              |                 |                            |  |
| <table border="1" data-bbox="119 622 255 676"><tr><td>Ag</td><td><math>^{125}\text{I}</math></td></tr></table><br>TRACER: $^{125}\text{I}$ Iodine labelled 3 $\alpha$ -Diol G (HPLC grade) in buffer with bovine casein (1%) and azide (<0.1%) | Ag               | $^{125}\text{I}$ | 1 vial<br>53 ml<br>185 kBq | Red             | Ready for use              |  |
| Ag   | $^{125}\text{I}$ |                  |                            |                 |                            |  |
| <table border="1" data-bbox="119 801 255 855"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table><br>Zero calibrator in bovine serum, thymol (<0.1%) and gentamycin (<0.1%)  | CAL              | 0                | 1 vial<br>lyophilized      | yellow          | Add 2 ml distilled water   |  |
| CAL  | 0                |                  |                            |                 |                            |  |
| <table border="1" data-bbox="119 922 255 976"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table><br>Calibrators 3 $\alpha$ -Diol G - N = 1 to 5 (see exact values on vial labels) in bovine serum, thymol (<0.1%) and gentamycin (<0.1%)                  | CAL              | N                | 5 vials<br>lyophilized     | yellow          | Add 0.5 ml distilled water |  |
| CAL  | N                |                  |                            |                 |                            |  |
| <table border="1" data-bbox="76 1093 319 1146"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table><br>Wash solution (Phosphate Buffer)  | WASH             | SOLN             | CONC                       | 1 vial<br>50 ml | brown                      | Dilute 25 x with distilled water (use a magnetic stirrer). |
| WASH   | SOLN             | CONC             |                            |                 |                            |  |
| <table border="1" data-bbox="76 1205 279 1258"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table><br>Controls - N = 1 or 2 in human serum and thymol (<0.1%).   | CONTROL          | N                | 2 vials<br>lyophilized     | silver          | Add 0.5 ml distilled water |  |
| CONTROL  | N                |                  |                            |                 |                            |  |

**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: 100  $\mu\text{l}$ , 500  $\mu\text{l}$  and 2 ml (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
3. Vortex mixer
4. Magnetic stirrer
5. Tubes shaker (700 rpm)
6. 5 ml automatic syringe (Cornwall type) for washing
7. Aspiration system (optional)
8. Any gamma counter capable of measuring  $^{125}\text{I}$  may be used (minimal yield 70%).

#### VII. REAGENT PREPARATION

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

#### VIII. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

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

#### IX. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- Serum or plasma samples must be kept at 2-8°C.
- If the test is not run within 24 hrs., storage at -20°C is recommended.
- Avoid successive freezing and thawing.
- Heparinized plasma yields 15 % lower results than serum :  
 $Y (\text{Hep. plasma}) = 0.86 \times (\text{serum}) + 0.52 \quad r = 0.96 \quad n = 13$
- EDTA plasma yields 25 % lower results than serum :  
 $Y (\text{EDTA plasma}) = 0.74 \times (\text{serum}) + 0.52 \quad r = 0.97 \quad n = 13$

#### X. PROCEDURE

##### A. Handling notes

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

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

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

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

##### B. Procedure

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

#### XI. CALCULATION OF RESULTS

1. Calculate the mean of duplicate determinations, reject obvious outliers.
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 3 $\alpha$ -Diol G concentration of each calibrator point.
4. Computer assisted methods can also be used to construct the calibration curve. If automatic result processing is to be used with results, "4 parameters" function curve fitting is recommended.
5. By interpolation of the sample (B/B0(%)) values, determine the 3 $\alpha$ -Diol G concentrations of the samples from the reference curve.
6. For each assay, the percentage of total tracer bound in the absence of unlabelled 3 $\alpha$ -Diol G (B0/T) must be checked.

### XII. TYPICAL DATA

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

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

### XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

#### A. Detection limit

Twenty zero calibrators were assayed along with a set of other calibrators.

The detection limit, defined as the apparent concentration two standard deviations below the average counts at zero binding, was 0.05 ng/ml.

#### B. Specificity

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

Note : this table shows the cross-reactivity for the anti 3 $\alpha$ -Diol G.

#### C. Precision

##### INTRA-ASSAY PRECISION

##### INTER-ASSAY PRECISION

| Serum | N  | <X> $\pm$ SD (ng/ml) | CV (%) | Serum | N  | <X> $\pm$ SD (ng/ml) | CV (%) |
|-------|----|----------------------|--------|-------|----|----------------------|--------|
| A     | 20 | 2.64 $\pm$ 0.15      | 5.7    | A     | 10 | 2.76 $\pm$ 0.17      | 6.4    |
| B     | 20 | 10.11 $\pm$ 0.50     | 4.9    | B     | 10 | 10.32 $\pm$ 0.70     | 7.2    |

SD : Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

#### D. Accuracy

##### DILUTION TEST

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

Samples were diluted with the zero calibrator.

##### RECOVERY TEST

| Sample | added 3 $\alpha$ -Diol G (ng/ml) | Recovered 3 $\alpha$ -Diol G (ng/ml) | Recovered (%) |
|--------|----------------------------------|--------------------------------------|---------------|
| Serum  | 50                               | 48.4                                 | 96.8          |
|        | 20                               | 21.3                                 | 106.0         |
|        | 10                               | 9.5                                  | 95.0          |
|        | 5                                | 4.9                                  | 98.0          |

#### E. Time delay between last calibrator and sample dispensing

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

##### TIME DELAY

| Serum (ng/ml) | 0'   | 20'  |
|---------------|------|------|
| Serum 1       | 2.92 | 2.90 |
| Serum 2       | 9.60 | 9.59 |

### XIV. INTERNAL QUALITY CONTROL

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

### XV. REFERENCE INTERVALS

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

### XVI. PRECAUTIONS AND WARNINGS

#### Safety

For in vitro diagnostic use only.

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

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

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

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

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

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

**XVII. BIBLIOGRAPHY**

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

**XVIII. SUMMARY OF THE PROTOCOL**

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

|                                     |                             |                           |
|-------------------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| DIAsource Catalogue Nr :<br>KIP0151 | P.I. Number :<br>1701001/en | Revision nr :<br>110706/1 |
|-------------------------------------|-----------------------------|---------------------------|

Revision date : 2011-07-06



Lire entièrement le protocole avant utilisation.

## 3 $\alpha$ -Diol G-RIA-CT

### I. BUT DU DOSAGE

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

### II. INFORMATIONS GENERALES

- A. **Nom du produit :** DIAsource 3 $\alpha$ -Diol G-RIA-CT kit
- B. **Numéro de catalogue:** KIP0151 : 96 tests
- C. **Fabriqué par :** DIAsource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgique.

**Pour une assistance technique ou une information sur une commande :**  
Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.90

### III. CONTEXTE CLINIQUE

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

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

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


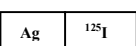
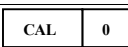

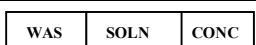
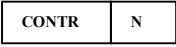
Les détections de la 3 $\alpha$ -Diol G ont de cette manière été prouvées être très utiles en tant qu'indicateurs dans différentes circonstances comme le suivi des progrès au cours du traitement de l'hirsutisme idiopathique et pour les femmes présentant des ovaires polycystiques.

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

#### IV. PRINCIPES DU DOSAGE

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

#### V. REACTIFS FOURNIS

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

**Note :** Utiliser le calibrateur "0" pour la dilution des échantillons.

#### VI. MATERIELS NON FOURNIS

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

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

#### VII. PREPARATION DES REACTIFS

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

#### VIII. STOCKAGE ET DATE D'EXPIRATION DES REACTIFS

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

#### IX. PREPARATION ET STABILITE DE L'ECHANTILLON

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

#### X. MODE OPERATOIRE

##### A. Notes de manipulation

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

##### B. Mode opératoire

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

#### XI. CALCUL DES RESULTATS

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



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

$$B/B_0(\%) = \frac{\text{moyenne des cpm (CAL ou échantillon)}}{\text{moyenne des cpm (CAL 0)}} \times 100$$

2. Utiliser un "3 cycle semi-logarithmic" ou un papier graphique "logit-log", porter en ordonnée les valeurs exprimées en pourcentage de liaison (B/B<sub>0</sub>(%)) de chaque point de calibration et en abscisse leur concentration respective en 3α-Diol G.
3. Des méthodes informatiques peuvent aussi être utilisées pour construire la courbe de calibration. Si un système d'analyse de traitement informatique des données est utilisé, la fonction "4 paramètres" d'ajustement de courbe est recommandée.
4. L'interpolation des valeurs de chaque échantillon (B/B<sub>0</sub>(%)) détermine les concentrations en 3α-Diol G à partir de la courbe d'étalonnage.
5. Pour chaque essai, le pourcentage total de traceur lié en absence de 3α-Diol G non marquée (B<sub>0</sub>/T) doit être vérifié.

## XII. DONNEES TYPES

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

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

## XIII. PERFORMANCE ET LIMITATIONS

### A. Limite de détection

Vingt calibrateurs zéro ont été testés en parallèle avec un assortiment d'autres calibrateurs.

La limite de détection, définie comme la concentration apparente située 2 déviations standards en-dessous de la moyenne déterminée à la fixation zéro, était de 0,05 ng/ml.

### B. Spécificité

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

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

### C. Précision

INTRA-ESSAI

INTER-ESSAI

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

SD : Déviation Standard; CV: Coefficient de variation

## D. Exactitude

### TEST DE DILUTION

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

L'échantillon a été dilué avec le calibrateur zéro.

### TEST DE RECUPERATION

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

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

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

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

## XIV. CÔNTROLE DE QUALITE INTERNE

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

## XIV. VALEURS ATTENDUES

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

## XV. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

### Sécurité

Pour utilisation en diagnostic *in vitro* uniquement.

Cette trousse contient de l'<sup>125</sup>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.

Les composants de sang humain inclus dans ce kit ont été évalués par des méthodes approuvées par l'Europe et/ou la FDA et trouvés négatifs pour HBsAg, l'anti-HCV, l'anti-HIV-1 et 2. Aucune méthode connue ne peut offrir l'assurance complète que des dérivés de sang humain ne transmettront pas d'hépatite, le sida ou toute autre infection. Donc, le traitement des réactifs, du sérum ou des échantillons de plasma devront être conformes aux procédures locales de sécurité.

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

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

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

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

### XVII. BIBLIOGRAPHIE

1. RITTMASER R.S. *et al.* (1988)  
**Androstanediol Glucuronide Isomers in Normal Men and Women and in Men infused with labelled Dihydrotestosterone.**  
JCE & M., 66, 1, 212-216.
2. RAO P.N. *et al.* (1987)  
**Isolation and Identification of Androstanediol Glucuronide from Human Plasma.**  
J. Steroid Biochem., 28, 5, 565-569.
3. HORTON R. *et al.* (1982)  
**3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -Androstanediol Glucuronide in plasma.**  
J. Clin. Invest., 69, 1203-1206.
4. JOURA E.A. *et al.* (1996)  
**Serum 3 $\alpha$ -androstanediol glucuronide is decreased in nonhirsute women with acne vulgaris.**  
Fertility and Sterility, 66, 6, 1033-1035.

5. GILAD S. *et al.* (1994)  
**Assesment of 5 $\alpha$ -reductase activity in hirsute women: comparison of serum androstanediol glucuronide with urinary androsterone and aetiocholanolone excretion.**  
Clinical Endocrinology, 40, 459-464.
6. THOMPSON D.L. *et al.* (1990)  
**Androsterone Glucuronide is a marker of adrenal hyperandrogenism in hirsute women.**  
Clinical Endocrinology, 32, 283-292.

### XVIII. RESUME DU PROTOCOLE

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

|  |                               |                           |
|--|-------------------------------|---------------------------|
| Numéro de catalogue DIASource :<br>KIP0151 | Numéro de P.I.:<br>1701001/fr | Révision n° :<br>110706/1 |
|--|-------------------------------|---------------------------|

Date de révision : 2011-07-06



Vor Gebrauch des Kits lesen Sie bitte diese Packungsbeilage.

## 3 $\alpha$ -Diol G-RIA-CT

### I. VERWENDUNGSZWECK

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

### II. ALLGEMEINE INFORMATION

- A. **Handelsbezeichnung :** DIAsource 3 $\alpha$ -Diol G-RIA-CT Kit
- B. **Katalognummer :** KIP0151 : 96 Tests
- C. **Hergestellt von:** DIAsource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgien.

**Für technische Unterstützung oder Bestellungen wenden Sie sich bitte an:**

**Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.90**

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

E-mail Ordering : [ordering@diasource.be](mailto:ordering@diasource.be)

### III. KLINISCHER HINTERGRUND

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

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

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


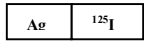
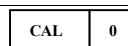
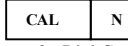

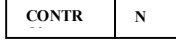
Die Bestimmung von 3 $\alpha$ -Diol G hat sich deshalb als nützlicher Indikator bei einer Reihe von Untersuchungsmethoden erweisen, wie bei der Überwachung des Behandlungsfortschritts bei idiopathischem Hirsutismus und von Patientinnen mit polyzystischen Ovarien.

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

#### IV. GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

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

#### V. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

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

**Bemerkung :** Benutzen Sie den Null-Kalibrator für Probenverdünnungen.

#### VI. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

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

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

#### VII. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

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

#### VIII. AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

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

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

#### IX. PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG

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

#### X. DURCHFÜHRUNG

##### A. Bemerkungen zur Durchführung

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

##### B. Durchführung

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

#### XI. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

1. Berechnen Sie den Durchschnitt aus den Doppelbestimmungen, schließen Sie offensichtliche „Ausreißer“ aus.
2. Berechnen Sie die gebundene Radioaktivität als Prozentsatz des am Null-Kalibratorpunkt (0) bestimmten Wertes nach folgender Formel:

$$B/B_0 (\%) = \frac{\text{Aktivität (Kalibrator oder Probe)}}{\text{Aktivität (Null-Kalibrator)}} \times 100$$

3. Verwenden Sie semi-logarithmisches oder doppelt-logarithmisches Millimeterpapier (über 3 Größenordnungen) drucken Sie die (B/B<sub>0</sub>(%)) Werte für jeden Kalibratorpunkt als Funktion der 3α-Diol-G-Konzentration für jeden Kalibratorpunkt
4. Computergestützte Methoden können ebenfalls zur Erstellung der Kalibrationskurve verwendet werden. Falls die Ergebnisberechnung mit dem Computer durchgeführt wird, empfehlen wir die Berechnung mit einer "4 Parameter"-Kurvenfunktion.
5. Bestimmen Sie die 3α-Diol-G-Konzentrationen der Proben über Interpolation der Probenwerte B/B<sub>0</sub>(%) der Referenzkurve.

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

## XII. TYPISCHE WERTE

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

| 3 $\alpha$ -Diol G | cpm   | B/B <sub>0</sub> (%) |
|--------------------|-------|----------------------|
| Gesamtaktivität    | 35967 |                      |
| Kalibrator         |       |                      |
| 0,0 ng/ml          | 13912 | 100,0                |
| 0,2 ng/ml          | 11443 | 82,2                 |
| 1,2 ng/ml          | 8385  | 60,3                 |
| 6,0 ng/ml          | 4611  | 33,1                 |
| 25,0 ng/ml         | 1796  | 12,9                 |
| 75,0 ng/ml         | 960   | 6,9                  |

## XIII. LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK

### A. Nachweisgrenze

Zwanzig Null-Kalibratoren wurden zusammen mit einem Satz anderer Kalibratoren gemessen.

Die Nachweisgrenze, definiert als die scheinbare Konzentration bei zwei Standardabweichungen unterhalb des gemessenen Durchschnittswerts bei Nullbindung, entsprach 0,05 ng/ml.

### B. Spezifität

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

Bemerkung : Die Tabelle zeigt Kreuzreaktivitäten für anti 3 $\alpha$ -Diol G.

### C. Präzision

#### INTRA-ASSAY PRÄZISION

#### INTER-ASSAY PRÄZISION

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

SD : Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

### D. Genauigkeit

#### VERDÜNNUNGSTEST

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

Die Proben wurden mit Null-Kalibrator verdünnt.

## WIEDERFINDUNGSTEST

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

### E. Zeitverzögerung zwischen letzter Kalibrator- und Probenzugabe

Es wird im folgenden gezeigt, dass die Genauigkeit der Tests selbst dann erhalten bleibt, wenn die Probe 20 Minuten nach Zugabe des Kalibrators in die beschichteten Röhrchen zugefügt wird.

#### ZEITABSTAND

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

## XIV. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

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

## XV. ZU ERWARTENDER BEREICH

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

## XV. VORSICHTMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

### Sicherheit

Nur für diagnostische Zwecke.

Dieser Kit enthält <sup>125</sup>I (Halbwertszeit: 60 Tagen), das ionisierende X (28 keV) und  $\gamma$  (35,5 keV) Strahlungen emittiert. Dieses radioaktive Produkt kann nur an autorisierte Personen abgegeben und darf nur von diesen angewendet werden; Erwerb, Lagerung, Verwendung und Austausch radioaktiver Produkte sind Gegenstand der Gesetzgebung des Landes des jeweiligen Endverbrauchers. In keinem Fall darf das Produkt an Menschen oder Tieren angewendet werden.

Die menschlichen Blutkomponenten in diesem Kit wurden mit europäischen und in USA erprobten FDA-Methoden getestet, sie waren negativ für HBsAg, anti-HCV und anti-HIV 1 und 2. Keine bekannte Methode kann jedoch vollkommene Sicherheit liefern, dass menschliche Blutbestandteile nicht Hepatitis, AIDS oder andere Infektionen übertragen. Deshalb sollte der Umgang mit Reagenzien, Serum oder Plasmaproben in Übereinstimmung mit den Sicherheitsbestimmungen erfolgen.

Alle tierischen Produkte und deren Derivate wurden von gesunden Tieren gesammelt. Komponenten von Rindern stammen aus Ländern in denen BSE nicht nachgewiesen wurde. Trotzdem sollten Komponenten, die tierische Substanzen enthalten, als potentiell ansteckend behandelt werden.

Vermeiden Sie Hautkontakt mit den Reagenzien (Natriumazid als Konservierungsmittel). Das Azid in diesem Kit kann mit Blei oder Kupfer in den Abflußrohren reagieren und so hochexplosive Metallazide bilden. Spülen Sie während der Waschschrte den Abfluß gründlich mit viel Wasser, um die Metallazidbildung zu verhindern.

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

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

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

#### XVII. LITERATUR

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

#### XVIII. ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

|                       | GESAMT-<br>AKTIVITÄT<br>( $\mu$ l)          | KALIBRA-<br>TOREN<br>( $\mu$ l) | PROBE(N)-<br>KONTROLLEN<br>( $\mu$ l) |
|-----------------------|---|---------------------------------|---------------------------------------|
| Kalibratoren (0 to 5) | -   | 100                             | -                                     |
| Proben, Kontrollen    | -   | -                               | 100                                   |
| Tracer                | 500   | 500                             | 500                                   |
| Inkubation            | 2 Std. bei RT u. ständ. Schütteln (700 rpm) |                                 |                                       |
| Separation            | -   |                                 | absaugen                              |
| Waschlösung           | -   |                                 | 2,0 ml                                |
| Separation            | -   |                                 | absaugen                              |
| Waschlösung           | -   |                                 | 2,0 ml                                |
| Separation            | -   |                                 | absaugen                              |
| Auswertung            | Messen der Röhren 60 Sekunden               |                                 |                                       |

|                                      |  |   |
|--------------------------------------|--|---|
| DIASource Katalognummer :<br>KIP0151 | Beipackzettel-<br>nummer :<br>1701001/de | Nummer der<br>Originalausgabe :<br>110706/1 |
|--------------------------------------|--|---|

Revisionsdatum: 2011-07-06



Lees het hele protocol vóór gebruik.

## 3 $\alpha$ -Diol G-RIA-CT

### I. BEOOGD GEBRUIK

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

### II. ALGEMENE INFORMATIE

- A. **Gedeponoerd handelsmerk:** DIASource 3 $\alpha$ -Diol G-RIA-CT kit
- B. **Catalogusnummer:** KIP0151: 96 testen.
- C. **Geproduceerd door:** DIASource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, België.

Voor technische assistentie of voor bestelinformatie

kunt u contact opnemen met :

Tel : +32 (0)10 84.99.11

Fax: +32 (0)10 84.99.90

### III. KLINISCHE ACHTERGROND

5 $\alpha$ -Androstaan-3 $\alpha$ -17 $\beta$ -Diol-Glucuronide (3 $\alpha$ -Diol G) is een C<sub>19</sub>-steroïde. Het wordt hoofdzakelijk aangemaakt als een metaboliet van testosteron en dihydrotestosteron (DHT). Het wordt grotendeels aangemaakt in perifere doelweefsels zoals de huid en dan voornamelijk rond haarfollikels. De stimulering door grote hoeveelheden 3 $\alpha$ -Diol G leidt tot overmatige haarvorming, wat bijzonder opvallend is op plaatsen waar haargroei niet gebruikelijk is bij vrouwen.

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

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













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

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

#### IV. BESCHRIJVING VAN DE METHODE

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

#### V. GELEVERDE REAGENTIA

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

**Opmerking:** Gebruik 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 100  $\mu\text{l}$ , 500  $\mu\text{l}$  en 2 ml (het gebruik van nauwkeurige pipetten met plastic wegwerptips wordt aanbevolen).
3. Vortexmenger.
4. Magnetische roerder.
5. Schudder voor de buisjes. (700 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  $^{125}\text{I}$ . Een maximale telefficiëntie moet worden gegarandeerd.

#### VII. BEREIDING VAN HET REAGENS

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

#### VIII. OPSLAG EN VERVALDATUM VAN REAGENTIA

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

#### IX. MONSTERAFFNAME EN MONSTERBEREIDING

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

#### X. PROCEDURE

##### A. Opmerkingen bij de procedure

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

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

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

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

##### B. Procedure

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

#### XI. BEREKENING VAN DE RESULTATEN

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

$$B/B_0 (\%) = \frac{\text{cpm (Kalibrator of monster)}}{\text{cpm (Nulkalibrator)}} \times 100$$



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

## XII. KENMERKENDE GEGEVENS

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

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

## XIII. EIGENSCHAPPEN EN GRENZEN

### A. Detectielimiet

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

### B. Specificiteit

| Bestanddeel   | Kruisreactiviteit (%) |
|---|-----------------------|
| 5 $\alpha$ androstaan-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diolG             | 100,00                |
| 5 $\alpha$ androstaan-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol              | 10,69                 |
| 5 $\alpha$ androstaan-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol-3glucuronide | 5,86                  |
| 5 $\alpha$ dihydrotestosteron glucuronide                       | 1,75                  |
| Testosteron glucuronide   | 0                     |
| Testosteron   | 0                     |
| 11 $\beta$ -hydroxytestosteron                                  | 0                     |
| 5 $\alpha$ -dihydrotestosteron                                  | 0                     |
| 5 $\beta$ -dihydrotestosteron                                   | 0                     |
| Cortisol  | 0                     |
| Dehydro-epiandrosteron  | 0                     |
| Estron  | 0                     |
| Androsteendion  | 0                     |
| 5-androsteen-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol                        | 0                     |
| 17 $\beta$ oestradiol   | 0                     |

**Opmerking:** deze tabel toont de kruisreactiviteit voor anti 3 $\alpha$ -Diol G.

### C. Precisie

#### PRECISIE BINNEN EEN TEST

#### PRECISIE TUSSEN TESTEN

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

SD: standaarddeviatie; VC: variatiecoëfficiënt

### D. Nauwkeurigheid

#### VERDUNNINGSTEST

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

Monsters werden verdund met de nulkalibrator.

## RECOVERY-TEST

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

### E. Tijd tussen de laatste kalibrator en distributie van het monster

Zoals hieronder weergegeven wordt, blijven de resultaten van de bepaling nauwkeurig, zelfs wanneer een monster 20 minuten na toevoeging van de kalibrator over de gecoatete buisjes gedistribueerd wordt.

#### TIJDSPANNE

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

## XIV. INTERNE KWALITEITSCONTROLE

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

## XV. REFERENTIE-INTERVALS

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

## XVI. VOORZORGSMAATREGELEN EN WAARSCHUWINGEN

### Veiligheid

Uitsluitend voor in vitro diagnostisch gebruik.

Deze kit bevat <sup>125</sup>I (halfwaardetijd: 60 dagen) , dat ioniserende X- (28 keV) en  $\gamma$ -stralen (35,5 keV) uitzendt. Dit radioactieve product mag enkel overhandigd worden aan en gebruikt worden door bevoegd personeel; ontvangst, opslag, gebruik en overdracht van radioactieve producten zijn onderworpen aan de wetgeving van het land van de eindgebruiker. In geen geval mag het product toegediend worden aan mensen of dieren.

De componenten, afkomstig van menselijk bloed, in deze kit werden getest door in Europa goedgekeurde en/of door de Amerikaanse FDA goedgekeurde methoden op aanwezigheid van HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 en 2 en gaven een negatief resultaat. Geen enkele bekende methode kan echter volledige garantie bieden dat derivaten van menselijk bloed geen hepatitis, aids of andere infecties overdragen. Daarom moet men reagentia, serum- of plasmamonsters behandelen in overeenstemming met de plaatselijke veiligheidsprocedures.

Alle producten en derivaten van dierlijke oorsprong zijn afkomstig van gezonde dieren. Boviene componenten komen uit landen waar BSE niet gerapporteerd werd. Toch moeten componenten die bestanddelen van dierlijke oorsprong bevatten, behandeld worden als potentieel besmettelijk.

Vermijd dat de reagentia (natriumazide als conserveermiddel) in contact komen met de huid. Azide in deze kit kan reageren met lood en koper in de afvoerleidingen en op die manier zeer explosieve metaalaziden vormen. Tijdens de wasfase moeten de afvoerleidingen ruimschoots met water nagespoeld worden om ophoping van azide te vermijden.

Niet roken, drinken, eten of cosmetica aanbrengen in de werkrimte. Niet met de mond pipetteren. Draag beschermende kleding en gebruik wegwerphandschoenen. Alle handelingen met radioactief materiaal moeten plaatsvinden in een daartoe bestemde ruimte, waar uitsluitend bevoegd personeel toegelaten wordt. Een logboek met ontvangst en opslag van radioactieve materialen moet worden bijgehouden in het laboratorium. Laboratoriumapparatuur en glaswerk, dat eventueel gecontamineerd werd met

radioactieve bestanddelen, moeten worden gesegegreerd om kruisbesmetting van verschillende radioisotopen te vermijden.

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

#### XVII. BIBLIOGRAFIE

1. RITTMASER R.S. *et al.* (1988)  
**Androstanediol Glucuronide Isomers in Normal Men and Women and in Men infused with labelled Dihydrotestosterone.**  
JCE & M., 66, 1, 212-216.
2. RAO P.N. *et al.* (1987)  
**Isolation and Identification of Androstanediol Glucuronide from Human Plasma.**  
J. Steroid Biochem., 28, 5, 565-569.
3. HORTON R. *et al.* (1982)  
**3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -Androstanediol Glucuronide in plasma.**  
J. Clin. Invest., 69, 1203-1206.
4. JOURA E.A. *et al.* (1996)  
Serum 3 $\alpha$ -androstanediol glucuronide is decreased in nonhirsute women with acne vulgaris.  
Fertility and Sterility, 66, 6, 1033-1035.
5. GILAD S. *et al.* (1994)  
Assessment of 5 $\alpha$ -reductase activity in hirsute women: comparison of serum androstanediol glucuronide with urinary androsterone and aetiocholanolone excretion.  
Clinical Endocrinology, 40, 459-464.

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

#### XVIII. SAMENVATTING VAN HET PROTOCOL

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

|                                       |                                  |                             |
|---------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------|
| DIAsource catalogusnummer:<br>KIP0151 | Bijsluiternummer :<br>1701001/nl | Revisienummer :<br>110706/1 |
|---------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------|

Revisiedatum : 2011-07-06



es

Leer el protocolo completo antes de usar.

## **3 $\alpha$ -Diol G-RIA-CT**

### ***I. INSTRUCCIONES DE USO***

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

### ***II. INFORMACIÓN GENERAL***

- A. Nombre:** DIAsource 3 $\alpha$ -Diol G-RIA-CT Kit
- B. Número de Catálogo:** KIP0151 : 96 tests
- C. Fabricado por:** DIAsource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

**Para cuestiones técnicas y información sobre pedidos contactar :**  
**Tel : +32 (0)10 84.99.11      Fax : +32 (0)10 84.99.90**

### ***III. INFORMACIÓN CLÍNICA***

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

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

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




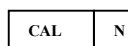

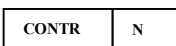
Las determinaciones de 3 $\alpha$ -Diol G, - son útiles como indicador de las diferentes vías, incluyendo la monitorización - del progreso en el tratamiento del hirsutismo idiopático y mujeres con ovarios policísticos.

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

#### IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

Una cantidad fija de 3 $\alpha$ -Diol G marcada con I<sup>125</sup> compete con el 3 $\alpha$ -Diol G a medir, presente en la muestra ó en el calibrador, por los puntos de unión del anticuerpo inmovilizado en las paredes de un tubo de poliestireno. No se requiere ni extracción ni cromatografía debido a la alta especificidad de los anticuerpos utilizados. Después de 2 horas de incubación a T.A. con agitación, una aspiración termina con la reacción de competición. Los tubos se lavan dos veces con 2 ml de Solución de lavado y se aspiran otra vez. Se dibuja la curva de calibración y las concentraciones de 3 $\alpha$ -Diol G de las muestras se determinan por interpolación de la dosis en la curva de calibración.

#### V. REACTIVOS SUMINISTRADOS

| Reactivos   | Kit 96 test                | Código de Color | Reconstitución   |
|---|----------------------------|-----------------|--|
|  Tubos recubiertos con anti 3 $\alpha$ -Diol G  | 2 x 48                     | gris            | Listo para uso   |
|  TRAZADOR:3 $\alpha$ -DiolG marcado con I <sup>125</sup> (grado HPLC) en tampón con caseína bovina (1%) y azida (<0,1%)                          | 1 vial<br>53 ml<br>185 kBq | rojo            | Listo para uso   |
|  Calibrador cero en suero bovino, thymol, (<0,1%) y gentamicina (< 0,1%)   | 1 vial<br>liofilizado      | amarillo        | Añadir 2 ml de agua destilada                                |
|  Calibradores 3 $\alpha$ -Diol G - N = 1 al 5 (mirar los valores exactos en las etiquetas) en suero bovino, thymol (<0,1%) y gentamicina (<0,1%) | 5 viales<br>liofilizados   | amarillo        | Añadir 0.5 ml de agua destilada                              |
|  Solución de lavado (Tampón Fosfato)  | 1 vial<br>50 ml            | marrón          | Diluir 25 x con agua destilada (utilizar agitador magnético) |
|  Controles - N = 1 ó 2 en suero humano y thymol (<0,1%)   | 2 viales<br>liofilizados   | plateado        | Añadir 0,5 ml de agua destilada                              |

Nota: Para diluciones de muestras utilizar estandar cero

#### VI. MATERIAL NO SUMINISTRADO

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

1. Agua destilada
2. Pipetas de 100 $\mu$ l, 500 $\mu$ l y 2 ml (Se recomienda el uso de pipetas precisas con puntas desechables de plástico)
3. Vortex
4. Agitador magnético
5. Agitador de tubos (700 rpm)
6. Jeringa automática 5 ml (tipo Cornwall) para el lavado
7. Sistema de aspiración (opcional)
8. Contador de radiaciones gamma para medir I<sup>125</sup> ( mínima eficiencia 70%)

#### VII. PREPARACIÓN REACTIVOS

**A. Calibradores:** Reconstituir el calibrador cero con 2,0 ml de agua destilada y otros calibradores con 0,5 ml de agua destilada.

**B. Controles:** Reconstituir los controles con 0,5 ml de agua destilada.

**C. Solución de lavado de trabajo:** Preparar el volumen necesario de Solución de lavado de trabajo mezclando 24 partes de agua destilada por 1 parte de Solución de lavado (25x). Utilizar un agitador magnético para homogeneizar. Desechar la solución de lavado de trabajo no utilizada al final del día.

#### VIII. ALMACENAJE Y CADUCIDADES DE LOS REACTIVOS

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

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

#### IX. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

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

#### X. PROTOCOLO

##### A. Notas de manejo

No utilizar el kit ó componentes después de la fecha de caducidad. No mezclar reactivos de diferente numero de lote. Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente antes de su uso. Agitar minuciosamente todos los reactivos y muestras, agitándolos ó 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 uno 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 100  $\mu$ l de cada uno en sus respectivos tubos.
3. Dispensar 0,5 ml de 3 $\alpha$ -Diol G marcado con I<sup>125</sup> en cada tubo, incluyendo los tubos descubiertos 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 2 horas a temperatura ambiente en agitación constante (700 rpm).
6. 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.
7. 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
8. Lavar de nuevo con 2 ml de Solución de lavado de trabajo (excepto los de Cuentas Totales) y aspirar.
9. Después del último lavado, dejar los tubos en posición inversa durante 2 minutos y aspirar el líquido restante.
10. Medir la actividad de cada tubo durante 60 segundos en un Contador Gamma.

#### XI. CALCULO DE RESULTADOS

1. Calcular la media de los duplicados, rechazando aquellos duplicados alejados de la media.
2. Calcular la radiactividad enlazada como un porcentaje de la unión con respecto al calibrador cero (0) de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$B/B_0(\%) = \frac{\text{Cuentas (Calibrador ó muestra)}}{\text{Cuentas ( Calibrador Cero)}} \times 100$$

3. Utilizando papel 3 ciclo semilogarítmico ó logit-log, representar los valores de (B/B<sub>0</sub>%) de cada calibrador frente a las contracciones del 3 $\alpha$ -Diol G de cada calibrador, rechazando aquellos duplicados alejados de la media.
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".
4. Por interpolación de los valores (B/B%) de las muestras, se determinan los valores de las concentraciones de las mismas desde la curva de calibración.

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

### XII. EJEMPLO DE RESULTADOS

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

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

### XIII. REALIZACIÓN Y LIMITACIONES

#### A. Limite de detección

Veinte calibradores cero fueron medidos en una curva con otros calibradores.

El limite de detección, definido como la concentración aparente resultante de dos desviaciones estándares debajo de la media de enlace del calibrador cero, fue de 0,05 ng/ml.

#### B. Especificidad

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

Nota: Esta tabla muestra las reacciones cruzadas del anti 3  $\alpha$ -Diol G

#### C. Precision

##### PRECISION INTRA-ENSAYO

##### PRECISION INTER-ENSAYO

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

SD : Desviación Estándar; CV: Coeficiente de Variación

#### D. Exactitud

##### TEST DILUCIÓN

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

Las muestras fueron diluidas con el calibrador cero.

### TEST DE RECUPERACIÓN

| Muestra | 3 $\alpha$ -Diol G añadido (ng/ml) | 3 $\alpha$ -Diol G Recuperado (ng/ml) | Recuperado (%) |
|---------|------------------------------------|---------------------------------------|----------------|
| Suero   | 50                                 | 48,4                                  | 96,8           |
|         | 20                                 | 21,3                                  | 106,0          |
|         | 10                                 | 9,5                                   | 95,0           |
|         | 5                                  | 4,9                                   | 98,0           |

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

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

##### TIEMPO DE ESPERA

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

### XIV. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

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

### XV. INTERVALOS DE REFERENCIA

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

### XVI. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

#### Seguridad

Para uso solo en diagnóstico in vitro.

Este kit contiene I<sup>125</sup> (vida media : 60 días) emisor de rayos X (28 keV) y de rayos  $\gamma$  (35.5 keV) ionizantes.

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

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

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

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

No fumar, beber, comer ó utilizar cosméticos en el área de trabajo. No pipetear con la boca. Utilizar ropa de protección y guantes. Todo el manejo de producto radiactivo se hará en una área señalizada, diferente de la de paso regular. Deberá de utilizarse un libro de registros de productos radiactivos utilizados. El material de laboratorio, vidrio que podría estar contaminado radiactivamente deberá de descontaminarse para evitar la contaminación con otros isótopos.

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

#### XVII. BIBLIOGRAFIA

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

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

#### XVIII. RESUMO DO PROTOCOLO

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

|                                    |                             |                           |
|------------------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| DIAsource Catalogo Nr :<br>KIP0151 | P.I. Numero :<br>1701001/es | Revisión nr :<br>110706/1 |
|------------------------------------|-----------------------------|---------------------------|

Fecha de la revisión: 2011-07-06



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

## 3 $\alpha$ -Diol G-RIA-CT

### *I. USO DEL KIT*

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

### *II. INFORMAZIONI DI CARATTERE GENERALE*

- A. Nome commerciale:** DIAsource 3 $\alpha$ -Diol G-RIA-CT Kit
- B. Numero di catalogo:** KIP0151: 96 tests
- C. Prodotto da:** DIAsource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgio.

**Per informazioni tecniche o su come ordinare il prodotto contattare:**  
Tel: +32 (0) 10 84.99.11 Fax: +32 (0) 10 84.99.90

### *III. INFORMAZIONI CLINICHE*


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

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

#### IV. PRINCIPIO DEL METODO

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

#### V. REATTIVI FORNITI

| Reattivi   | Kit da 96 test   | Codice colore    | Volume di ricostituzione      |                    |                                       |   |
|--|------------------|------------------|-------------------------------|--------------------|---------------------------------------|---|
|  Provette sensibilizzate con anticorpo anti 3 $\alpha$ -Diolo G   | 2 x 48           | grigio           | Pronte per l'uso              |                    |                                       |   |
| <table border="1" data-bbox="119 651 256 685"> <tr> <td>Ag</td> <td><sup>125</sup>I</td> </tr> </table> Marcato: 3 $\alpha$ -Diolo G marcato con <sup>125</sup> I (grado HPLC), in tampone con caseina bovina (1%) e sodio azide (<0,1%)   | Ag               | <sup>125</sup> I | 1 flacone<br>55 ml<br>185 kBq | rosso              | Pronte per l'uso                      |   |
| Ag   | <sup>125</sup> I |                  |                               |                    |                                       |   |
| <table border="1" data-bbox="119 797 256 831"> <tr> <td>CAL</td> <td>0</td> </tr> </table> Calibratore zero in siero bovino, contenente timolo (<0,1%) e gentamicina (<0,1%)   | CAL              | 0                | 1 flacone<br>liofilizzato     | giallo             | Aggiungere 2 ml di acqua distillata   |   |
| CAL  | 0                |                  |                               |                    |                                       |   |
| <table border="1" data-bbox="119 920 256 954"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> Calibratore 1-5 di 3 $\alpha$ -Diolo G, (le concentrazioni esatte degli calibratore sono riportate sulle etichette dei flaconi), in siero bovino, contenente timolo (<0,1%) e gentamicina (<0,1%) | CAL              | N                | 5 flaconi<br>liofilizzati     | giallo             | Aggiungere 0,5 ml di acqua distillata |   |
| CAL  | N                |                  |                               |                    |                                       |   |
| <table border="1" data-bbox="76 1133 320 1167"> <tr> <td>WASH</td> <td>SOLN</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Tampone di lavaggio (tampone fosfato)  | WASH             | SOLN             | CONC                          | 1 flacone<br>50 ml | bruno                                 | Diluire 25 x con acqua distillata usando un agitatore magnetico |
| WASH   | SOLN             | CONC             |                               |                    |                                       |   |
| <table border="1" data-bbox="76 1279 304 1312"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table> Controlli: N = 1 o 2, in siero umano contenente timolo (<0,1%)   | CONTROL          | N                | 2 flaconi<br>liofilizzati     | argento            | Aggiungere 0,5 ml di acqua distillata |   |
| CONTROL  | N                |                  |                               |                    |                                       |   |

**Note :** Usare lo calibratore zero per diluire i campioni.

#### VI. REATTIVI NON FORNITI

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

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

#### VII. PREPARAZIONE DEI REATTIVI

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

#### VIII. CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI

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

#### IX. RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

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

#### X. METODO DEL DOSAGGIO

##### A. Avvertenze generali

Non usare il kit o suoi componenti oltre la data di scadenza. Non mescolare reattivi di lotti diversi. Prima dell'uso portare tutti i reattivi a temperatura ambiente.

Mescolare delicatamente i campioni per inversione o rotazione. Per evitare cross-contaminazioni, cambiare il puntale della pipetta ogni volta che si usi un nuovo reattivo o campione.

L'uso di pipette ben tarate e ripetibili o di sistemi di pipettamento automatici migliora la precisione del dosaggio. Rispettare i tempi di incubazione.

Allestire una curva di taratura per ogni seduta analitica, in quanto non è possibile utilizzare per un dosaggio curve di taratura di sedute analitiche precedenti.

##### B. Metodo del dosaggio

1. Numerare le provette sensibilizzate necessarie per dosare in duplicato ogni calibratore, campione o controllo. Numerare 2 provette non sensibilizzate per la determinazione dell'attività totale.
2. Agitare brevemente su vortex calibratore, campioni e controlli. Dispensare 100  $\mu$ l di calibratore, campioni e controlli nelle rispettive provette.
3. Dispensare 500  $\mu$ l di 3 $\alpha$ -Diolo G marcato con <sup>125</sup>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 2 ore a temperatura ambiente in agitazione (700 rpm).
6. Aspirare il liquido contenuto in tutte le provette, tranne in quelle per l'attività totale, facendo attenzione che il puntale dell'aspiratore raggiunga il fondo delle provette e che aspiri tutto il liquido. Lavare tutte le provette, tranne quelle per l'attività totale, con 2 ml di soluzione di lavoro di tampone di lavaggio, evitando di provocare la formazione di schiuma.
7. Lavare nuovamente tutte le provette, tranne quelle per l'attività totale, con 2 ml di soluzione di lavoro di tampone di lavaggio e aspirare.
8. Dopo il secondo lavaggio lasciare decantare le provette in posizione verticale per due minuti circa e aspirare eventuali gocce di liquido residue.
9. Contare tutte le provette per 1 minuto con il contatore gamma.

#### XI. CALCOLO DEI RISULTATI

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

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

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



4. E' possibile utilizzare un sistema di interpolazione dati automatizzato. Con un sistema automatico di interpolazione dati, utilizzare la curva a 4 parametri.
5. Per interpolazione sulla curva di taratura dei rapporti di competizione di campioni e controlli, determinare le rispettive concentrazioni di 3 $\alpha$ -Diolo G. Per ogni dosaggio determinare la capacit  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 3 $\alpha$ -Diolo G in campioni e controlli al posto della curva calibratore eseguita contemporaneamente.

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

## XIII. CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO

### A. Sensibilit 

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

### B. Specificit 

| Composto   | Cross-Reattivit  (%) |
|--|----------------------|
| 5 $\alpha$ -Androstan-3 $\alpha$ -17 $\beta$ -diolo G            | 100,00               |
| 5 $\alpha$ -Androstan-3 $\alpha$ -17 $\beta$ -diolo              | 10,69                |
| 5 $\alpha$ -Androstan-3 $\alpha$ -17 $\beta$ -diolo-3Glicuronide | 5,86                 |
| 5 $\alpha$ -Diidrotestosterone Glicuronide                       | 1,75                 |
| Progesterone   | 0,03                 |
| Testosterone glicuronide   | 0                    |
| Testosterone   | 0                    |
| 11 $\beta$ -Idrossotestosterone                                  | 0                    |
| 5 $\alpha$ -Diidrotestosterone                                   | 0                    |
| 5 $\beta$ -Diidrotestosterone                                    | 0                    |
| Cortisolo  | 0                    |
| Deidroepiandrosterone  | 0                    |
| Estrone  | 0                    |
| Androstenedione  | 0                    |
| 5-Androstene-3 $\beta$ -17 $\beta$ -diolo                        | 0                    |
| 17 $\beta$ -Estradiolo   | 0                    |

Nota: La tabella mostra la cross-reattivit  dell'anticorpo anti 3 $\alpha$ -Diolo G

### C. Precisione

#### INTRA SAGGIO

#### INTER SAGGIO

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

SD : Deviazione Standard; CV: Coefficiente di Variazione

### D. Accuratezza

#### TEST DI DILUZIONE

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

I campioni sono stati diluiti con calibratore zero.

## TEST DI RECUPERO

| Campione | 3 $\alpha$ -Diolo G aggiunto (ng/ml) | 3 $\alpha$ -Diolo G recuperato (ng/ml) | Recupero (%) |
|----------|--------------------------------------|--|--------------|
| Siero    | 50                                   | 48,4                                   | 96,8         |
|          | 20                                   | 21,3                                   | 106,0        |
|          | 10                                   | 9,5                                    | 95,0         |
|          | 5                                    | 4,9                                    | 98,0         |

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

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

#### TEMPO TRASCORSO

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

## XIV. CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO

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

## XV. INTERVALLI DI RIFERIMENTO

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

## XVI. PRECAUZIONI PER L'USO

### Sicurezza

Il kit   solo per uso diagnostico in vitro.

Il kit contiene <sup>125</sup>I (emivita: 60 giorni) emettente raggi X (28 keV) e  $\gamma$  (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 pu  essere somministrato ad esseri umani o animali. I reattivi di origine umana presenti nel kit sono stati dosati con metodi approvati da organismi di controllo europei o da FDA e si sono rivelati negativi per HBs Ag, anti HCV, anti HIV1 e anti HIV2. Non sono disponibili metodi in grado di offrire la certezza assoluta che derivati da sangue umano non possano provocare epatiti, AIDS o trasmettere altre infezioni. Manipolare questi reattivi o i campioni di siero o plasma secondo le procedure di sicurezza vigenti. Tutti i prodotti di origine animale o loro derivati provengono da animali sani. I componenti di origine bovina provengono da paesi dove non sono stati segnalati casi di BSE. E' comunque necessario considerare i prodotti di origine animale come potenziali fonti di infezioni. Evitare ogni contatto dell'epidermide con i reattivi contenenti sodio azide come conservante. La sodio azide pu  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   consentito consumare cibi o bevande, fumare o usare cosmetici. Non pipettare i reattivi con pipette a bocca. Usare sempre guanti e camici da laboratorio quando si manipola materiale radioattivo. Le sostanze radioattive devono essere conservate in propri contenitori in appositi locali che devono essere interdetti alle persone non autorizzate.

Deve essere tenuto un registro di carico e scarico del materiale radioattivo. Il materiale di laboratorio e la vetreria deve essere dedicato all'uso di isotopi specifici per evitare cross-contaminazioni.

In caso di contaminazione o dispersione di materiale radioattivo, fare riferimento alle norme locali di radioprotezione. I rifiuti radioattivi devono essere smaltiti secondo le norme locali di radioprotezione. Lo scrupoloso rispetto delle norme per l'uso di sostanze radioattive fornisce una protezione adeguata agli utilizzatori.

#### XVII. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

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

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

#### XVIII. SCHEMA DEL DOSAGGIO

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

|  |                             |                                |
|--|-----------------------------|--------------------------------|
| Numero di catalogo di DIASource :<br>KIP0151 | P.I. numero :<br>1701001/it | Revisione numero :<br>110706/1 |
|--|-----------------------------|--------------------------------|

Data di revisione: 2011-07-06



el

Διαβάστε ολόκληρο το πρωτόκολλο πριν από τη χρήση.

## 3 $\alpha$ -Diol G-RIA-CT

### I. ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ

Ραδιοανοσοπροσδιορισμός για την *in vitro* ποσοτική μέτρηση του ανθρώπινου 5 $\alpha$ -ανδροστάνιο-3 $\alpha$ -17 $\beta$ -διολ-γλυκουρονιδίου (3 $\alpha$ -Diol G) στον ορό και το πλάσμα.

### II. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

- A. **Εμπορική ονομασία:** Κιτ 3 $\alpha$ -Diol G-RIA-CT της DIASource
- B. **Αριθμός καταλόγου:** KIP0151: 96 προσδιορισμοί
- Γ. **Κατασκευάζεται από την:** DIASource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Για τεχνική βοήθεια ή πληροφορίες σχετικά με παραγγελίες επικοινωνήστε στα:  
Τηλ.: +32 (0)10 84.99.11 Φαξ: +32 (0)10 84.99.90

### III. ΚΛΙΝΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

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

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

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


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

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

#### IV. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

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

#### V. ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

| Αντιδραστήρια  | Κιτ 96 προσδιορισμών | Χρωματικός κωδικός | Ανασύσταση                         |                     |                                     |  |
|--|----------------------|--------------------|------------------------------------|---------------------|-------------------------------------|--|
|  Σωληνάρια επιστρωμένα με αντι 3α-Diol G  | 2 x 48               | γκρι               | Έτοιμο για χρήση                   |                     |                                     |  |
| <table border="1" data-bbox="119 694 255 739"> <tr> <td>Ag</td> <td><sup>125</sup>I</td> </tr> </table><br>ΙΧΝΗΘΕΤΗΣ: 3α-Diol G σημασμένο με <sup>125</sup> I (κατηγορίας HPLC) σε ρυθμιστικό διάλυμα με βόεια καζεΐνη και αζίδιο (<0,1%)            | Ag                   | <sup>125</sup> I   | 1 φιαλίδιο<br>53 ml<br>185 kBq     | κόκκινο             | Έτοιμο για χρήση                    |  |
| Ag   | <sup>125</sup> I     |                    |                                    |                     |                                     |  |
| <table border="1" data-bbox="143 862 271 907"> <tr> <td>CAL</td> <td>0</td> </tr> </table><br>Μηδενικός βαθμονομητής σε βόειο ορό, θυμόλη (<0,1%) και γενταμικίνη (<0,1%)  | CAL                  | 0                  | 1 φιαλίδιο<br>λυοφιλοποιο<br>ημένο | κίτρινο             | Προσθέστε 2 ml απεσταγμένου νερού   |  |
| CAL  | 0                    |                    |                                    |                     |                                     |  |
| <table border="1" data-bbox="119 985 255 1030"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table><br>Βαθμονομητές 3α-Diol G - N = 1 έως 5 (δείτε τις ακριβείς τιμές πάνω στις επικέτες των φιαλιδίων) σε βόειο ορό, θυμόλη (<0,1%) και γενταμικίνη (<0,1%) | CAL                  | N                  | 5 φιαλίδια<br>λυοφιλοποιο<br>ημένο | κίτρινο             | Προσθέστε 0,5 ml απεσταγμένου νερού |  |
| CAL  | N                    |                    |                                    |                     |                                     |  |
| <table border="1" data-bbox="95 1164 335 1220"> <tr> <td>WASH</td> <td>SOLN</td> <td>CONC</td> </tr> </table><br>Διάλυμα πλύσης (Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών)  | WASH                 | SOLN               | CONC                               | 1 φιαλίδιο<br>50 ml | καφέ                                | Αραιώστε 25 x με απεσταγμένο νερό (χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα). |
| WASH   | SOLN                 | CONC               |                                    |                     |                                     |  |
| <table border="1" data-bbox="95 1299 295 1344"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table><br>Οροί ελέγχου - N = 1 ή 2 σε ανθρώπινο ορό και θυμόλη (<0,1%)  | CONTROL              | N                  | 2 φιαλίδια<br>λυοφιλοποιο<br>ημένο | ασημί               | Προσθέστε 0,5 ml απεσταγμένου νερού |  |
| CONTROL  | N                    |                    |                                    |                     |                                     |  |

**Σημείωση:** Χρησιμοποιείτε το μηδενικό βαθμονομητή για αραιώσεις δειγμάτων.

#### VI. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

Τα ακόλουθα υλικά απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται στο κιτ:

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

#### VII. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ

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

#### VIII. ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΛΗΞΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

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

#### IX. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

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

#### X. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

##### A. Σημειώσεις σχετικά με το χειρισμό

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

##### B. Διαδικασία

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

## XI. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

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

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

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

## XII. ΤΥΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

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

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

## XIII. ΑΠΟΔΟΣΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

### A. Όριο ανίχνευσης

Μετρήθηκαν είκοσι μηδενικοί βαθμονομητές μαζί με ένα σύνολο άλλων βαθμονομητών.

Το όριο ανίχνευσης, οριζόμενο ως η φαινομενική συγκέντρωση δύο τυπικών αποκλίσεων κάτω από τις μέσες μετρήσεις σε μηδενική δέσμευση, ήταν 0,05 ng/ml.

### B. Ειδικότητα

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

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

### Γ. Ακρίβεια

ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΙΔΙΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ

ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΜΕΤΑΞΥ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΩΝ

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

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

## Δ. Ορθότητα

### ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΡΑΙΩΣΗΣ

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

Τα δείγματα αραιώθηκαν με το μηδενικό βαθμονομητή.

### ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ

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

## E. Μεσοδιάστημα μεταξύ της διανομής τελευταίου βαθμονομητή και δείγματος

Όπως φαίνεται στη συνέχεια, τα αποτελέσματα του προσδιορισμού παραμένουν αξιόπιστα ακόμα και όταν διανέμεται ένα δείγμα 20 λεπτά μετά την προσθήκη του βαθμονομητή στα επιστρωμένα σωληνάρια.

### ΜΕΣΟΔΙΑΣΤΗΜΑ

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

## XIV. ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΣ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

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

## XV. ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

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

## XVI. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

### Ασφάλεια

Μόνο για διαγνωστική χρήση in vitro.

Το κιτ αυτό περιέχει το <sup>125</sup>I (Χρόνος ημιζωής: 60 ημέρες), μια ραδιενεργή ουσία η οποία εκπέμπει ιονίζουσα ακτινοβολία Χ (28 keV) και γ (35.5 keV).

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

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

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

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

Μην καπνίζετε, μην πίνετε, μην τρώτε και μη χρησιμοποιείτε καλλυντικά στο χώρο εργασίας. Μην διανέμετε με πιπέτα χρησιμοποιώντας το στόμα σας. Χρησιμοποιείτε προστατευτικό ρουχισμό και γάντια μιας χρήσης. Όλος ο χειρισμός του ραδιενεργού υλικού θα πρέπει να εκτελείται σε καθορισμένο χώρο, μακριά από χώρους τακτικής διέλευσης. Στο εργαστήριο πρέπει να διατηρείται ημερολόγιο για την παραλαβή και τη φύλαξη ραδιενεργών υλικών. Εξοπλισμός και γυάλινα σκεύη του εργαστηρίου, τα οποία θα μπορούσαν να μολυνθούν με ραδιενεργές ουσίες, θα πρέπει να φυλάσσονται σε ξεχωριστό χώρο για την πρόληψη επιμόλυνσης των διαφόρων ραδιοϊσοτόπων.

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

## XVII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. RITTMASER R.S. *et al.* (1988)  
**Androstanediol Glucuronide Isomers in Normal Men and Women and in Men infused with labelled Dihydrotestosterone.**  
JCE & M., 66, 1, 212-216.
2. RAO P.N. *et al.* (1987)  
**Isolation and Identification of Androstanediol Glucuronide from Human Plasma.**  
J. Steroid Biochem., 28, 5, 565-569.  
J. Clin. Invest., 69, 1203-1206.

3. HORTON R. *et al.* (1982)  
**3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -Androstanediol Glucuronide in plasma.**
4. JOURA E.A. *et al.* (1996)  
**Serum 3 $\alpha$ -androstanediol glucuronide is decreased in nonhirsute women with acne vulgaris.**  
Fertility and Sterility, 66, 6, 1033-1035.
5. GILAD S. *et al.* (1994)  
**Assesment of 5 $\alpha$ -reductase activity in hirsute women: comparison of serum androstanediol glucuronide with urinary androsterone and aetiocholanolone excretion.**  
Clinical Endocrinology, 40, 459-464.
6. THOMPSON D.L. *et al.* (1990)  
**Androsterone Glucuronide is a marker of adrenal hyperandrogenism in hirsute women.**  
Clinical Endocrinology, 32, 283-292.

## XVIII. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ

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

|                                     |                             |                              |
|-------------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| Αρ. καταλόγου DIAsource:<br>KIP0151 | Αριθμός P.I.:<br>1701001/εl | Αρ. αναθεώρησης:<br>110706/1 |
|-------------------------------------|-----------------------------|------------------------------|

ημερομηνία αναθεώρησης: 2011-07-06



Leia todo o protocolo antes de utilizar.

## **3 $\alpha$ -Diol G-RIA-CT**

### ***I. UTILIZAÇÃO PREVISTA***

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

### ***II. INFORMAÇÕES GERAIS***

- A. Nome do proprietário :** DIAsource-Kit 3 $\alpha$ -Diol G-RIA-CT
- B. Número do catálogo :** KIP0151 : 96 testes
- C. Produzido por :** DIAsource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Bélgica.

Para obter informações sobre aquisição ou assistência técnica , contacte :  
**Bélgica Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.90**  
**Ou o representante local**

### ***III. SIGNIFICADO CLÍNICO***

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

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

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


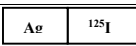
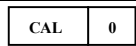
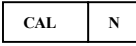

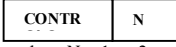
As determinações do 3 $\alpha$ -Diol G são então manifestamente úteis, na monitorização do progresso do tratamento do hirsutismo idiopático e em mulheres com ovários poliquísticos.

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

#### IV. PRINCÍPIO DO MÉTODO

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

#### V. REAGENTES FORNECIDOS

| Reagentes   | Kit 96 Testes              | Código de cor | Reconstituição   |
|---|----------------------------|---------------|--|
|  Tubos revestidos com anti 3 $\alpha$ -Diol G   | 2 x 48                     | Cinzento      | Pronto para utilizar                                       |
|  Marcador: 3 $\alpha$ -Diol G marcado com <sup>125</sup> I (grau HPLC) em tampão com caseína bovina (1%) e azida (<0,1%)                               | 1 recipiente 53 ml 185 kBq | vermelho      | Pronto para utilizar                                       |
|  Calibrador Zero em soro bovino, timol (<0,1%) e gentamicina (<0,1%)   | 1 recipiente liofilizado   | amarelo       | Adicione 2 ml de água destilada                            |
|  Calibradores 3 $\alpha$ -Diol G - N = 1 para 5 (ver os valores exactos nos rótulos do recipiente) no soro bovino, timol (<0,1%) e gentamicina (<0,1%) | 5 recipientes liofilizados | amarelo       | Adicione 0,5 ml de água destilada                          |
|  Solução de lavagem (Tampão fosfato)  | 1 recipiente 50 ml         | castanho      | Dilua 25 x com água destilada (use um agitador magnético). |
|  Controlos - N = 1 ou 2 No soro humano e timol (<0,1%)  | 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: 100  $\mu$ l, 500  $\mu$ l e 2 ml (recomenda-se a utilização de pipetas precisas, com pontas descartáveis)
3. Misturador de vortex
4. Agitador magnético
5. Agitador de tubos (700 rpm)
6. Pipeta automática de 5 ml para lavagem (tipo Cornwall)
7. Sistema de aspiração (opcional)
8. Qualquer contador gamma capaz de medir <sup>125</sup>I pode ser utilizado (min alcance de 70%).

#### VII. PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

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

#### VIII. ARMAZENAMENTO E PRAZO DE VALIDADE DOS REAGENTES

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

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

#### IX. RECOLHA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

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

#### X. PROCEDIMENTO

##### A. Notas de manipulação

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

##### B. Procedimento

1. Rotule os tubos revestidos em duplicado, para cada calibrador, amostra, controlo. Para a determinação das contagens totais, rotule 2 tubos normais.
2. Agite ligeiramente no vortex calibradores, amostras e controlos e dispense 100 $\mu$ l de cada, para os tubos respectivos.
3. Dispense 0,5 ml de 3 $\alpha$ -Diol G marcado com I <sup>125</sup> para cada tubo, incluindo os tubos normais para as contagens totais.
4. Agite suavemente o suporte dos tubos, para libertar possíveis bolhas de ar.
5. Incube durante 2 horas à TA com agitação contínua (700 rpm).
6. Aspire o conteúdo de cada tubo (excepto os das contagens totais). Assegure-se que a ponta plástica do aspirador atinge o fundo do tubo revestido, para remover todo o líquido.
7. Lave os tubos com 2 ml de solução de lavagem de trabalho (excepto os das contagens totais) e aspire. Evite formação de espuma quando adiciona a solução de lavagem.
8. Lave novamente os tubos com 2 ml de solução (excepto os das contagens totais) e aspire.
9. Depois da última lavagem, deixe os tubos direitos durante 2 minutos e seguidamente aspire a última porção de líquido.
10. Conte os tubos num contador gamma durante 60 segundos.

#### XI. CÁLCULO DOS RESULTADOS

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

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

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

#### XII. DADOS TÍPICOS

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



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

### XIII. DESEMPENHO E LIMITES

#### A. Limite de detecção

Foram analisados 20 calibradores zero, juntamente com um conjunto de outros calibradores.

O limite de detecção, definido como a concentração aparente, 2 DP abaixo das contagens médias com zero ligações, foi de 0,05 ng/ml.

#### B. Especificidade

| Composto   | Reactividade-cruzada (%) |
|--|--------------------------|
| 5 $\alpha$ -Androstano-3 $\alpha$ -17 $\beta$ -diolG             | 100,00                   |
| 5 $\alpha$ -Androstano-3 $\alpha$ -17 $\beta$ -diol              | 10,69                    |
| 5 $\alpha$ -Androstano-3 $\alpha$ -17 $\beta$ -diol-3Glucuronido | 5,86                     |
| 5 $\alpha$ -Dihidrotosterona Glucuronido                         | 1,75                     |
| Progesterona   | 0,03                     |
| Testosterona glucuronido   | 0                        |
| Testosterona   | 0                        |
| 11 $\beta$ -hidroxitosterona                                     | 0                        |
| 5 $\alpha$ -Dihidrotosterona                                     | 0                        |
| 5 $\beta$ -Dihidrotosterona                                      | 0                        |
| Cortisol   | 0                        |
| Dehidroepiandrosterona   | 0                        |
| Estrona  | 0                        |
| Androstenediona  | 0                        |
| 5-Androstena-3 $\beta$ -17 $\beta$ -diol                         | 0                        |
| 17 $\beta$ -Estradiol  | 0                        |

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

#### C. Precisão

##### PRECISÃO INTRA-ENSAIO

##### PRECISÃO INTER-ENSAIO

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

DP: Desvio Padrão; CV: Coeficiente de variação

#### D. Exactidão

##### TESTE DE DILUIÇÃO

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

As amostras foram diluídas com calibrador zero.

##### TESTE DE RECUPERAÇÃO

| Amostra | 3 $\alpha$ -Diol G adicionado (ng/ml) | 3 $\alpha$ -Diol G recuperado (ng/ml) | Recuperação (%) |
|---------|---------------------------------------|---------------------------------------|-----------------|
| Soro    | 50                                    | 48,4                                  | 96,8            |
|         | 20                                    | 21,3                                  | 106,0           |
|         | 10                                    | 9,5                                   | 95,0            |
|         | 5                                     | 4,9                                   | 98,0            |

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

Conforme demonstrado a seguir, os resultados das análises continuam precisos, mesmo quando é dispensada uma amostra 20 minutos depois da adição do calibrador aos tubos revestidos.

##### INTERVALO DE ATRASO DE TEMPO

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

#### XIV. CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO

- Se os resultados obtidos para o controlo 1 e/ou controlo 2 não estão dentro do intervalo especificado no rótulo do recipiente, os resultados não podem ser utilizados, a menos que seja dada uma explicação satisfatória para a discrepância encontrada.
- Se for desejável, cada laboratório pode fazer os seus próprios conjuntos de amostras de controlo, que podem ser mantidas congeladas em alíquotas. Não faça ciclos de congelação/descongelação mais do que 2 vezes.
- Não existe material de referência internacional para este parâmetro, que seja do nosso conhecimento

#### XV. INTERVALOS DE REFERÊNCIA

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

#### XVI. AVISOS E PRECAUÇÕES

##### Segurança

Apenas para uso em diagnóstico *in vitro*.

Este kit contém <sup>125</sup>I (meia-vida: 60 dias), emitindo radiações X (28 keV) e  $\gamma$  (35,5 keV) ionizantes.

Este produto radioactivo pode apenas ser transportado e utilizado por pessoal autorizado: a compra, armazenamento, utilização e troca de produtos radioactivos estão sujeitas à legislação nacional vigente. Em nenhum caso, este produto pode ser administrados a seres humanos ou a animais.

Os componentes de sangue humano incluídos neste kit foram testados por métodos aprovados pela legislação europeia e/ou FDA e dados como negativos para o HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 e 2. Não existe nenhum método, até agora conhecido, que ofereça 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 animais saudáveis. Os componentes bovinos, vieram de países sem casos notificados de BSE. No entanto, todos estes componentes devem ser manipulados como potencialmente infecciosos.

Evite o contacto da pele e mucosas com os reagentes (azida sódica como conservante). A azida pode reagir com o chumbo e o cobre das canalizações e formar compostos explosivos. Rejeitar com abundante quantidade de água corrente para evitar acumulações destes compostos.

Não fume, coma, beba ou aplique cosméticos na área de trabalho. Não pipette com o auxílio da boca. Use vestuário adequado de protecção e luvas. Toda a manipulação radioactiva deve ser efectuada em local próprio e exclusivo para tal. Deve ser mantido no laboratório, um livro de registo para a recepção e armazenamento de material radioactivo. O equipamento do laboratório e equipamento de vidro que possa ser contaminado com radioactividade, deve ser segregado para evitar contaminação cruzada com diferentes isótopos. Qualquer derrame de material radioactivo deve ser imediatamente limpo, de acordo com os procedimentos de radioprotecção. O lixo radioactivo deve ser rejeitado de acordo com a legislação vigente e as regras do laboratório. A adesão às regras básicas da radiosegurança, fornece a protecção adequada.

**XVII. BIBLIOGRAFIA**







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

**XVIII. RESUMO DO PROTOCOLO**

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

|                                       |                           |                             |
|---------------------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| Nº do catálogo DIAsource :<br>KIP0151 | Nº de P.I.:<br>1701001/pt | Nº de revisão :<br>110706/1 |
|---------------------------------------|---------------------------|-----------------------------|

Data da revisão: 2011-07-06

|   | <b>Used symbols</b>                |
|---|------------------------------------|
|  | Consult instructions for use       |
|  | Storage temperature                |
|  | Use by                             |
| <b>LOT</b>  | Batch code                         |
| <b>REF</b>  | Catalogue number                   |
| <b>CONTROL</b>  | Control                            |
| <b>IVD</b>  | In vitro diagnostic medical device |
|  | Manufacturer                       |
|  | Contains sufficient for <n> tests  |
| WASH SOLN CONC  | Wash solution concentrated         |
| CAL 0   | Zero calibrator                    |
| CAL N   | Calibrator #                       |
| CONTROL N   | Control #                          |
| Ag 1251   | Tracer                             |
| Ab 1251   | Tracer                             |
| Ag 1251 CONC  | Tracer concentrated                |
| Ab 1251 CONC  | Tracer concentrated                |
|  | Tubes                              |
| INC BUF   | Incubation buffer                  |
| ACETONITRILE  | Acetonitrile                       |
| SERUM   | Serum                              |
| DIL SPE   | Specimen diluent                   |
| DIL BUF   | Dilution buffer                    |
| ANTISERUM   | Antiserum                          |
| IMMUNOADSORBENT   | Immunoabsorbent                    |
| DIL CAL   | Calibrator diluent                 |
| REC SOLN  | Reconstitution solution            |
| PEG   | Polyethylene glycol                |
| EXTR SOLN   | Extraction solution                |
| ELU SOLN  | Elution solution                   |
| GEL   | Bond Elut Silica cartridges        |
| PRE SOLN  | Pre-treatment solution             |
| NEUTR SOLN  | Neutralization solution            |
| TRACEUR BUF   | Tracer buffer                      |
| <b>µP</b>   | 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                        |

|                 | <b><u>Symboles utilisés</u></b>           |
|-----------------|---|
|                 | Consulter les instructions d'utilisation  |
|                 | Température de conservation               |
|                 | Utiliser jusqu'à                          |
| <b>LOT</b>      | Numéro de lot                             |
| <b>REF</b>      | Référence de catalogue                    |
| <b>CONTROL</b>  | Contrôle                                  |
| <b>I V D</b>    | Dispositif médical de diagnostic in vitro |
|                 | Fabricant                                 |
|                 | Contenu suffisant pour <n> tests          |
| WASH SOLN CONC  | Solution de lavage concentrée             |
| CAL 0           | Calibrateur zéro                          |
| CAL N           | Calibrateur #                             |
| CONTROL N       | Contrôle #                                |
| Ag 125I         | Traceur                                   |
| Ab 125I         | Traceur                                   |
| Ag 125I CONC    | Traceur concentré                         |
| Ab 125I CONC    | Traceur concentré                         |
|                 | Tubes                                     |
| INC BUF         | Tampon d'incubation                       |
| ACETONITRILE    | Acétonitrile                              |
| SERUM           | Sérum                                     |
| DIL SPE         | Diluant du spécimen                       |
| DIL BUF         | Tampon de dilution                        |
| ANTISERUM       | Antisérum                                 |
| IMMUNOADSORBENT | Immunoabsorbant                           |
| DIL CAL         | Diluant de calibrateur                    |
| REC SOLN        | Solution de reconstitution                |
| PEG             | Glycol Polyéthylène                       |
| EXTR SOLN       | Solution d'extraction                     |
| ELU SOLN        | Solution d'élution                        |
| GEL             | Cartouches Bond Elut Silica               |
| PRE SOLN        | Solution de pré-traitement                |
| NEUTR SOLN      | Solution de neutralisation                |
| TRACEUR BUF     | Tampon traceur                            |
| <b>TIT</b>      | 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                    |

|                 | <b><u>Gebrauchte Symbolen</u></b> |
|-----------------|-----------------------------------|
|                 | Gebrauchsanweisung beachten       |
|                 | Lagern bei                        |
|                 | Verwendbar bis                    |
| <b>LOT</b>      | Chargenbezeichnung                |
| <b>REF</b>      | Bestellnummer                     |
| <b>CONTROL</b>  | Kontrolle                         |
| <b>I V D</b>    | 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                     |
| <b>U U</b>      | 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                 |

|                 | <b><u>Gebruikte symbolen</u></b>             |
|-----------------|--|
|                 | Raadpleeg de gebruiksaanwijzing              |
|                 | Bewaartemperatuur                            |
|                 | Houdbaar tot                                 |
| <b>LOT</b>      | Lotnummer                                    |
| <b>REF</b>      | Catalogusnummer                              |
| <b>CONTROL</b>  | Controle                                     |
| <b>I V D</b>    | Medisch hulpmiddel voor in-vitro diagnostiek |
|                 | Fabrikant                                    |
|                 | Inhoud voldoende voor <n> testen             |
| WASH SOLN CONC  | Wasoplossing, geconcentreerd                 |
| CAL 0           | Nulkalibrator                                |
| CAL N           | Kalibrator #                                 |
| CONTROL N       | Controle #                                   |
| Ag 125I         | Tracer                                       |
| Ab 125I         | Tracer                                       |
| Ag 125I CONC    | Tracer geconcentreerd                        |
| Ab 125I CONC    | Tracer geconcentreerd                        |
|                 | Buisjes                                      |
| INC BUF         | Incubatiebuffer                              |
| ACETONITRILE    | Acetonitrile                                 |
| SERUM           | Serum  |
| DIL SPE         | Specimen diluent                             |
| DIL BUF         | Verdunningsbuffer                            |
| ANTISERUM       | Antiserum                                    |
| IMMUNOADSORBENT | Immunoabsorbent                              |
| DIL CAL         | Kalibratorverdunner                          |
| REC SOLN        | Reconstitutieoplossing                       |
| PEG             | Polyethyleen glycol                          |
| EXTR SOLN       | Extractieoplossing                           |
| ELU SOLN        | Elutieoplossing                              |
| GEL             | Bond Elut Silica kolom                       |
| PRE SOLN        | Pre-behandelingsoplossing                    |
| NEUTR SOLN      | Neutralisatieoplossing                       |
| TRACEUR BUF     | Tracerbuffer                                 |
| <b>TIT</b>      | 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        | Verzuringbuffer                              |

|                 | <b><u>Símbolos utilizados</u></b>            |
|-----------------|--|
|                 | Consultar las instrucciones de uso           |
|                 | Limitación de temperatura                    |
|                 | Fecha de caducidad                           |
| <b>LOT</b>      | Código de lote                               |
| <b>REF</b>      | Número de catálogo                           |
| <b>CONTROL</b>  | Control                                      |
| <b>I V D</b>    | 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                           |
| <b>TLU</b>      | 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                      |

|                 | <b><u>Simboli utilizzati</u></b>        |
|-----------------|---|
|                 | Consultare le istruzioni per l'uso      |
|                 | Limitazioni di temperatura              |
|                 | Utilizzare entro                        |
| <b>LOT</b>      | Numero di lotto                         |
| <b>REF</b>      | Numero di catalogo                      |
| <b>CONTROL</b>  | Controllo                               |
| <b>I V D</b>    | Dispositivo medico-diagnostico in vitro |
|                 | Fabbricante                             |
|                 | Contenuto sufficiente per <n> saggi     |
| WASH SOLN CONC  | Tampone di lavaggio concentrato         |
| CAL 0           | Calibratore zero                        |
| CAL N           | Standard #                              |
| CONTROL N       | Controllo #                             |
| Ag 125I         | Marcato                                 |
| Ab 125I         | Marcato                                 |
| Ag 125I CONC    | Marcato concentrato                     |
| Ab 125I CONC    | Marcato concentrato                     |
|                 | Provette                                |
| INC BUF         | Tampone incubazione                     |
| ACETONITRILE    | Acetonitrile                            |
| SERUM           | Siero                                   |
| DIL SPE         | Diluyente campione                      |
| DIL BUF         | Tampone diluizione                      |
| ANTISERUM       | Antisiero                               |
| IMMUNOADSORBENT | Immunoassorbente                        |
| DIL CAL         | Diluyente calibratore                   |
| REC SOLN        | Soluzione di ricostituzione             |
| PEG             | Polietilenglicole                       |
| EXTR SOLN       | Soluzione di estrazione                 |
| ELU SOLN        | Soluzione di eluizione                  |
| GEL             | Cartucce di silice bond elut            |
| PRE SOLN        | Soluzione di pretrattamento             |
| NEUTR SOLN      | Soluzione di neutralizzazione           |
| TRACEUR BUF     | Tracer Buffer                           |
| <b>U U</b>      | 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                    |



|                 | <b><u>Επεξήγηση συμβόλων</u></b>                 |
|-----------------|--|
|                 | Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης                |
|                 | Θερμοκρασία αποθήκευσης                          |
|                 | Ημερομηνία λήξης                                 |
| <b>LOT</b>      | Αριθμός παρτίδας                                 |
| <b>REF</b>      | Αριθμός καταλόγου                                |
| <b>CONTROL</b>  | Πρότυπο ελέγχου                                  |
| <b>I V D</b>    | In Vitro Διαγνωστικό Ιατροτεχνολογικό προϊόν     |
|                 | Κατασκευαστής                                    |
|                 | Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις            |
| WASH SOLN CONC  | Συμπυκνωμένο διάλυμα έκπλυσης                    |
| CAL 0           | Μηδενικός βαθμονομητής                           |
| CAL N           | Βαθμονομητής #                                   |
| CONTROL N       | Ορός ελέγχου #                                   |
| Ag 125I         | Ιχνηθέτης  |
| Ab 125I         | Ιχνηθέτης  |
| Ag 125I CONC    | Χρωμογόνος Ιχνηθέτης                             |
| Ab 125I CONC    | Χρωμογόνος Ιχνηθέτης                             |
|                 | Σωληνάκια  |
| INC BUF         | Ρυθμιστικό διάλυμα επώασης                       |
| ACETONITRILE    | Ακετονιτρίλιο                                    |
| SERUM           | Ορός   |
| DIL SPE         | Διάλυμα αραιώσεως δειγμάτων                      |
| DIL BUF         | Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσεως                     |
| ANTISERUM       | Αντιορός   |
| IMMUNOADSORBENT | Ανοσοπροσροφητικό                                |
| DIL CAL         | Αραιωτικό βαθμονομητών                           |
| REC SOLN        | Διάλυμα ανασύστασης                              |
| PEG             | Πολυαιθυλενογλυκόλη                              |
| EXTR SOLN       | Διάλυμα εκχύλισης                                |
| ELU SOLN        | Διάλυμα έκλυσης                                  |
| GEL             | Φύσιγγες πυριτίου Bond Elut                      |
| PRE SOLN        | Διάλυμα προεπεξεργασίας                          |
| NEUTR SOLN      | Διάλυμα εξουδετέρωσης                            |
| TRACEUR BUF     | Ρυθμιστικό διάλυμα                               |
| <b>μπλ</b>      | 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                         |

|                 | <b><u>Símbolos utilizados</u></b>          |
|-----------------|--|
|                 | Consulte instruções de utilização          |
|                 | Temperatura de conservação                 |
|                 | Utilizar antes de                          |
| <b>LOT</b>      | Código de lote                             |
| <b>REF</b>      | Número de catálogo                         |
| <b>CONTROL</b>  | Controlo                                   |
| <b>I V D</b>    | 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         | Diluyente do calibrador                    |
| REC SOLN        | Solução de Reconstituição                  |
| PEG             | Poliétileno-glicol                         |
| EXTR SOLN       | Solução de Extração                        |
| ELU SOLN        | Solução de Eluição                         |
| GEL             | Cartuchos de sílica Bond Elut              |
| PRE SOLN        | Solução de pré-tratamento                  |
| NEUTR SOLN      | Solução de neutralização                   |
| TRACEUR BUF     | Tampão Marcador                            |
| <b>TLT</b>      | Placa de micro titulação                   |
| Ab HRP          | HRP Conjugação                             |
| Ag HRP          | HRP Conjugação                             |
| Ab HRP CONC     | HRP Conjugação concentrada                 |
| Ag HRP CONC     | HRP Conjugação concentrada                 |
| CONJ BUF        | Conjuge o tampão                           |
| CHROM TMB CONC  | Cromogénica TMB concentrada                |
| CHROM TMB       | Solução Cromogénica TMB                    |
| SUB BUF         | Tampão de substrato                        |
| STOP SOLN       | Solução de Paragem                         |
| INC SER         | Soro de incubação                          |
| BUF             | Tampão                                     |
| Ab AP           | AP Conjugação                              |
| SUB PNPP        | Substrato PNPP                             |
| BIOT CONJ CONC  | Concentrado conjugado de biotina           |
| AVID HRP CONC   | Concentrado HRP de avidina                 |
| ASS BUF         | Tampão de ensaio                           |
| Ab BIOT         | Conjugado de biotina                       |
| Ab              | Anticorpo específico                       |
| SAV HRP CONC    | Estreptavidina HRP concentrado             |
| NSB             | Ligações não específicas                   |
| 2nd Ab          | Anticorpo secundário                       |
| ACID BUF        | Tampão de acidificação                     |