



ANDROSTENEDIONE- RIA-CT

KIP0451

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
Web: www.ibl-america.com

LOT : 110706/1



en

Read entire protocol before use.

ANDROSTENEDIONE-RIA-CT

I. INTENDED USE

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

II. GENERAL INFORMATION

- A. Proprietary name : DIAsource ANDROSTENEDIONE-RIA-CT Kit
- B. Catalog number : KIP0451 : 96 tests
- C. Manufactured by : DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue 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

A. Biological activity

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

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

B. Clinical applications

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

IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

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

V. REAGENTS PROVIDED

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

Note : Use the zero calibrator for sample dilutions.

VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

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

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

VII. REAGENT PREPARATION

- A. **Calibrators** : Reconstitute the calibrators with 0.5 ml distilled water
- B. **Controls**: Reconstitute the controls with 0.5 ml distilled water.
- C. **Working Wash solution**: Prepare an adequate volume of Working Wash solution by adding 69 volumes of distilled water to 1 volume of Wash Solution (70x). Use a magnetic stirrer to homogenize. Discard unused Working Wash solution at the end of the day.

VIII. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

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

IX. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

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

$$Y (\text{Hep. plasma}) = 0.94 \times (\text{serum}) + 0.02 \quad r = 0.98 \quad n = 17$$

$$Y (\text{EDTA plasma}) = 1.01 \times (\text{serum}) - 0.03 \quad r = 0.95 \quad n = 17$$

X. PROCEDURE

A. Handling notes

Do not use the kit or components beyond expiry date. Do not mix materials from different kit lots. Bring all the reagents to room temperature prior to use.
 Thoroughly mix all reagents and samples by gentle agitation or swirling. In order to avoid cross-contamination, use a clean disposable pipette tip for the addition of each reagent and sample.
 High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision. Respect the incubation times.
 Prepare a calibration curve for each run, do not use data from previous runs.

B. Procedure

1. Label coated tubes in duplicate for each calibrator, control and sample. For the determination of total counts, label 2 normal tubes.
2. Briefly vortex calibrators, controls and samples and dispense 25 μl of each into respective tubes.
3. Dispense 250 μl of ^{125}I odine labelled Androstenedione into each tube, including the uncoated tubes for total counts.
4. Shake the tube rack gently by hand to liberate any trapped air bubbles.
5. Incubate for 1 hour at room temperature with continuous shaking.
6. Aspirate (or decant) the content of each tube (except total counts). Be sure that the plastic tip of the aspirator reaches the bottom of the coated tube in order to remove all the liquid.
7. Wash tubes with 2 ml Working Wash solution (except total counts) and aspirate (or decant). Avoid foaming during the addition of the Working Wash solution.
8. Let the tubes stand upright for two minutes and aspirate the remaining drop of liquid.
9. Count tubes in a gamma counter for 60 seconds.

XI. CALCULATION OF RESULTS

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

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

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

XII. TYPICAL DATA

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

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

XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

A. Detection limit

Twenty zero calibrators were assayed along with a set of other calibrators. The detection limit, defined as the apparent concentration two standard deviations below the average counts at zero binding, was 0.03 ng/ml.

B. Specificity

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

| Compound | Cross-Reactivity (%) |
|----------------------------------|----------------------|
| Androsterone | 0.0566 |
| Cortisol | 0.0148 |
| Corticosterone | 0.0047 |
| Cortisone | 0.0099 |
| DHEA | 0.0155 |
| DHEA-SO ₄ | 0.0009 |
| 21-Deoxycortisone | 0.0006 |
| Estradiol-17 β | ND |
| Estriol | ND |
| Estrone | 0.0270 |
| Etiocolanolone | 0.0422 |
| 17 α -hydroxypregnolone | ND |
| 17 α -Hydroxyprogesterone | 0.0840 |
| Isoandrosterone | 0.0112 |
| Pregnenolone | ND |
| Progesterone | 0.0168 |
| Spironolactone | 0.0006 |
| 5 α -Dihydrotestosterone | 0.0105 |
| Testosterone | 0.2406 |

Note : This table shows the cross-reactivity for the anti Androstenedione.

ND : not detectable

C. Precision

INTRA-ASSAY PRECISION

INTER-ASSAY PRECISION

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

SD: Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

D. Accuracy

DILUTION TEST

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

Samples were diluted with the zero calibrator.

RECOVERY TEST

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

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

E. Time delay between last calibrator and sample dispensing

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

TIME DELAY

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

XIV. INTERNAL QUALITY CONTROL

- If the results obtained for Control 1 and/or Control 2 are not within the range specified on the vial label, the results cannot be used unless a satisfactory explanation for the discrepancy has been given.
- If desirable, each laboratory can make its own pools of control samples, which should be kept frozen in aliquots.
- Acceptance criteria for the difference between the duplicate results of the samples should rely on Good Laboratory Practises.

XV. REFERENCE INTERVALS

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

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

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

XVI. PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

For *in vitro* diagnostic use only.

This kit contains ^{125}I (half-life: 60 days), emitting ionizing X (28 keV) and γ (35.5 keV) radiations.

This radioactive product can be transferred to and used only by authorized persons; purchase, storage, use and exchange of radioactive products are subject to the legislation of the end user's country. In no case the product must be administered to humans or animals.

All radioactive handling should be executed in a designated area, away from regular passage. A logbook for receipt and storage of radioactive materials must be kept in the lab. Laboratory equipment and glassware, which could be contaminated with radioactive substances, should be segregated to prevent cross contamination of different radioisotopes.

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

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

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

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

Do not smoke, drink, eat or apply cosmetics in the working area. Do not pipette by mouth. Use protective clothing and disposable gloves.

XVII. BIBLIOGRAPHY

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

XVIII. SUMMARY OF THE PROTOCOL

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

| | | |
|-------------------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| DIAsource Catalogue Nr : KIP0451 | P.I. Number : 1700460/en | Revision nr : 110706/1 |
|-------------------------------------|-----------------------------|---------------------------|



fr

Lire entièrement le protocole avant utilisation.

ANDROSTENEDIONE-RIA-CT

I. BUT DU DOSAGE

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

II. INFORMATIONS GENERALES

- A. Nom du produit : DIAsource ANDROSTENEDIONE-RIA-CT kit
- B. Numéro de catalogue: KIP0451 : 96 tests
- C. Fabriqué par : DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue 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

A. Activité biologique

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

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

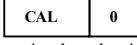
B. Applications cliniques

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

IV. PRINCIPE DU DOSAGE

Une quantité fixe d'Androsténédione marquée à l'¹²⁵I est en compétition avec l'Androsténédione à mesurer et présente dans l'échantillon ou dans le calibrateur pour une quantité fixe d'anticorps immobilisés sur les parois du tube en polystyrène. Après 1 heure d'incubation à température ambiante, le liquide est aspiré pour terminer la réaction de compétition. Les tubes sont lavés avec 2 ml de Solution de Lavage et aspirés à nouveau. Une courbe de calibration est réalisée et la concentration en Androsténédione des échantillons est déterminée par interpolation de la dose sur la courbe de calibration.

V. REACTIFS FOURNIS

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

Note : Utiliser le calibrateur zéro pour la dilution des échantillons

VI. MATERIEL NON FOURNI

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

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

VII. PREPARATION DES REACTIFS

- A. **Calibrateurs** : Reconstituer les calibrateurs avec 0,5 ml d'eau distillée.
- B. **Contrôles** : Reconstituer les contrôles avec 0,5 ml d'eau distillée.
- C. **Solution de Lavage** : Préparer un volume adéquat de Solution de Lavage en ajoutant 69 volumes d'eau distillée à 1 volume de Solution de Lavage (70x). Utiliser un agitateur magnétique pour homogénéiser. Eliminer la Solution de Lavage non utilisée à la fin de la journée.

VIII. STOCKAGE ET DATE D'EXPIRATION DES REACTIFS

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

IX. PREPARATION ET STABILITE DE L'ECHANTILLON

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

$$Y (\text{Hep. plasma}) = 0,94 \times (\text{sérum}) + 0,02 \quad r = 0,98 \quad n = 17$$

$$Y (\text{EDTA plasma}) = 1,01 \times (\text{sérum}) - 0,03 \quad r = 0,95 \quad n = 17$$

X. MODE OPERATOIRE

A. Notes de manipulation

Ne pas utiliser la trousse ou ses composants après avoir dépassé la date d'expiration. Ne pas mélanger du matériel provenant de trousse de lots différents. Mettre tous les réactifs à température ambiante avant utilisation.

Mélanger à fond tous les réactifs et les échantillons sous agitation douce. Pour éviter toute contamination croisée, utiliser une nouvelle pointe de pipette pour l'addition de chaque réactif et échantillon.

Des pipettes de haute précision ou un équipement de pipetage automatique permettent d'augmenter la précision. Respecter les temps d'incubation.

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

B. Mode opératoire

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

XI. CALCUL DES RESULTATS

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

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

3. Utiliser un "3 cycle semi-logarithmic" ou un papier graphique "logit-log", porter en ordonnée les valeurs exprimées en pourcentage de liaison (B/B₀(%)) de chaque point de calibration et en abscisse leur concentration respective en Androsténédione, écarter les valeurs aberrantes.

4. Des méthodes informatiques peuvent aussi être utilisées pour construire la courbe de calibration. Si un système d'analyse de traitement informatique des données est utilisé, il est recommandé d'utiliser la fonction « 4 paramètres » du lissage de courbes.
5. L'interpolation des valeurs de chaque échantillon ($B/B_0(\%)$) détermine les concentrations en Androsténédione à partir de la courbe de calibration.
6. Pour chaque essai, le pourcentage total de traceur lié en absence d'Androsténédione non marquée (B_0/T) doit être vérifié.

XII. DONNEES TYPES

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

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

XIII. PERFORMANCE ET LIMITES DU DOSAGE

A. Limite de détection

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

La limite de détection, définie comme la concentration apparente située 2 déviations standards en-dessous de la moyenne déterminée à la fixation zéro, était de 0,03 ng/ml.

B. Spécificité

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

| Composé | Réactivité Croisée (%) |
|----------------------------------|------------------------|
| Androstérone | 0,0566 |
| Cortisol | 0,0148 |
| Corticostérone | 0,0047 |
| Cortisone | 0,0099 |
| DHEA | 0,0155 |
| DHEA-SO ₄ | 0,0009 |
| 21-Déoxycortisone | 0,0006 |
| Estradiol-17 β | ND |
| Estriol | ND |
| Estrone | 0,0270 |
| Etiocolanolone | 0,0422 |
| 17 α -hydroxypregnénolone | ND |
| 17 α -Hydroxyprogesterone | 0,0840 |
| Isoandrostérone | 0,0112 |
| Pregnénolone | ND |
| Progéstérone | 0,0168 |
| Spirolactone | 0,0006 |
| 5 α -Dihydrotestostérone | 0,0105 |
| Testostérone | 0,2406 |

Note: cette table montre la réactivité croisée pour l'anti-Androsténédione

ND : n'est pas détectable

C. Précision

INTRA-ESSAI

INTER-ESSAI

| Sérum | N | $\bar{X} \pm SD$ (ng/ml) | CV (%) | Sérum | N | $\bar{X} \pm SD$ (ng/ml) | CV (%) |
|-------|----|--------------------------|--------|-------|----|--------------------------|--------|
| A | 10 | 0,36 ± 0,02 | 4,5 | A | 10 | 0,42 ± 0,04 | 9,0 |
| B | 10 | 6,04 ± 0,19 | 3,2 | B | 10 | 1,90 ± 0,11 | 5,9 |

SD : Déviation Standard; CV: Coefficient de variation

D. Exactitude

TEST DE DILUTION

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

Les échantillons ont été dilués avec le Calibrateur zéro.

TEST DE RECUPERATION

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

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

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

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

DELAI

| Sérum (ng/ml) | 0' | 12' | 24' |
|---------------|--------------|--------------|--------------|
| | 0,49 1,96 | 0,55 2,13 | 0,45 2,08 |

XIV. CONTRÔLE QUALITÉ INTERNE

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

XV. VALEURS ATTENDUES

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

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

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

XVI. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

Sécurité

Pour utilisation en diagnostic *in vitro* uniquement.

Cette trousse contient de l'¹²⁵I (demi-vie: 60 jours), une matière radioactive émettant des rayonnements ionisants X (28 keV) et γ (35,5 keV).

Ce produit radioactif peut uniquement être reçu, acheté, possédé ou utilisé par des personnes autorisées; l'achat, le stockage, l'utilisation et l'échange de produits radioactifs sont soumis à la législation du pays de l'utilisateur final. Ce produit ne peut en aucun cas être administré à l'homme ou aux animaux.

Toutes les manipulations radioactives doivent être exécutées dans un secteur désigné, éloigné de tout passage. Un journal de réception et de stockage des matières radioactives doit être tenu à jour dans le laboratoire. L'équipement de laboratoire et la verrerie, qui pourrait être contaminée avec des substances radioactives, doivent être isolés afin d'éviter la contamination croisée de plusieurs isotopes.

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

Les composants de sang humain inclus dans ce kit ont été évalués par des méthodes approuvées par l'Europe et/ou la FDA et trouvés négatifs pour HBsAg, l'anti-HCV, l'anti-HIV-1 et 2. Aucune méthode connue ne peut offrir l'assurance complète que des dérivés de sang humain ne transmettront pas d'hépatite, le sida ou toute autre infection. Donc, le traitement des réactifs, du sérum ou des échantillons de plasma devront être conformes aux procédures locales de sécurité. Tous les produits animaux et leurs dérivés ont été collectés d'animaux sains. Les composants bovins proviennent de pays où l'ESB n'a pas été détectée. Néanmoins, les composants contenant des substances animales devront être traités comme potentiellement infectieux.

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

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

XVII. BIBLIOGRAPHIE

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

XVIII. RESUME DU PROTOCOLE

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

| | | |
|--|-------------------------------|----------------------------------|
| Numéro de catalogue DIAsource : KIP0451 | Numéro de P.I.: 1700460/fr | Numéro de révision : 110706/1 |
|--|-------------------------------|----------------------------------|



de

Vor Gebrauch des Kits lesen Sie bitte diese Packungsbeilage.

ANDROSTENEDIONE-RIA-CT

I. VERWENDUNGSZWECK

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

II. ALLGEMEINE INFORMATION

- A. **Handelsbezeichnung :** DIAsource ANDROSTENEDIONE-RIA-CT Kit
- B. **Katalognummer :** KIP0451 : 96 Tests
- C. **Hergestellt von :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue 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

III. KLINISCHER HINTERGRUND

A. Biologische Aktivität

4-Androsten-3, 17-dion (Androstendion) ist ein C19-Steroid. Es wird in den Nebennieren und den Gonaden produziert. Androstendion ist ein unmittelbarer Vorläufer von Testosteron und Östron, die beide in der Folge zu Östradiol umgewandelt werden können. Wegen der Anwesenheit einer 17-Oxo- (anstelle von Hydroxy-) Gruppe hat Androstendion eine relativ schwache androgene Aktivität, die auf $\leq 20\%$ von Testosteron geschätzt wird. Obwohl es ein schwaches Androgen ist, kann der Androstendion-Spiegel im Serum Testosteron im gesunden und kranken Zustand übersteigen; die Werte von Androstendion-Sekretion und -Produktion übersteigen bei Frauen jene von Testosteron und es kommt zu einer signifikanten extra-adrenalen Konversion von Androstendion in Testosteron. Weiters ist die Affinität des geschlechtshormonbindenden Globulins für Androstendion viel geringer als für Testosteron oder Östradiol (1-3).

Die physiologische Rolle von Androstendion ist nicht gut definiert. Androstendion-Werte im Serum sind in fötalem und neonatalem Serum hoch, nehmen während der Kindheit ab und steigen während der Pubertät an. In normalen pubertären und erwachsenen Männern stammt der Großteil von Androstendion aus den Hoden, entweder direkt oder aus Konversion von Testosteron, während in normalen erwachsenen Frauen essenziell äquivalente Mengen von Androstendion durch Nebenniere und Ovarien produziert werden (2,3). Erhöhte Androstendion-Werte können bei der Entwicklung von sekundärer Geschlechtsbehaarung während der Adrenarche eine Rolle spielen. Androstendion-Werte im Serum weisen im Tagesverlauf eine signifikante Schwankung auf, die von der Sekretion von ACTH abhängt. Die Androstendion-Produktion durch die Ovarien wird durch das luteinisierende Hormon stimuliert, und die Androstendion-Werte im Serum variieren mit dem Menstruationszyklus (3). Die Androstendion-Produktion durch die Nebennieren nimmt sowohl bei Frauen als auch bei Männern mit fortschreitendem Alter ab. Darüber hinaus sinkt die Androstendion-Produktion durch die Ovarien nach der Menopause (3).

B. Klinische Anwendungen

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

IV. GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

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

V. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

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

Bemerkung: Benutzen Sie den Null-Kalibrator für Serumverdünnungen.

VI. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

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

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

VII. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Kalibratoren:** Rekonstituieren Sie die Kalibratoren mit 0,5 ml dest. Wasser.
- Kontrollen:** Rekonstituieren Sie die Kontrollen mit 0,5 ml dest. Wasser.
- Waschlösung:** Zur Vorbereitung eines angemessenen Volumens nutzbarer Waschlösung, mischen Sie zu einem Volumen Waschlösung (70x) 69 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 die Kalibratoren und Kontrollen eine Woche bei 2 bis 8°C stabil. Für eine längere Aufbewahrung sollten diese Reagenzien aliquotiert und bei -20°C eingefroren werden während max. 3 Monaten. Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.
- Die Waschlösung sollte frisch hergestellt und am selben Tag aufgebraucht werden.
- Wenn der Tracer nach der ersten Benutzung wieder im gutverschlossenen Originalgefäß bei 2 bis 8°C aufbewahrt wird, ist er bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.
- Veränderungen im Aussehen der Kitkomponenten können auf Instabilität bzw. Zerfall hindeuten.

IX. PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG

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

X. DURCHFÜHRUNG

A. Bemerkungen zur Durchführung

Verwenden Sie den Kit oder dessen Komponenten nicht nach dem Verfallsdatum.
 Vermischen Sie nie Materialien von unterschiedlichen Kit-Chargen.
 Bringen Sie alle Reagenzien vor der Verwendung auf Raumtemperatur.
 Mischen Sie alle Reagenzien und Proben gründlich durch sanftes Schütteln oder Rühren.
 Verwenden Sie saubere Einwegpipettenspitzen, um Kreuzkontamination zu vermeiden. Präzisionspipetten oder ein automatisches Pipettensystem 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

- Beschriften Sie je 2 beschichtete Röhrchen für jeden Kalibrator, jede Kontrolle und jede Probe. Zur Bestimmung der Gesamtaktivität, beschriften Sie 2 normale Röhrchen.
- Vortexen Sie Kalibratoren, Kontrollen und Proben kurz und geben Sie 25 µl von jedem in ihre Röhrchen.
- Geben Sie 250 µl des ^{125}I -Iod-markierten ANDROSTENDION in jedes Röhrchen, einschließlich der unbeschichteten Röhrchen für die Gesamtaktivität.
- Schütteln Sie vorsichtig die Halterung mit den Röhrchen um Blasen zu entfernen.
- Inkubieren Sie 1 Stunde bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln.
- Saugen Sie den Inhalt jedes Röhrchens ab (oder dekantieren Sie) (außer Gesamtaktivität). Vergewissern Sie sich, dass die Plastikspitze des Absaugers den Boden des beschichteten Röhrchens erreicht, um die gesamte Flüssigkeit zu entfernen.
- Waschen Sie die Röhrchen mit 2 ml Waschlösung (außer Gesamtaktivität) und saugen Sie ab (oder dekantieren Sie). Vermeiden Sie Schaumbildung bei Zugabe der Waschlösung.
- Lassen Sie die Röhrchen 2 Minuten aufrecht stehen, und saugen Sie den verbleibenden Flüssigkeitstropfen ab.
- Werten Sie die Röhrchen in einem Gamma-Counter über 60 Sekunden aus.

XI. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

- Berechnen Sie den Durchschnitt aus den Doppelbestimmungen.
- Berechnen Sie die gebundene Radioaktivität als Prozentsatz des am Null-Kalibratorpunkt (0) bestimmten Wertes nach folgender Formel:

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

3. Verwenden Sie semi-logarithmisches oder doppelt-logarithmisches Millimeterpapier (über 3 Größenordnungen), tragen Sie die (B/B₀(%))-Werte für jeden Kalibratorpunkt ein als Funktion der ANDROSTENDION-Konzentration für jeden Kalibratorpunkt. Schließen Sie offensichtliche „Ausreißer“ aus.
4. Computergestützte Methoden können ebenfalls zur Erstellung der Kalibrationskurve verwendet werden. Falls die Ergebnisberechnung mit dem Computer durchgeführt wird, empfehlen wir die Berechnung mit einer „4 Parameter“-Kurvenfunktion.
5. Bestimmen Sie die ANDROSTENDION-Konzentrationen der Proben durch Interpolation der Probenwerte (B/B₀(%)) aus der Referenzkurve.
6. Bei jedem Assay muss der Prozentsatz des gesamten gebundenen Tracers ohne unmarkiertes ANDROSTENDION (B₀/T) geprüft werden.

XII. TYPISCHE WERTE

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

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

XIII. LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK

A. Nachweisgrenze

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

Die Nachweisgrenze, definiert als die scheinbare Konzentration bei zwei Standardabweichungen unterhalb des gemessenen Durchschnittswerts bei Nullbindung, entsprach 0,03 ng/ml.

B. Spezifität

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

| Substanz | Kreuzreakтивität (%) |
|---------------------------------|----------------------|
| Androsteron | 0,0566 |
| Cortisol | 0,0148 |
| Corticosteron | 0,0047 |
| Cortison | 0,0099 |
| DHEA | 0,0155 |
| DHEA-SO ₄ | 0,0009 |
| 21-Deoxycortison | 0,0006 |
| Östradiol-17 β | NN |
| Östriol | ND |
| Östron | 0,0270 |
| Etiocolanolon | 0,0422 |
| 17 α -Hydroxypregnenolon | NN |
| 17 α -Hydroxyprogesteron | 0,0840 |
| Isoandrosteron | 0,0112 |
| Pregnenolon | NN |
| Progesteron | 0,0168 |
| Spirolacton | 0,0006 |
| 5 α -Dihydrotestosteron | 0,0105 |
| Testosteron | 0,2406 |

Bemerkung: Diese Tabelle zeigt die Kreuzreaktivität für die anti-ANDROSTENDION

NN: nicht nachweisbar

C. Präzision

INTRA-ASSAY PRÄZISION

INTER-ASSAY PRÄZISION

| Serum | N | $\text{\langle X \rangle \pm SD (ng/ml)}$ | CV (%) | Serum | N | $\text{\langle X \rangle \pm SD (ng/ml)}$ | CV (%) |
|-------|----|---|--------|-------|----|---|--------|
| A | 10 | 0,36 ± 0,02 | 4,5 | A | 10 | 0,42 ± 0,04 | 9,0 |
| B | 10 | 6,04 ± 0,19 | 3,2 | B | 10 | 1,90 ± 0,11 | 5,9 |

SD: Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

D. Genauigkeit

VERDÜNNUNGSTEST

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

Die Proben wurden mit Null-Kalibrator verdünnt.

WIEDERFINDUNGSTEST

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

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

E. Zeitverzögerung zwischen letzter Kalibrator- und Probenzugabe

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

ZEITABSTANDT

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

XIV. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

- Entsprechen die Ist-Werte nicht den auf den Fläschchen angegebenen Soll-Werten, können diese Werte, ohne treffende Erklärung für die Abweichungen, nicht weiterverarbeitet werden.
- Falls zusätzliche Kontrollen erwünscht sind, kann jedes Labor seinen eigenen Pool herstellen, der in Aliquots eingefroren werden sollte.
- Akzeptanzkriterien für die Differenz zwischen den Resultaten der Wiederholungstests anhand der Proben müssen auf Guter Laborpraxis beruhen.

XV. ZU ERWARTENDER BEREICH

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

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

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

XV. VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

Sicherheit

Nur für *in vitro* diagnostische Zwecke.

Dieser Kit enthält ^{125}I (Halbwertzeit: 60 Tagen), das ionisierende X (28 keV) und γ (35,5 keV) Strahlungen emittiert.

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

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

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

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

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

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

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

XVII. LITERATUR

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

XVIII. ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

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

| | | |
|-------------------------------------|------------------------------------|--|
| DIAsource Katalognummer: KIP0451 | Beipackzettelnummer: 1700460/de | Nummer der Originalausgabe: 110706/1 |
|-------------------------------------|------------------------------------|--|



nl

Lees het hele protocol vóór gebruik.

ANDROSTENEDIONE-RIA-CT

I. BEOOGD GEBRUIK

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

II. ALGEMENE INFORMATIE

- A. **Gedeponeerd handelsmerk:** DIAsource ANDROSTENEDIONE-RIA-CT kit
- B. **Catalogusnummer:** KIP0451: 96 testen.
- C. **Geproduceerd door:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue 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

A. Biologische activiteit

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

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

B. Klinische toepassingen

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

IV. BESCHRIJVING VAN DE METHODE

Een vaste hoeveelheid ^{125}I gelabeld Androstenedione concurreert met Androstenedione dat bepaald moet worden en aanwezig is in het monster of in de kalibrator voor een vast aantal plaatsen met antilichamen die geïmmobiliseerd zijn aan de wand van een buisje van polystyreen. Na een incubatieperiode van 1 uur bij kamertemperatuur, wordt de concurrentiereactie beëindigd door een aspiratiefase. Daarna worden de buisjes gewassen met 2 ml werk-wasoplossing en opnieuw afgezogen. Een kalibratiecurve wordt uitgezet en de concentraties van Androstenedione van de monsters worden bepaald door dosisinterpolatie van de kalibratiecurve.

V. GELEVERDE REAGENTIA

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

Opmerking: Gebruik de nulkalibrator voor monsterverdunningen

VI. NIET MEEGELEVERDE MATERIALEN

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

- Gedestilleerd water.
- Pipetten voor een volume van 50 μl en 500 μl (het gebruik van nauwkeurige pipetten met plastic wegwerp tips wordt aanbevolen).
- Vortexmenger.
- Magnetische roerder.
- Schudder voor de buisjes (400 rpm).
- Automatische spuit van 5 ml (type Cornwall) voor de wasfase.
- Afzuigsysteem (facultatief).
- Een gammateller die geschikt is voor de bepaling van ^{125}I . Een maximale telefficiëntie moet worden gegarandeerd.

VII. BEREIDING VAN HET REAGENS

- Kalibrators:** Reconstitueer de kalibrators met 0,5 ml gedestilleerd water.
- Controles:** Reconstitueer de controles met 0,5 ml gedestilleerd water.
- Werk-wasoplossing:** Bereid een voldoende hoeveelheid werk-wasoplossing door 69 eenheden gedestilleerd water toe te voegen aan 1 eenheid wasoplossing. Gebruik een magnetische roerder voor de homogenisering. Op het eind van de dag moet de ongebruikte werk-wasoplossing afgevoerd worden.

VIII. OPSLAG EN VERVALDATUM VAN REAGENTIA

- Vóór opening of reconstitutie zijn alle kitcomponenten houdbaar tot de vervaldatum, zoals vermeld op het etiket, indien zij bewaard werden bij 2 tot 8°C.
- Na reconstitutie zijn de kalibrators en controles gedurende 1 week houdbaar bij 2 tot 8°C. Voor een langere bewaartijd moeten aliquots gemaakt worden, die bij -20°C bewaard moeten worden. Vermijd herhaalde invriezing en onttdooing.
- 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 en plasmamonsters moeten bij 2-8°C bewaard worden.
- Indien de bepaling niet binnen 24 uur uitgevoerd wordt, dan wordt aanbevolen om ze bij -20°C te bewaren.
- Vermijd herhaalde invriezing en onttdooing.
- Serum en plasma leveren vergelijkbare resultaten op.

$$Y (\text{Hep. plasma}) = 0,94 \times (\text{serum}) + 0,02 \quad r = 0,98 \quad n = 17$$

$$Y (\text{EDTA plasma}) = 1,01 \times (\text{serum}) - 0,03 \quad r = 0,95 \quad n = 17$$

X. PROCEDURE

A. Opmerkingen bij de procedure

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

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

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

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

B. Procedure

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

XI. BEREKENING VAN DE RESULTATEN

- Bereken het gemiddelde voor de bepalingen in duplo.
- 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 Androstenedione concentratie van elk kalibratorpunt, op 3-cyclisch semi-logaritmisch of dubbellogaritmisch papier, verwerp hierbij de duidelijke uitschieters.

- Ook computergestuurde methoden kunnen worden gebruikt om de kalibratiecurve te vormen. Indien de resultaten automatisch verwerkt worden, wordt de 4 parameter logistische functie aanbevolen voor de gepaste curve.
- Bepaal de Androstenedione concentraties van de monsters uit de referentiecurve door de monsterwaarden ($B/B_0(\%)$) te interpoleren.
- Voor elke bepaling moet het totaalpercentage van de tracer, gebonden in afwezigheid van ongelabeld Androstenedione (B_0/T), gecontroleerd worden.

XII. KENMERKENDE GEGEVENS

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

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

XIII. EIGENSCHAPPEN EN GRENZEN

A. Detectielimiet

Twintig nukalibrators werden bepaald, samen met de serie andere kalibrators. De detectielimiet, omschreven als de schijnbare concentratie van twee standaarddeviaties onder de gemiddelde tellingen bij nulbinding, bedroeg 0,03 ng/ml.

B. Specificiteit

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

| Bestanddeel | Kruisreactiviteit (%) |
|----------------------------------|-----------------------|
| Androsterone | 0,0566 |
| Cortisol | 0,0148 |
| Corticosterone | 0,0047 |
| Cortisone | 0,0099 |
| DHEA | 0,0155 |
| DHEA-SO ₄ | 0,0009 |
| 21-Deoxycortisone | 0,0006 |
| Estradiol-17 β | ND |
| Estriol | ND |
| Estrone | 0,0270 |
| Etiocolanolone | 0,0422 |
| 17 α -hydroxypregnolone | ND |
| 17 α -Hydroxyprogesterone | 0,0840 |
| Isoandrosterone | 0,0112 |
| Pregnenolone | ND |
| Progesterone | 0,0168 |
| Spiromolactone | 0,0006 |
| 5 α -Dihydrotestosteron | 0,0105 |
| Testosterone | 0,2406 |

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

ND : niet detecteerbaar

C. Precisie

PRECISIE BINNEN EEN TEST

PRECISIE TUSSEN TESTEN

| Serum | N | $\bar{X} \pm SD$ (ng/ml) | VC (%) | Serum | N | $\bar{X} \pm SD$ (ng/ml) | VC (%) |
|-------|----|--------------------------|--------|-------|----|--------------------------|--------|
| A | 10 | 0,36 ± 0,02 | 4,5 | A | 10 | 0,42 ± 0,04 | 9,0 |
| B | 10 | 6,04 ± 0,19 | 3,2 | B | 10 | 1,90 ± 0,11 | 5,9 |

SD: standaarddeviatie; VC: variatiecoëfficiënt

D. Nauwkeurigheid

VERDUNNINGSTEST

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

Monsters werden verduld met de Nukalibrator.

RECOVERY-TEST

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

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

E. TijdsSpanne tussen de laatste kalibrator en distributie van het monster

Zoals hieronder weergegeven wordt, blijven de resultaten van de bepaling nauwkeurig, zelfs wanneer een monster 24 minuten na toevoeging van de kalibrator over de gecoate buisjes gedistribueerd wordt.

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

XIV. INTERNE KWALITEITSCONTROLE

- Indien de resultaten, die verkregen werden voor controle 1 en/of controle 2, niet binnen het bereik vallen zoals vermeld op het flaconetket, 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 controlematerialen maken, die dan in aliquots bewaard moeten worden in de diepvriezer.
- Aanvaardingscriteria voor het verschil tussen de resultaten in duplo van stalen moeten steunen op gangbare laboratoriumpraktijken.

XV. REFERENTIE-INTERVALS

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

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

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

XVI. VOORZORGSMAATREGELEN EN WAARSCHUWINGEN

Veiligheid

Uitsluitend voor in vitro diagnostisch gebruik.

Deze kit bevat ^{125}I (halfwaardetijd: 60 dagen), dat ioniserende X- (28 keV) en γ -stralen (35,5 keV) uitzendt.

Dit radioactieve product mag enkel overhandigd worden aan en gebruikt worden door bevoegd personeel; ontvangst, opslag, gebruik en overdracht van radioactieve producten zijn onderworpen aan de wetgeving van het land van de eindgebruiker. In geen geval mag het product toegediend worden aan mensen of dieren.

Alle handelingen met radioactief materiaal moeten plaatsvinden in een daartoe bestemde ruimte, waar uitsluitend bevoegd personeel toegelaten wordt. Een logboek met ontvangst en opslag van radioactieve materialen moet worden bijgehouden in het laboratorium. Laboratoriumapparatuur en glaswerk, dat eventueel gecontamineerd werd met radioactieve bestanddelen, moeten worden gesegregeerd om kruisbesmetting van verschillende radioisotopen te vermijden.

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

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

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

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

Niet roken, drinken, eten of cosmetica aanbrengen in de werkruimte. Niet met de mond pipetteren. Draag beschermende kleding en gebruik wegwerphandschoenen.

XVII. BIBLIOGRAFIE

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

XVIII. SAMENVATTING VAN HET PROTOCOL

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

| | | |
|---------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------|
| DIAsource catalogusnummer: KIP0451 | Bijsluiternummer : 1700460/nl | Revisienummer : 110706/1 |
|---------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------|



es

Leer el protocolo completo antes de usar.

ANDROSTENEDIONE-RIA-CT

I. INSTRUCCIONES DE USO

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

II. INFORMACIÓN GENERAL

- A. **Nombre:** DIAsource ANDROSTENEDIONE-RIA-CT Kit
- B. **Número de Catálogo:** KIP0451 : 96 tests
- C. **Fabricado por:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue 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

A. Actividad biológica

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

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

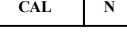
B. Aplicaciones clínicas

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

IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

Una cantidad fija de Androstenedione marcada con I^{125} compite con el Androstenedione a medir, presente en la muestra ó en el calibrador, por los puntos de unión del anticuerpo inmovilizado en las paredes de un tubo de poliestireno. Después de 1 hora de incubación a T.A., una aspiración termina con la reacción de competición. Los tubos se lavan con 2 ml de Solución de lavado y se aspiran otra vez. Se dibuja la curva de calibración y las concentraciones de Androstenedione de las muestras se determinan por interpolación de la dosis en la curva de calibración.

V. REACTIVOS SUMINISTRADOS

| Reactivos | Kit 96 test | Código de Color | Reconstitución |
|--|----------------------------|-----------------|---|
| Tubos recubiertos con anti DELTA 4 | 2 x 48 | amarillo | Listo para uso |
|  Ag  | 1 vial 26 ml 111 kBq | rojo | Listo para uso |
| TRAZADOR: Androstenedione marcado con I^{125} (grado HPLC) en tampón con caseína bovina y azida (<0,1%) | | | |
|  0 | 1 vial liofilizados | amarillo | Añadir 0,5 ml de agua destilada |
| Calibrador cero en suero humano con thymol | | | |
|  N | 5 viales liofilizados | amarillo | Añadir 0,5 ml de agua destilada |
| Calibradores Androstenedione - N = 1 al 5 (mirar los valores exactos en las etiquetas) en suero humano con thymol | | | |
|    | 1 vial 10 ml | marrón | Diluir 70 x con agua destilada (utilizar agitador magnético) |
| Solución de lavado (TRIS-HCl) | | | |
|  N | 2 viales liofilizados | plateado | Añadir 0,5 ml de agua destilada |
| Controles - N = 1 o 2 en suero humano con thymol | | | |

Nota: Para diluciones de muestras utilizar calibrador cero.

VI. MATERIAL NO SUMINISTRADO

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

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

VII. PREPARACIÓN REACTIVOS

- A. **Calibradores:** Reconstituir los calibradores con 0,5 ml de agua destilada.
- B. **Controles:** Reconstituir los controles con 0,5 ml de agua destilada.
- C. **Solución de lavado de trabajo:** Preparar el volumen necesario de Solución de lavado de trabajo mezclando 69 partes de agua destilada por 1 parte de Solución de lavado (70x). Utilizar un agitador magnético para homogeneizar. Desechar la solución de lavado de trabajo no utilizada al final del día.

VIII. ALMACENAJE Y CADUCIDADES DE LOS REACTIVOS

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

IX. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

- Las muestras de suero y 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.
- Suero o plasma presentan resultados similares.

$$Y \text{ (Hep. plasma)} = 0,94 x \text{ (serum)} + 0,02 \quad r = 0,98 \quad n = 17$$

$$Y \text{ (EDTA plasma)} = 1,01 x \text{ (serum)} - 0,03 \quad r = 0,95 \quad n = 17$$

X. PROTOCOLO

A. Notas de manejo

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

B. Protocolo

1. Marcar los tubos recubiertos por duplicado para cada uno de los estándares, muestras y controles. Para la determinación de las Cuentas Totales, marcar 2 tubos normales.
2. Agitar brevemente los calibradores, muestras y controles y dispensar 25 μ l de cada uno en sus respectivos tubos.
3. Dispensar 250 μ l de Androstenedione marcado con I^{125} en cada tubo, incluyendo los tubos no recubiertos a las Cuentas Totales.
4. Agitar suavemente la gradilla de tubos para soltar cualquier barbuja cautiva de las paredes de los tubos.
5. Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación constante.
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. Dejar los tubos en posición inversa durante 2 minutos y aspirar el líquido restante.
9. Medir la actividad de cada tubo durante 60 segundos en un Contador Gamma.

XI. CALCULO DE RESULTADOS

1. Calcular la media de los duplicados.
2. Calcular la radiactividad enlazada como un porcentaje de la unión con respecto al calibrador cero (0) de acuerdo con la siguiente 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/B0%) de cada calibrador frente a las contracciones del Androstenedione de cada calibrador, rechazando los extremos claros.

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

XII. EJEMPLO DE RESULTADOS

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

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

XIII. REALIZACIÓN Y LIMITACIONES

A. Límite de detección

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

El límite de detección, definido como la concentración aparente resultante de dos desviaciones estándares debajo de la media de enlace del calibrador cero, fue de 0,03 ng/ml.

B. Especificidad

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

| Componente | Reacción-cruzada (%) |
|----------------------------------|----------------------|
| Androsterona | 0,0566 |
| Cortisol | 0,0148 |
| Corticosterona | 0,0047 |
| Cortisona | 0,0099 |
| DHEA | 0,0155 |
| DHEA-SO ₄ | 0,0009 |
| 21-Deoxicortisona | 0,0006 |
| Estradiol-17 β | ND |
| Estriol | ND |
| Estrona | 0,0270 |
| Etiocolanolona | 0,0422 |
| 17 α -hidroxipregnolona | ND |
| 17 α -Hidroxiprogesterona | 0,0840 |
| Isoandrosterona | 0,0112 |
| Pregnenolona | ND |
| Progesterona | 0,0168 |
| Spirolactona | 0,0006 |
| 5 α -Dihidrotestosterona | 0,0105 |
| Testosterona | 0,2406 |

Nota: Esta tabla presenta la reacción cruzada para el anti Androstenedione

ND : no es detectable

C. Precision

PRECISION INTRA-ENSAYO

| Suero | N | $\text{\bar{x}} \pm \text{SD}$ (ng/ml) | CV (%) | Suero | N | $\text{\bar{x}} \pm \text{SD}$ (ng/ml) | CV (%) |
|-------|----|---|-----------|-------|----|---|-----------|
| A | 10 | 0,36 ± 0,02 | 4,5 | A | 10 | 0,42 ± 0,04 | 9,0 |
| B | 10 | 6,04 ± 0,19 | 3,2 | B | 10 | 1,90 ± 0,11 | 5,9 |

SD : Desviación Estándar; CV: Coeficiente de Variación

D. Exactitud

TEST DILUCIÓN

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

Las muestras fueron diluidas con el Calibrador cero.

TEST DE RECUPERACIÓN

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

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

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

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

TIEMPO DE ESPERA

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

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, los cuales se guardan en alícuotas congeladas.
- Los criterios de aceptación de la diferencia entre los resultados in duplo de las muestras se apoyan en las prácticas de laboratorio corrientes.

XV. INTERVALOS DE REFERENCIA

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

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

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

XVI. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Seguridad

Para uso solo en diagnóstico in vitro.

Este kit contiene I¹²⁵ (vida media : 60 días) emisor de rayos X (28 keV) y de rayos γ (35.5 keV) ionizantes.

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

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

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

Los componentes de sangre humana utilizados en este kit han sido testados por métodos aprobados por la CEE y/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 contenido substancias animales deberán ser consideradas como potencialmente infecciosas.

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

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

XVII. BIBLIOGRAFIA

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

XVIII. RESUMEN DEL PROTOCOLO

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

| | | |
|------------------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| DIAsource Catalogo Nr : KIP0451 | P.I. Numero : 1700460/es | Revisión nr : 110706/1 |
|------------------------------------|-----------------------------|---------------------------|

Fecha de la revisión : 2011-07-06



it

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

ANDROSTENEDIONE-RIA-CT

I. USO DEL KIT

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

II. INFORMAZIONI DI CARATTERE GENERALE

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

B. Numero di catalogo: KIP0451: 96 test

C. Prodotto da: DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue 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

A. Attività biologica

Il 4-Androsten-3, 17-dione (Androstenedione) è uno steroide C19. Viene prodotto dalle ghiandole surrenali e dalle gonadi. Il Androstenedione è un precursore immediato del Androstenedione sterone e dell'estrone, che possono ambedue essere convertiti successivamente in estradiolo. A causa della presenza di un gruppo 17-oxo (piuttosto che idrossile), Androstenedione presenta una attività androgena relativamente debole, stimata = 20% del testosterone. Nonostante mostri una debole attività androgena, i livelli serici di Androstenedione possono superare quelli di testosterone in condizioni normali o di malattia, le percentuali di secrezione e produzione di Androstenedione superano quelle di testosterone nelle donne e si verifica una significativa conversione extra-surrenale di Androstenedione in testosterone. Inoltre, l'affinità della SHBG (Sex Hormone-Binding Globulin) per il Androstenedione è molto minore rispetto a quella per il testosterone o per l'estradiolo (1 - 3).

Il ruolo fisiologico di Androstenedione non è ancora ben definito. I livelli serici di Androstenedione sono alti nel siero fetale e neonatale, diminuiscono durante l'infanzia e aumentano durante la pubertà. Nella pubertà normale e negli uomini adulti, la parte maggiore di Androstenedione deriva dai testicoli, direttamente o dalla conversione del testosterone, mentre nelle donne normali adulte, quantità essenzialmente equivalenti di Androstenedione vengono prodotte dalle surrenali e dalle ovaie (2,3). Livelli aumentati di Androstenedione potrebbero giocare un ruolo importante nello sviluppo dei peli sessuali secondari durante l'adrenarca. I livelli serici di Androstenedione mostrano una significativa variazione diurna in dipendenza della secrezione di ACTH. La produzione di Androstenedione ovarico viene stimolata dall'ormone luteinizante e i livelli serici di Androstenedione variano in base al ciclo mestruale (3). La produzione di Androstenedione surrenale cala gradualmente con l'età avanzata sia negli uomini che nelle donne. Inoltre, la produzione di Androstenedione ovarico cala dopo la menopausa (3).

B. Applicazioni cliniche

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

IV. PRINCIPIO DEL METODO

Una quantità definita di Androstenedione marcata con ^{125}I compete con il Androstenedione presente in calibratore e campioni per un numero definito di siti di un anticorpo adsorbito sulla superficie interna di provette di polistirene. Dopo 1 ore di incubazione a temperatura ambiente, la reazione di competizione viene interrotta per aspirazione della miscela di reazione. Le provette vengono quindi lavate con tamponi di lavaggio diluiti e aspirate. La concentrazione di Androstenedione nei campioni viene calcolata per interpolazione sulla curva calibratore.

V. REATTIVI FORNITI

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

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.

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

VII. PREPARAZIONE DEI REATTIVI

- Calibratori:** Ricostituire i calibratori con 0,5 ml di acqua distillata.
- Controlli:** Ricostituire i controlli con 0,5 ml di acqua distillata.
- Soluzione di lavoro del tampone di lavaggio:** Preparare la quantità necessaria di soluzione di lavoro del tampone di lavaggio aggiungendo 69 parti di acqua distillata ad una parte di tampone di lavaggio concentrato (70x). Usare un agitatore magnetico per rendere la soluzione omogenea. La soluzione di lavoro va scartata al termine della giornata.

VIII. CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI

- I reattivi non utilizzati sono stabili a 2-8°C fino alla data riportata su ciascuna etichetta.

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

IX. RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

- Conservare i campioni di siero e plasma a 2-8°C.
- Se non si desidera eseguire il dosaggio entro 24 ore dal prelievo, si raccomanda di conservare i campioni a -20°C.
- Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelamento dei campioni.
- Il siero e il plasma forniscono gli stessi valori.

$$Y(\text{Hep. plasma}) = 0,94 \times (\text{siero}) + 0,02 \quad r = 0,98 \quad n = 17$$

$$Y(\text{EDTA plasma}) = 1,01 \times (\text{siero}) - 0,03 \quad r = 0,95 \quad n = 17$$

X. METODO DEL DOSAGGIO

A. Avvertenze generali

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

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

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

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

B. Metodo del dosaggio

- Numerare le provette sensibilizzate necessarie per dosare in duplice ogni calibratore, campione o controllo. Numerare 2 provette non sensibilizzate per la determinazione dell'attività totale.
- Agitare brevemente su vortex calibratore, campioni e controlli. Dispensare 25 μl di calibratore, campioni e controlli nelle rispettive provette.
- Dispensare 250 μl di Androstenedione marcato con ^{125}I in tutte le provette, comprese quelle per l'attività totale.
- Scuotere gentilmente il portaprovette per liberare eventuali bolle d'aria intrappolate nel liquido contenuto nelle provette.
- Incubare 1 ora a temperatura ambiente in agitazione.
- 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.
- Lasciare decantare le provette in posizione verticale per due minuti circa e aspirare eventuali gocce di liquido residue.
- Contare tutte le provette per 1 minuto con il contatore gamma.

XI. CALCOLO DEI RISULTATI

- Calcolare la media delle determinazioni in duplice.
- 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).

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

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

XII. CARATTERISTICHE TIPICHE

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

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

XIII. CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO

A. Sensibilità

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

B. Specificità

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

| Composto | Cross-Reattività (%) |
|---------------------------------|-----------------------------|
| Androsterone | 0,0566 |
| Cortisolo | 0,0148 |
| Corticosterone | 0,0047 |
| Cortisone | 0,0099 |
| DHEA | 0,0155 |
| DHEA-SO ₄ | 0,0009 |
| 21-Deossicortisone | 0,0006 |
| Estradiolo-17 β | ND |
| Estriolo | ND |
| Estrone | 0,0270 |
| Etiocolanolone | 0,0422 |
| 17 α -idrossipregnolone | ND |
| 17 α -idrossiprogestrone | 0,0840 |
| Isoandrosterone | 0,0112 |
| Pregnenolone | ND |
| Progesterone | 0,0168 |
| Spironolattone | 0,0006 |
| 5 α -Dihdrotestosterone | 0,0105 |
| Testosterone | 0,2406 |

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

C. Precisione

| INTRA SAGGIO | | | | INTER SAGGIO | | | |
|--------------|----|---|--------|--------------|----|---|--------|
| Siero | N | $\text{\langle X \rangle \pm SD$ (ng/ml) | CV (%) | Siero | N | $\text{\langle X \rangle \pm SD$ (ng/ml) | CV (%) |
| A | 10 | $0,36 \pm 0,02$ | 4,5 | A | 10 | $0,42 \pm 0,04$ | 9,0 |
| B | 10 | $6,04 \pm 0,19$ | 3,2 | B | 10 | $1,90 \pm 0,11$ | 5,9 |

SD : Deviazione Standard; CV: Coefficiente di Variazione

D. Accuratezza

TEST DI DILUZIONE

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

I campioni sono stati diluiti con calibratore zero.

TEST DI RECUPERO

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

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

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

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

TEMPO TRASCORSO

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

XIV. CONTROLLO DI QUALITÀ INTERNO

- Se i risultati ottenuti dosando il Controllo 1 e il Controllo 2 non sono all'interno dei limiti riportati sull'etichetta dei flaconi, non è opportuno utilizzare i risultati ottenuti per i campioni, a meno che non si trovi una giustificazione soddisfacente.
 - Ogni laboratorio può preparare un proprio pool di sieri da utilizzare come controllo, da conservare congelato in aliquote.
 - I criteri di accettazione delle differenze tra i risultati in duplicato dei campioni devono basarsi sulla buona prassi di laboratorio.

XV. INTERVALLI DI RIFERIMENTO

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

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

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

XVI. PRECAUZIONI PER L'USO

Sicurezza

Il kit è solo per uso diagnostico in vitro.

Il kit contiene ^{125}I (emivita: 60 giorni) emettente raggi X (28 keV) e γ (35,5 keV) ionizzanti.

L'acquisto, la detenzione, l'utilizzo e il trasporto di materiale radioattivo sono soggetti a regolamentazione locale. In nessun caso il prodotto può essere somministrato ad esseri umani o animali.

Usare sempre guanti e camici da laboratorio quando si manipola materiale radioattivo. Le sostanze radioattive devono essere conservate in propri contenitori in appositi locali che devono essere interdetti alle persone non autorizzate. Deve essere tenuto un registro di carico e scarico del materiale radioattivo. Il materiale di laboratorio e la vetreria deve essere dedicato all'uso di isotopi specifici per evitare cross-contaminazioni.

In caso di contaminazione o dispersione di materiale radioattivo, fare riferimento alle norme locali di radioprotezione. I rifiuti radioattivi devono essere smaltiti secondo le norme locali di radioprotezione. Lo scrupoloso rispetto delle norme per l'uso di sostanze radioattive fornisce una protezione adeguata agli utilizzatori. I reattivi di origine umana presenti nel kit sono stati dosati con metodi approvati da organismi di controllo europei o da FDA e si sono rivelati negativi per HBs Ag, anti HCV, anti HIV1 e anti HIV2. Non sono disponibili metodi in grado di offrire la certezza assoluta che derivati da sangue umano non possano provocare epatiti, AIDS o trasmettere altre infezioni. Manipolare questi reattivi o i campioni di siero o plasma secondo le procedure di sicurezza vigenti.

Tutti i prodotti di origine animale o loro derivati provengono da animali sani. I componenti di origine bovina provengono da paesi dove non sono stati segnalati casi di BSE. E' comunque necessario considerare i prodotti di origine animale come potenziali fonti di infezioni.

Evitare ogni contatto dell'epidermide con i reattivi contenenti sodio azide come conservante. La sodio azide può reagire con piombo rame o ottone presenti nelle tubature di scarico per formare metallo-azidi esplosive. Smaltire questi reattivi facendo scorrere abbondante acqua negli scarichi.

Nei luoghi dove si usano sostanze radioattive non è consentito consumare cibi o bevande, fumare o usare cosmetici. Non pipettare i reattivi con pipette a bocca.

XVII. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

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

XVIII. SCHEMA DEL DOSAGGIO

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

| | | |
|--|-----------------------------|--------------------------------|
| Numero di catalogo di DIAsource : KIP0451 | P.I. numero : 1700460/it | Revisione numero : 110706/1 |
|--|-----------------------------|--------------------------------|



el

Διαβάστε ολόκληρο το πρωτόκολλο πριν από τη χρήση.

ANDROSTENEDIONE-RIA-CT

I. ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ

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

II. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

A. Εμπορική ονομασία: Kit ANDROSTENEDIONE-RIA-CT της DIAsource

B. Αριθμός καταλόγου: KIP0451: 96 προσδιορισμοί

C. Κατασκευάζεται από την: DIAsource ImmunoAssays S.A.

Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Για τεχνική βιοήθεια ή πληροφορίες σχετικά με παραγγελίες επικοινωνήστε στα:

Τηλ.: +32 (0)10 84.99.11

Φαξ: +32 (0)10 84.99.90

III. ΚΛΙΝΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

A. Βιολογική δράση

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

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

B. Κλινικές εφαρμογές

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

IV. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

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

V. ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

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

Σημείωση: Χρησιμοποιείτε το μηδενικό βαθμονομητή για αραιώσεις ορών.

VI. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

Τα ακόλουθα υλικά απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται στο κιτ:

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

VII. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ

- Βαθμονομητές:** Ανασυστήστε τους βαθμονομητές με 0,5 ml απεσταγμένου νερού.
- Οροί ελέγχου:** Ανασυστήστε τους ορούς ελέγχου με 0,5 ml απεσταγμένου νερού.
- Διάλυμα πλύσης εργασίας:** Προετοιμάστε επαρκή όγκο διαλύματος πλύσης εργασίας με προσθήκη 69 όγκων απεσταγμένου νερού σε 1 όγκο διαλύματος πλύσης (70x). Χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα για την ομογενοποίηση. Απορρίψτε το μη χρησιμοποιημένο διάλυμα πλύσης εργασίας στο τέλος της ημέρας.

VIII. ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΛΗΞΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

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

- Τα δείγματα ορού ή πλάσματος πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία 2-8°C.
- Εάν η εξέταση δεν πραγματοποιηθεί εντός 24 ωρών, συνιστάται η φύλαξη στους -20°C.
- Αποφεύγετε τους επακόλουθους κύκλους καταψύξης-απόψυξης.
- Ο ορός ή το πλάσμα παρέχουν παρόμοια αποτελέσματα.

$$Y (\text{Ηπ. πλάσμα}) = 0,94 \times (\text{ορός}) + 0,02 \quad r = 0,98 \quad n = 17$$

$$Y (\text{πλάσμα με EDTA}) = 1,01 \times (\text{ορός}) - 0,03r = 0,95 \quad n = 17$$

X. ΛΙΑΛΙΚΑΣΙΑ

A. Σημειώσεις σχετικά με το χειρισμό

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

B. Διαδικασία

- Σημάνετε επιστρωμένα σωληνάρια εις διπλούν για κάθε βαθμονομητή, ορό ελέγχου και δείγμα. Για τον προσδιορισμό των μετρήσεων του ιχνηθέτη ^{125}I ("total"), σημάνετε 2 κοινά (μη επιστρωμένα) σωληνάρια.
- Αναμείξτε για λίγο (με αναμείκτη στροβίλισμο τύπου vortex) ορούς ελέγχου και δείγματα και διανείμετε 25 ml από έκαστο σε αντίστοιχα σωληνάρια.
- Διανείμετε 250 ml Ανδοστενεδίονη σημασμένης με ^{125}I σε κάθε σωληνάριο, συμπεριλαμβάνοντας τα μη επιστρωμένα σωληνάρια που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ^{125}I ("total").
- Ανακινήστε απαλά με το χέρι τη βάση στήριξης των σωληναρίων για να απελευθερώσετε τυχόν παγιδευμένες φυσαλίδες αέρα.
- Επωαστε για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με συνεχή ανάδευση.
- Αναρροφήστε (ή μεταγγίστε) το περιεχόμενο κάθε σωληναρίου (με εξαίρεση εκείνων που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ^{125}I ("total")). Βεβαιωθείτε ότι το πλαστικό ρύγχος του αναρροφητή φθάνει στον πυθμένα του επιστρωμένου σωληναρίου προκειμένου να αφαιρεθεί όλη η ποσότητα του υγρού.
- Πλύνετε τα σωληνάρια με 2 ml διαλύματος πλύσης εργασίας (με εξαίρεση εκείνων που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ^{125}I ("total")) και αναρροφήστε (ή μεταγγίστε). Αποφύγετε το σχηματισμό αφρού κατά τη διάρκεια της προσθήκης του διαλύματος πλύσης εργασίας.
- 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.

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

$$B/B0(\%) = \frac{\text{Κρούσεις (ΒΒαθμονομής ή δείγμα)} \times 100}{\text{Κρούσεις (ΜΜηδενικόβαθμονομητής)}}$$

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

XII. ΤΥΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

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

| DELTA 4-RIA-CT | cpm | B/B0 (%) |
|--|-------|----------|
| Κρούσεις του ιχνηθέτη ^{125}I ("total") | 48670 | |
| Βαθμονομητής | | |
| 0,0 ng/ml | 14867 | 100,0 |
| 0,1 ng/ml | 13196 | 88,8 |
| 0,4 ng/ml | 9450 | 63,6 |
| 1,0 ng/ml | 5910 | 39,8 |
| 4,0 ng/ml | 2746 | 18,5 |
| 11,0 ng/ml | 987 | 6,6 |

XIII. ΑΠΟΔΟΣΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

A. Όριο ανίχνευσης

Μετρήθηκαν είκοσι μηδενικού βαθμονομητές μαζί με ένα σύνολο άλλων βαθμονομητών.

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

B. Ειδικότητα

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

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

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

Γ. Ακρίβεια

ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΙΔΙΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ

ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΜΕΤΑΞΥ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΩΝ

| Ορός | N | $\text{\langle X \rangle \pm T.A. (ng/ml)}$ | Σ.Δ. (%) | Ορός | N | $\text{\langle X \rangle \pm T.A. (ng/ml)}$ | Σ.Δ. (%) |
|------|----|---|----------|------|----|---|----------|
| A | 10 | $0,36 \pm 0,02$ | 4,5 | A | 10 | $0,42 \pm 0,04$ | 9,0 |
| B | 10 | $6,04 \pm 0,19$ | 3,2 | B | 10 | $1,90 \pm 0,11$ | 5,9 |

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

Δ. Ορθότητα

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΡΑΙΩΣΗΣ

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

Τα δείγματα αραιώθηκαν με μηδενικό βαθμονομητή.

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ

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

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

E. Μεσοδιάστημα μεταξύ της διανομής τελευταίου βαθμονομητή και δείγματος

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

ΜΕΣΟΔΙΑΣΤΗΜΑ

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

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 κατευηγμένα σε κλάσματα/δόσεις μιας χρήσης.
- Τα κριτήρια αποδοχής για τη διαφορά μεταξύ των διπλών αποτελεσμάτων των δειγμάτων θα πρέπει να βασίζονται σε ορθές εργαστηριακές πρακτικές.

XV. ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

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

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

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

XVI. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

Ασφαλείας

Μόνο για διαγνωστική χρήση *in vitro*.

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

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

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

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 δικαιοδόσια στο εργαστήριο. Η τήρηση των βασικών κανόνων ασφάλειας από ραδιενέργεια παρέχει επαρκή προστασία.

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

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

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

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

XVII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

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

XVIII. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ

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

| | | |
|-------------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| Αρ. καταλόγου DIAsource: KIP0451 | Αριθμός P.I.: 1700460/el | Αρ. αναθεώρησης: 110706/1 |
|-------------------------------------|-----------------------------|------------------------------|



Прочетете целия протокол преди употреба

bu

ANDROSTENEDIONE-RIA-CT

I. УПОТРЕБА

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

II. ОБЩА ИНФОРМАЦИЯ

- A. Патентовано име: DIAsource ANDROSTENEDIONE-RIA-CT Kit
B. Каталожен номер: KIP0451: 96 теста
C. Произведено от: DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet 2 B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

За техническа помощ или поръчка:
Тел.: +32 (0)10 84.99.11 Факс: +32 (0)10 84.99.90

III. КЛИНИЧЕН ПРЕГЛЕД

A. Биологична активност

4-андростен-3, 17-дион (андростендион) представлява стероид C19. Той се произвежда в надбъбречната жлеза и гонадите. Андростендионът е непосредствен прекурсор на тестостерона и естриона, които впоследствие могат да се превърнат в естрадиол. Поради наличието на 17-оксо (а не на хидроксилна) група, андростендионът притежава относително слаба андрогенна активност, възлизаша на ≤ 20% от тази на тестостерона. Въпреки слабата андрогенна активност, серумните нива на андростендион могат да надвишават тези на тестостерона при нормални и болестни състояния, нормите на секреция и производство на андростендион надвишават тези на тестостерона при жените и се наблюдава значителна конверсия на андростендион в надбъбречната жлеза в тестостерон извън надбъбречната жлеза. Нещо повече, афинитетът на свързвания полови хормони глобулин към андростендиона е много по-малък от афинитета му към тестостерона или естрадиола (1 – 3).

Физиологичната роля на андростендиона не е достатъчно добре изяснена. Серумните нива на андростендион са високи в ембрионалния и неонаталния серум, намаляват през детството и се увеличават през пубертета. При нормалните юноши и възрастни мъже голямата част от андростендиона се получава от тестисите, или директно, или чрез конверсия от тестостерон, докато при нормалните възрастни жени еквивалентни по същество количества андростендион се произвеждат в надбъбречната жлеза и яйчниците (2,3). Увеличените нива на андростендиона могат да играят значителна роля при вторичното полово окосмяване в етапа на физиологичното полово съзряване. Серумните нива на андростендиона показват значителна деноночна променливост в зависимост от секрецията на АСТН (адренокортиковитрен хормон). Произвеждането на андростендион в яйчниците се стимулира от лутеинизация хормон (Ig), като серумните нива на андростендион варират съобразно менструалния цикъл (3). Произвеждането на андростендиона в надбъбречната жлеза постепенно намалява с увеличаването на възрастта при мъжете и жените. Освен това, производството на андростендион в яйчниците намалява след менопаузата (3).

B. Клинични приложения

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

IV. ПРИНЦИПИ НА МЕТОДА

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

V. ИЗПОЛЗВАНИ РЕАГЕНТИ

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

Забележка: Използвайте нулевия калибратор за серумните разреждания.

VI. СРЕДСТВА, КОИТО НЕ СЕ ОСИГУРЯВАТ

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

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

VII. ПРИГОТВЯНЕ НА РЕАГЕНТА

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

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

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

VIII. СЪХРАНЕНИЕ И СРОК НА ГОДНОСТ НА РЕАГЕНТИТЕ

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

IX. СЪБИРАНЕ НА ПРОБИТЕ И ОБРАЗОВАНИЕ

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

$$Y \text{ (Хеп. плазма)} = 0,94 x \text{ (серум)} + 0,02 \quad r = 0,98 \quad n = 17$$

$$Y \text{ (EDTA плазма)} = 1,01 x \text{ (серум)} - 0,03 \quad r = 0,95 \quad n = 17$$

X. ПРОЦЕДУРА

A. Общи бележки

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

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

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

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

B. Процедура

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

XI. ИЗЧИСЛЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

- Изчислете средното аритметично на резултатите, получени от две по две епруветки.
- Изчислете свързващата радиоактивност като процент от свързването, определен при нулевата калибрационна точка (0) според следната формула :
- Използвайки 3 циклична семи-логаритмична или logit-log графична хартия, нанесете $(B/B_0(\%))$ стойностите за всяка калибрационна точка

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

$$B/B_0 (\%) = \frac{\text{брой (Калибратор и проба)}}{\text{брой (Нулев Калибратор)}} \times 100$$

4. Компютърно асистирани методи също могат да бъдат използвани, за да се построи калибрационната крива. Ако се използва автоматичен метод на обработка на резултатите, се препоръчва подходяща 4-параметрова логистична крива.
5. Чрез интерполяция на $(B/B_0 (\%))$ стойностите от пробата се определят АНДРОСТЕНДИОН концентрациите на пробите от калибрационната крива.
6. Процентът на общото проследявашо вещество, свързано при липса на ненатоварен АНДРОСТЕНДИОН (B_0/T), трябва да се провери за всяко изследване.

XII. ХАРАКТЕРНИ ДАННИ

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

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

XIII. ИЗПЪЛНЕНИЕ И ОГРАНИЧЕНИЯ

A. Определен лимит

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

B. Специфичност

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

| Съединения | Кръстосана реактивност (%) |
|----------------------------------|----------------------------|
| Андростерон | 0,0566 |
| Кортизол | 0,0148 |
| Кортикостероид | 0,0047 |
| Кортизон | 0,0099 |
| DHEA (дехидроепандростерон) | 0,0155 |
| DHEA-SO ₄ | 0,0009 |
| 21-декоксикортизон | 0,0006 |
| Естрадиол-17 β | ND |
| Естриол | ND |
| Естрон | 0,0270 |
| Етиохоланолон | 0,0422 |
| 17 α -хидроксипрегненолон | ND |
| 17 α -хидроксипрогестерон | 0,0840 |
| Изоандростерон | 0,0112 |
| Прегненолон | ND |
| Прогестерон | 0,0168 |
| Спиронолактон | 0,0006 |
| 5 α -дихидротестостерон | 0,0105 |
| Тестостерон | 0,2406 |

Забележка: тази таблица показва кръстосаната реактивност за анти АНДРОСТЕНДИОН

ND : неизмерим

Г. Прецизност

ПО ВРЕМЕ НА ИЗПИТВАНЕТО

| Серум | N | $\bar{X} \pm SD$ (ng/ml) | CV (%) | Серум | N | $\bar{X} \pm SD$ (ng/ml) | CV (%) |
|-------|----|--------------------------|--------|-------|----|--------------------------|--------|
| A | 10 | 0,36 ± 0,02 | 4,5 | A | 10 | 0,42 ± 0,04 | 9,0 |
| B | 10 | 6,04 ± 0,19 | 3,2 | B | 10 | 1,90 ± 0,11 | 5,9 |

SD : Стандартно отклонение; CV: Кофициент на вариация

D. Точност

ТЕСТ С РАЗРЕЖДАНЕ

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

Пробите бяха разредени с нулев калибратор

ВЪЗСТАНОВИТЕЛЕН ТЕСТ

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

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

Д. Закъснение

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

Закъснение

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

XIV. ВЪТРЕШЕН КАЧЕСТВЕН КОНТРОЛ

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

XV. РЕФЕРЕНТНИ ИНТЕРВАЛИ

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

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

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

XVI. ПРЕДПАЗНИ МЕРКИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

Безопасност

Само за *in vitro* диагностика.

Този набор съдържа ^{125}I (полуживот: 60 дни), еmitиращ йонизиращи X (28 keV) и γ (35.5 keV) лъчения.

Този радиоактивен продукт може да се пренася и да се използва само от оторизирани лица; покупката, съхранението, употребата и размяната на радиоактивни продукти са предмет на законодателството на държавата, на краиния потребител. Този продукт не бива в никакъв случай да се прилага на хора или животни.

Боравенето с радиоактивния продукт трябва да се извършва в определена за целта територия, далеч от регулярни зони на преминаване. В лабораторията трябва да се поддържа дневник за получаването и съхранението на радиоактивни материали. Лабораторната екипировка и стъклария, които могат да бъдат контаминирани с радиоактивни субстанции, трябва да бъдат отделени с цел да се избегне кръстосана контаминация с различни радиоизотопи.

Всякакви радиоактивни пръски трябва да се почистват независимо в съответствие с процедурите за радиационна безопасност. Радиоактивните отпадъци трябва да се изхвърлят, следвайки местните наредби и ръководства на властите, упражняващи юрисдикцията, над лабораториите. Придържането към основните правила за радиационна безопасност осигурява адекватна защита.

Човешките кръвни компоненти, включени в кита, са били тествани чрез одобрени от Европейски и/или FDA (Американска агенция по храните и лекарствата) методи и са дали отрицателен резултат за HbsAg, анти-HCV, анти-HIV-1 и 2. Няма известен метод, който да дава пълна гаранция за това, че човешките кръвни деривати не пренасят хепатит, СПИН или други инфекции. Ето защо, боравенето със реагентите, серумните или плазмените пробы трябва да бъде в съответствие с местните процедури по безопасност.

Всички животински продукти и деривати са били събираны от здрави животни. Всичките компоненти са с произход от страни, където BSE (волска серумна енцефалопатия) не е била установявана. Независимо от това, компонентите, съдържащи животински субстанции трябва да се третират като потенциално инфекциозни.

Избягвайте каквътто и да било кожен контакт с реагентите (съдържат натриев азид като консервант). Азидът в този кит може да реагира с оловото и медта във водопроводните инсталации като по този начин се получават силно експлозивни метални азиди. По време на измивния етап, промийте със силна и обилна струя вода канализацията, за да избегнете формирането на азиди.

Не пушете, не пийте, не ядете и не си слагайте козметика в работната територия. Не пипетирайте с уста. Използвайте защитно облекло и ръкавици за единократна употреба.

XVII. БИБЛИОГРАФИЯ

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

XVIII. ОБОБЩЕНИЕ НА ПРОТОКОЛА

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

| | | |
|-------------------------------------|---------------------------|-------------------------------|
| DIAsource каталог номер: KIP0451 | P.I. номер: 1700460/bu | Номер на ревизия: 110706/1 |
|-------------------------------------|---------------------------|-------------------------------|

Дата на ревизия: 2011-07-06



hu

Használat előtt olvassa el a teljes használati utasítást.

ANDROSTENEDIONE-RIA-CT

I. VIZSGÁLAT CÉLJA

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

II. ÁLTALÁNOS INFORMÁCIÓK

- A. Bejegyzett név: DIAsource ANDROSTENEDIONE-RIA-CT Reagenskészlet
- B. Katalógusszám: KIP0451 : 96 vizsgálat
- C. Gyártó : DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Gyakorlati jellegű vagy rendeléssel kapcsolatos kérdésekkel hívja a következő számot:
Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.90

III. KLINIKAI HÁTTÉR

A. Élettani szerep

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

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

B. Klinikai felhasználás

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

IV. A MÓDSZER ELVE

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

V. A REAGENSKÉSZLET TARTALMA

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

Megjegyzés : Minták hígításához használja a nulla kalibrátort.

VI. A FELHASZNÁLÓ ÁLTAL BIZTOSÍTOTT ESZKÖZÖK

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

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

VII. REAGENSEK ELŐKÉSZÍTÉSE

- Kalibrátorok : Oldja fel a kalibrátorokat 0,5 ml desztillált vízben
- Kontrollok Oldja fel a kontrollokat 0,5 ml desztillált vízben.
- Hígított mosóoldat: Készítse megfelelő mennyiségű hígított mosóoldatot úgy, hogy 69 rész desztillált vízhez 1 rész mosóoldatot (70x) kever. Homogenizálja mágneses keverő segítségével. A napi vizsgálatok végeztével öntse ki a megmaradt hígított mosóoldatot.

VIII. A REAGENSEK TÁROLÁSA ÉS ELTARTHATÓSÁGA

- Felnyitás és feloldás nélkül a reagensek 2-8°C-on tárolva a címkén feltüntetett időpontig eltarthatók.
- Feloldás után a kalibrátorok és kontrollok 2-8°C-on egy héting, több csöve szétesztve -20°C-on lefagyásztva legfeljebb 3 hónapig eltarthatók. Kerülje a többszöri lefagyászt és felolvastást.
- A frissen készült hígított mosóoldatot még aznap fel kell használni.

- Amennyiben felnyitás után a traceret az eredeti, jók lezárt ampullában 2-8°C-on tárolja, akkor a címkén feltüntetett időpontig eltartható.
- A reagensek fizikai tulajdonságainak megváltozása valószínűleg azt jelzi, hogy megomlottak.

IX. MINTAVÉTEL ÉS ELŐKÉSZÍTÉS

- Tárolja a vérsav vagy vérplazma mintákat 2-8°C-on.
- Amennyiben nem végzi el a vizsgálatot 24 órán belül, ajánlott a mintákat -20°C-on szétesztve tárolni.
- Kerülje a minták többszöri lefagyászt és felolvastását.
- Savó és plazma minták hasonló eredményt adnak:

$$Y (\text{Hep.-os plazma}) = 0.94 \times (\text{savó}) + 0.02 \quad r = 0.98 \quad n = 17$$

$$Y (\text{EDTA-s plazma}) = 1.01 \times (\text{savó}) - 0.03 \quad r = 0.95 \quad n = 17$$

X. ELJÁRÁS

A. Tudnivalók

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

B. A vizsgálat menete

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

XI. EREDMÉNYEK KISZÁMÍTÁSA

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

$$\text{B/B0 \%} = [\text{kontroll vagy minta cpm} / \text{B0 (nulla kalibrátor) cpm}] \times 100$$
- Féllelogaritmikus vagy logit-log milliméterpapíron ábrázolja a kalibrátorok B/B0(%) értékeit a hozzájuk tartozó androsztendion-koncentrációk függvényében. Hagyja figyelmen kívül a nyilvánvalóan kieső értékeket.
- Számítógép segítségével is felrajzolható a kalibrációs görbe. Ez esetben használjon 4-paraméteres logisztikus görbeillesztést.
- A kalibrációs görbe alapján határozza meg a minták androsztendion-koncentrációját B/B0(%) értékeik interpolációjával.
- Minden vizsgálat során határozza meg a jelöletlen androsztendion nélküli beköldő tracer százalékos mennyiségét (B0/T).

XII. JELLEMZŐ MÉRÉSI EREDMÉNYEK

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

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

XIII. A VIZSGÁLAT JELLEMZŐI ÉS KORLÁTAI

A. A kimutathatóság alsó határa

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

B. Specificitás

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

| Vegyület | Keresztreaktivitás (%) |
|-------------------------|------------------------|
| Androszteron | 0.0566 |
| Kortizol | 0.0148 |
| Kortikoszteron | 0.0047 |
| Kortizon | 0.0099 |
| DHEA | 0.0155 |
| DHEA-SO ₄ | 0.0009 |
| 21-deoxikortizon | 0.0006 |
| 17β-Ösztradiol | NK |
| Ösztriol | NK |
| Ösztron | 0.0270 |
| Etiocolanolone | 0.0422 |
| 17α-hidroxipregnolon | NK |
| 17α-hidroxiprogeszteron | 0.0840 |
| Izoandroszteron | 0.0112 |
| Pregnenolon | NK |
| Progeszteron | 0.0168 |
| Spironolaktón | 0.0006 |
| 5α-dihidrotesztoszteron | 0.0105 |
| Tesztoszteron | 0.2406 |

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

C. Reprodukálhatóság

VIZSGÁLATON BELÜLI

VIZSGÁLATOK KÖZÖTTI

| Savó | N | $\text{\bar{x}} \pm \text{SD}$ (ng/ml) | CV (%) | Savó | N | $\text{\bar{x}} \pm \text{SD}$ (ng/ml) | CV (%) |
|------|----|---|--------|------|----|---|--------|
| A | 10 | 0.36 ± 0.02 | 4.5 | A | 10 | 0.42 ± 0.04 | 9.0 |
| B | 10 | 6.04 ± 0.19 | 3.2 | B | 10 | 1.90 ± 0.11 | 5.9 |

SD: standard deviáció; CV: variációs koeficiens

D. Pontosság

HÍGÍTÁSI VIZSGÁLAT

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

A minták hígítása a nulla kalibrátorral történt.

VISSZANYERÉS

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

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

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

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

ELTELT IDŐ

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

XIV. BELSŐ MINŐSÉGELLENŐRZÉS

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

XV. REFERENCIATARTOMÁNY

Az alábbi értékek csak irányadó jellegűek, minden laboratóriumnak meg kell határoznia saját referenciatartományát.

Az referenciatartomány a 2,5%-os és a 97,5%-os percentilis értékek közé esik.

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

XVI. MUNKAVÉDELEM

Biztonsági előírások

Csak in vitro diagnosztikai felhasználásra.

A kit röntgen (28 keV) és gamma (35.5 keV) sugárzó ¹²⁵I izotópot (felezési idő: 60 nap) tartalmaz.

A reagenskészletben található radioaktív anyagot csak arra jogosult személyek vehetik át és használhatják fel. Radioaktív termékek beszerzésére, tárolására, használata, és cseréjére az addott ország törvényei érvényesek. A reagensek alkalmazása emberekben és állatokon is minden körülmenyek között tilos. minden, radioaktív reagenssel végzett műveletet egy arra kijelölt, elkülönlített helyen kell elvégezni. A laboratóriumba érkezett radioaktív anyagok átvételről és tárolásáról vezetett jegyzőkönyvet a laboratórium területén kell tartani. Azokat a laboratóriumi eszközököt és üvegedényeket, amelyek radioaktív anyaggal szennyeződhetek, különítse el, hogy elkerülje a különböző radioizotópokkal történő keresztszennyeződést.

Amennyiben bármilyen radioaktív anyag kiömlik, azonnal takarítsa fel az erre vonatkozó előírásoknak megfelelő módron. A keletkező radioaktív hulladékot a helyi szabályoknak és az illetékes hatóságok erre vonatkozó útmutatásának megfelelően kell kidobni. Ha betartja a radioaktív anyagok kezelésére vonatkozó alapvető szabályokat, megfelelően védett lesz a sugár fertőzéstől.

A készlet emberi vérból készült reagenseit európai szabványok szerinti és/vagy az FDA által minősített módszerrel HBsAg-tól, valamint anti-HCV, és anti-HIV-1 és 2 ellenanyagoktól mentesnek találták. Azonban egyetlen ma ismert módszer alapján sem állítható biztosan, hogy az emberi vérból készült anyagok nem okozhatnak hepatitis, AIDS-ét vagy más fertőző betegséget. Ezért minden ilyen reagenst és minden sav-ó, illetve plazmamintát a fertőző anyagokra vonatkozó helyi biztonsági előírásoknak megfelelően kell kezelní.

Minden állati eredetű reagens és termék egészséges állatokból származik. A szarvasmarha eredetű reagensek olyan országokból származnak, ahonnan eddig nem jelentettek BSE esetet. Ennek ellenére minden állati eredetű anyagot tartalmazó reagenst potenciálisan fertőzésveszélyesként kell kezelní.

Vigyázzon, hogy a reagensek bőre ne kerüljenek (tartósítószer: nátrium-azid). A reagensekben található nátrium-azid robbanásveszélyes fém-azidot képezhet ólom és réz csővezetékek anyagával. A csövek mosásakor nagy mennyiségű vízzel együtt öntse ki ezeket az anyagokat, hogy megelölje az azid felgyülemlést.

Ne dohányozzon, ne fogyasszon ételt vagy italt, illetve ne használjon kozmetikumokat a laboratóriumban. Ne pipettázzon szájjal. Munka közben viseljen laborköpenyt és egyszer használatos kesztyűt.

XVII. IRODALOM

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

XVIII. AZ ELJÁRÁS ÖSSZEFOGLALÁSA

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

| | | |
|---------------------------|-------------|--------------|
| DIAsource Katalógusszám : | P.I. Szám : | Verziószám : |
| KIP0451 | 1700460/hu | 110706/1 |

Frissítés időpontja : 2011-07-06

Przed zastosowaniem należy przeczytać cały protokół.

ANDROSTENEDIONE-RIA-CT

I. PRZEZNACZENIE

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

II. INFORMACJE OGÓLNE

- A. **Nazwa firmowa:** DIAsource Androstenedione-RIA-CT
- B. **Numer katalogowy:** KIP0451 : 96 oznaczeń
- C. **Wyprodukowano przez:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgia.

Dział pomocy technicznej oraz informacje dotyczące zamówień:

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

III. INFORMACJE KLINICZNE

A. Aktywność biologiczna

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

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

B. Zastosowania kliniczne

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

IV. ZAGADNIENIA DOTYCZĄCE METODY

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

V. ODCZYNNIKI DOSTARCZONE

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

Uwaga: Do rozcieńczeń próbek należy stosować kalibrator zerowy.

VI. MATERIAŁY WYMAGANE, ALE NIEDOSTARCZONE

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

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

VII. PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

- A. **Kalibrator:** Rekonstytuować kalibrator zerowy przy pomocy 0,5 ml wody destylowanej a inne kalibratorzy przy pomocy 0,5 ml wody destylowanej.
- B. **Kontrole:** Kontrole należy rekonstytuować przy pomocy 0,5 ml wody destylowanej.
- C. **Roboczy roztwór pluczający:** Właściwą objętość roboczego roztworu pluczającego należy przygotować, dodając 69 objętości wody destylowanej do 1 objętości roztworu pluczającego (70x). Do homogenizacji należy wykorzystać mieszadło magnetyczne. Niewykorzystany roboczy roztwór pluczający należy wylać pod koniec dnia.

VIII. PRZECHOWYWANIE I DATA WAŻNOŚCI ODCZYNNIKÓW

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

IX. POBIERANIE I PRZYGOTOWANIE MATERIAŁU DO BADANIA

- Próbki surowicy lub osocza muszą być przechowywane w temperaturze 2-8°C.
- Jeżeli oznaczenie nie jest wykonywane w ciągu 24 godzin, zaleca się przechowywanie w małych objętościach w temperaturze -20°C.
- Należy unikać powtarzanych cykli zamrażania-odmrażania.
- Surowica i osocze prowadzą do podobnych wyników.

$$Y(\text{osocze heparynizowane}) = 0,94 \times (\text{surowica}) + 0,02 \quad r = 0,98 \quad n = 17$$

$$Y(\text{osocze z EDTA}) = 1,01 \times (\text{surowica}) - 0,03 \quad r = 0,95 \quad n = 17$$

X. PROCEDURA

A. Uwagi dotyczące obsługi

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

B. Procedura

1. Dla każdego kalibratora, próbki i kontroli, należy oznaczyć opłaszczone próbówki w badaniach podwójnych. W celu określenia całkowitych zliczeń, należy oznaczyć 2 standarde próbówki.
2. Należy szybko wymieszać, wirując: kalibrator, próbki i kontrole, i dozować po 25 μl każdej substancji do odpowiednich próbówek.
3. Do każdej próbówki, w tym do próbówek nieopłaszczonej do całkowitego zliczania, należy dodać po 250 μl androstenodionu oznakowanego jodem 125 .
4. Należy delikatnie potrząsnąć statywem, w celu uwolnienia uwięzionych pecherzyków powietrza.
5. Należy inkubować przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej ciągle wytrząsając.
6. Należy aspirować (lub odlać) zawartość każdej próbówki (z wyjątkiem próbówek do całkowitego zliczania). Aby usunąć cały płyn, należy upewnić się, że plastikowa końcówka aspiratora osiągnęła dno opłaszczonej próbówki.
7. Przy pomocy 2 ml roboczego roztworu pluczającego (z wyjątkiem próbówek do całkowitego zliczania), należy przepłukać próbówki i aspirować zawartość (lub odlać ją). W trakcie dodawania roboczego roztworu pluczającego, należy unikać wytwarzania piany.
8. Probówki należy pozostawić na dwie minuty w pozycji stojącej do góry i aspirować pozostałe krople płynu.
9. Probówki należy zliczać w liczniku gamma przez 60 sekund.

XI. OBLCZANIE WYNIKÓW

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

$$B/B_0(\%) = \frac{\text{Liczba zliczeń (dla kalibratora lub próbki)}}{\text{Liczba zliczeń (dla kalibratora zerowego)}} \times 100$$

3. Na 3 arkuszach półlogarytmicznych lub papierze milimetrowym, należy wykreślić wartości ($B/B_0(\%)$) dla każdego punktu kalibratora, jako funkcję stężenia androstenodionu każdego punktu kalibratora. Należy odrzucić oczywiste wartości graniczne.
4. Do opracowania krzywej kalibracyjnej mogą być wykorzystane również metody wspomagania komputerowego. Jeżeli ma być zastosowane automatyczne przetwarzanie wyników, zaleca się dopasowanie krzywej logistycznej 4 parametrowej.
5. Nakładając wartości ($B/B_0 (\%)$) próbki, należy określić stężenia androstenodionu w próbkach z krzywej kalibracyjnej.
6. Dla każdego oznaczenia należy sprawdzić odsetek całkowitego związanego znacznika izotopowego, przy braku nieoznakowanego androstenodionu (B_0/T).

XII. PRZYKŁAD DANYCH TYPOWYCH

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

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

XIII. DZIAŁANIE I OGRANICZENIA

A. Granica wykrywania

Dwadzieścia kalibratorów zerowych oznaczano wraz z zestawem innych kalibratorów.

Granica wykrywania, zdefiniowana jako odmienne stężenie dwóch odchyleń standardowych poniżej przeciętnej wartości zliczania, przy wiązaniu zerowym, kształtała się na poziomie 0,03 ng/ml.

B. Swoistość

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

| Związek | Reaktywność krzyżowa (%) |
|-------------------------|--------------------------|
| Androsteron | 0,0566 |
| Kortyzol | 0,0148 |
| Kortykosteron | 0,0047 |
| Kortyzon | 0,0099 |
| DHEA | 0,0155 |
| DHEA-SO ₄ | 0,0009 |
| 21-Deoksykortyzon | 0,0006 |
| 17β-Estradiol | n.w. |
| Estriol | n.w. |
| Estron | 0,0270 |
| Etiocholanolon | 0,0422 |
| 17α-hydroksypregnanolon | n.w. |
| 17α-hydroksyprogesteron | 0,0840 |
| Izoandrosteron | 0,0112 |
| Pregnenolon | n.w. |
| Progesteron | 0,0168 |
| Spironolakton | 0,0006 |
| 5α-dihydrotestosteron | 0,0105 |
| Testosteron | 0,2406 |

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

n.w. : niewykrywalne

C. Precyza

PRECYZJA W SERII

PRECYZJA MIĘDZY SERAMI

| Surowica | N | $\bar{X} \pm SD$ (ng/ml) | CV (%) | Surowica | N | $\bar{X} \pm SD$ (ng/ml) | CV (%) |
|----------|----|--------------------------|--------|----------|----|--------------------------|--------|
| A | 10 | 0,36 ± 0,02 | 4,5 | A | 10 | 0,42 ± 0,04 | 9,0 |
| B | 10 | 6,04 ± 0,19 | 3,2 | B | 10 | 1,90 ± 0,11 | 5,9 |

SD: Odchylenie standarde; CV: Współczynnik zmienności

D. Dokładność

BADANIE ROZCIEŃCZENIA

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

Próbki zostały rozcieńczone przy pomocy kalibratora zerowego.

BADANIE ODZYSKU

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

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

E. Opóźnienie pomiędzy oznaczeniem ostatniego kalibratora i doszowaniem próbki

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

OPÓŹNIENIE CZASOWE

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

XIV. WEWNĘTRZNA KONTROLA JAKOŚCI

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

XV. ZAKRESY REFERENCYJNE

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

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

XVI. ŚRODKI OSTROŻNOŚCI I OSTRZEŻENIA

Bezpieczeństwo

Tylko do diagnostyki *in vitro*.

Zestaw zawiera ^{125}I (Okres połowicznego rozpadu: 60 dni), emittujący promieniowanie jonizujące X (28 keV) i γ (35,5 keV).

Ten produkt radioaktywny może być transportowany i wykorzystany wyłącznie przez osoby autoryzowane; zakup, przechowywanie, stosowanie i wymiana produktów radioaktywnych podlega regulacjom prawnym kraju użytkownika końcowego. W żadnym wypadku produkt nie może być podawany ludziom lub zwierzętom.

Obsługa materiałów radioaktywnych powinna być przeprowadzana w miejscach do tego przeznaczonych, z dala od miejsc ogólnej użyteczności. W laboratorium musi być przechowywany rejestr przyjęć i przechowywania materiałów radioaktywnych. Wyposażenie laboratorium oraz szkło, które może być skażone substancjami radioaktywnymi, powinno być oddzielone, w celu uniknięcia krzyżowego zanieczyszczenia różnych radioizotopów.

Wszelkie plamy z substancji radioaktywnych muszą być natychmiast oczyszczone, zgodnie z procedurami dotyczącymi bezpieczeństwa radiologicznego. Odpady radioaktywne muszą być usuwane zgodnie z miejscowymi przepisami i ogólnie przyjętymi wytycznymi obowiązującymi w laboratorium. Przestrzeganie podstawowych zasad bezpieczeństwa radiologicznego zapewnia wystarczające zabezpieczenie.

Składniki zawierające ludzką krew, dostarczone w zestawie, zostały przebadane metodami zaaprobowanymi przez instytucje europejskie i/lub FDA. Stwierdzono, że nie zawierają one HbsAg, przeciwca anty-HCV, anty-HIV-1 i 2. Żadna ze znanych metod nie może dać całkowitej pewności, że materiały pochodzenia ludzkiego nie przenoszą czynników zakaźnych wirusowego zapalenia wątroby, AIDS i innych. Dlatego, postępowanie z odczynnikami i próbками surowicy lub osocza, powinno być zgodne z miejscowymi procedurami dotyczącymi bezpieczeństwa.

Produkty pochodzenia zwierzęcego były pobierane od zdrowych zwierząt. Składniki bydlęce pochodzą z krajów, w których nie odnotowano występowania BSE. Pomimo to, składniki zawierające substancje pochodzenia zwierzęcego powinny być traktowane jako potencjalnie zakaźne.

Należy unikać kontaktu skóry z odczynnikami (zawierającymi azydki sodowe jako środek konserwujący). Azydki znajdujące się w zestawie, może reagować z miedzią i ołówkiem w układzie kanalizacyjnym, tworząc związki o właściwościach wybuchowych. W czasie plukania odprowadzany płyn należy plukać dużymi objętościami wody, aby zapobiec kumulacji azydków.

Nie wolno palić, spożywać napojów ani pokarmów bądź używać kosmetyków w miejscu pracy. Nie pipetować ustami. Zakładać ubranie ochronne i rękawiczki jednorazowe.

XVII. BIBLIOGRAFIA

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

XVIII. PODSUMOWANIE PROTOKOŁU

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

| | | |
|------------------------------------|--------------------------|-------------------------------|
| Nr katalogowy DIAsource KIP0451 | Numer P.I. 1700460/pl | Nr aktualizacji : 110706/1 |
|------------------------------------|--------------------------|-------------------------------|

Data wydania : 2011-07-06



pt

Leia todo o protocolo antes de utilizar.

ANDROSTENEDIONE-RIA-CT

I. UTILIZAÇÃO PREVISTA

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

II. INFORMAÇÕES GERAIS

- A. **Nome do proprietário :** DIAsource-Kit ANDROSTENEDIONE-RIA-CT
- B. **Número do catálogo :** KIP0451 : 96 testes
- C. **Produzido por :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue 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

III. SIGNIFICADO CLÍNICO

A Atividade Biológica

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

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

B. Aplicações Clínicas

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

IV. PRINCÍPIO DO MÉTODO

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

V. REAGENTES FORNECIDOS

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

Note : Use o calibrador zero para diluições de amostras.

VI. MATERIAL NÃO FORNECIDO

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

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

VII. PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

- Calibradores:** Reconstitua os calibradores com 0,5 ml de água destilada.
- 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 69 volumes de água destilada para 1 volume de solução de lavagem (70x). Use um agitador magnético para homogeneizar. Rejeite a solução não utilizada no final do dia.

VIII. ARMAZENAMENTO E PRAZO DE VALIDADE DOS REAGENTES

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

IX. RECOLHA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

- Amostras de soro ou plasma devem ser mantidas entre 2-8°C.
- Se a análise não for realizada em 24 hrs, recomenda se conservar em alicotas a -20°C.
- Evite ciclos de congelamento e descongelamento sucessivos.
- Soro e plasma fornecem resultados similares:

$$Y (\text{Hep. plasma}) = 0.94 \times (\text{soro}) + 0.02 \quad r = 0.98 \quad n = 17$$

$$Y (\text{plasma com EDTA}) = 1.01 \times (\text{soro}) - 0.03 \quad r = 0.95 \quad n = 17$$

X. PROCEDIMENTO

A. Notas de manipulação

Não utilize o kit ou qualquer componente depois da expiração do prazo de validade. Não misture componentes de diferentes 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 25 μl de cada, para os tubos respectivos.
3. Dispense 250 μl de Androstenediona marcado com I 125 para cada tubo, incluindo os tubos normais para as contagens totais.
4. Agite suavemente o suporte dos tubos, para libertar possíveis bolhas de ar.
5. Incube por 1 hora a temperatura ambiente com agitação contínua.
6. Aspire o conteúdo de cada tubo (excepto os das contagens totais). Assegure-se que a ponta plástica do aspirador atinge o fundo do tubo revestido, para remover todo o líquido.
7. Lave os tubos com 2 ml de solução de lavagem de trabalho (excepto os das contagens totais) e aspire. Evite formação de espuma quando adiciona a solução de lavagem.
8. Depois da lavagem, deixe os tubos direitos durante 2 minutos e seguidamente aspire a última porção de líquido.
9. Conte os tubos num contador gamma durante 60 segundos.

XI. CÁLCULO DOS RESULTADOS

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

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

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

XII. DADOS TÍPICOS

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

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

XIII. DESEMPENHO E LIMITES

A. Limite de detecção

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

O limite de detecção, definido como a concentração aparente, 2 DP abaixo das contagens médias com zero ligações, foi de 0,03 ng/ml.

B. Especificidade

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

| Composto | Reactividade-cruzada (%) |
|----------------------------------|--------------------------|
| Androsterona | 0,0566 |
| Cortisol | 0,0148 |
| Corticosterona | 0,0047 |
| Cortisona | 0,0099 |
| DHEA | 0,0155 |
| DHEA-SO ₄ | 0,0009 |
| 21-Deoxicortisona | 0,0006 |
| Estradiol-17 β | ND |
| Estriol | ND |
| Estrona | 0,0270 |
| Etiocolanolone | 0,0422 |
| 17 α -hidroxipregnolona | ND |
| 17 α -Hidroxiprogesterona | 0,0840 |
| Isoandrosteronona | 0,0112 |
| Pregnenolona | ND |
| Progesterona | 0,0168 |
| Spironolactona | 0,0006 |
| 5 α -Dihidrotestosterona | 0,0105 |
| Testosterona | 0,2406 |

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

ND : não detectável

C. Precisão

PRECISÃO INTRA-ENSAIO

PRECISÃO INTER-ENSAIO

| Soro | N | $\langle X \rangle \pm DP$ (ng/ml) | CV (%) | Soro | N | $\langle X \rangle \pm DP$ (ng/ml) | CV (%) |
|------|----|------------------------------------|--------|------|----|------------------------------------|--------|
| A | 10 | 0,36 ± 0,02 | 4,5 | A | 10 | 0,42 ± 0,04 | 9,0 |
| B | 10 | 6,04 ± 0,19 | 3,2 | B | 10 | 1,90 ± 0,11 | 5,9 |

DP: Desvio Padrão; CV: Coeficiente de variação

D. Exactidão

TESTE DE DILUIÇÃO

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

As amostras foram diluídas com calibrador zero.

TESTE DE RECUPERAÇÃO

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

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

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

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

INTERVALO DE ATRASO DE TEMPO

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

XIV. CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO

- Se os resultados obtidos para o controlo 1 e/ou controlo 2 não estão dentro do intervalo especificado no rótulo do recipiente, os resultados não podem ser utilizados, a menos que seja dada uma explicação satisfatória para a discrepança 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.
- Aceitação do critério para a diferença entre os resultados em duplicatas das amostras devem ser realizadas em Boas Práticas de Laboratório

XV. INTERVALOS DE REFERÊNCIA

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

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

XVI. AVISOS E PRECAUÇÕES

Segurança

Apenas para uso em diagnóstico *in vitro*.

Este kit contém ^{125}I (meia-vida: 60 dias), emitindo X ionizável (28 keV) e γ (35,5 keV) radiações.

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

Toda a manipulação 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.

Os componentes de sangue humano incluídos neste kit foram testados por métodos aprovados pela legislação europeia e/ou FDA e dados como negativos para o HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 e 2. Não existe nenhum método, até agora conhecido, que oferece total segurança quanto à impossibilidade de transmissão de hepatite, HIV ou outras infecções, por via do sangue humano. Por isso, deve manipular os reagentes, o soro ou o plasma de acordo com as regras locais de segurança, quanto a materiais potencialmente infecciosos.

Todos os produtos de origem animal e seus derivados foram recolhidos de 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.

XVII. BIBLIOGRAFIA

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

XVIII. RESUMO DO PROTOCOLO

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

| | | |
|--------------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Nº do catálogo DIAsource: KIP0451 | Nº de P.I.: 1700460/pt | Nº de revisão: 110706/1 |
|--------------------------------------|---------------------------|----------------------------|

| | | <u>Used symbols</u> |
|----------------|--|------------------------------------|
| | | Consult instructions for use |
| | | Storage temperature |
| | | Use by |
| LOT | | Batch code |
| REF | | Catalogue number |
| CONTROL | | Control |
| IVD | | In vitro diagnostic medical device |
| | | Manufacturer |
| | | Contains sufficient for <n> tests |
| | | Wash solution concentrated |
| | | Zero calibrator |
| | | Calibrator # |
| | | Control # |
| | | Tracer |
| | | Tracer |
| | | Tracer concentrated |
| | | Tracer concentrated |
| | | Tubes |
| | | Incubation buffer |
| | | Acetonitrile |
| | | Serum |
| | | Specimen diluent |
| | | Dilution buffer |
| | | Antiserum |
| | | Immunoabsorbent |
| | | Calibrator diluent |
| | | Reconstitution solution |
| | | Polyethylene glycol |
| | | Extraction solution |
| | | Elution solution |
| | | Bond Elut Silica cartridges |
| | | Pre-treatment solution |
| | | Neutralization solution |
| | | Tracer buffer |
| | | Microtiterplate |
| | | HRP Conjugate |
| | | HRP Conjugate |
| | | HRP Conjugate concentrate |
| | | HRP Conjugate concentrate |
| | | Conjugate buffer |
| | | Chromogenic TMB concentrate |
| | | Chromogenic TMB solution |
| | | Substrate buffer |
| | | Stop solution |
| | | Incubation serum |
| | | Buffer |
| | | AP Conjugate |
| | | Substrate PNPP |
| | | Biotin conjugate concentrate |
| | | Avidine HRP concentrate |
| | | Assay buffer |
| | | Biotin conjugate |
| | | Specific Antibody |
| | | Streptavidin HRP concentrate |
| | | Non-specific binding |
| | | 2nd Antibody |
| | | Acidification Buffer |
| | | Distributor |

| | | <u>Symboles utilisés</u> |
|----------------|--|---|
| | | Consulter les instructions d'utilisation |
| | | Température de conservation |
| | | Utiliser jusque |
| LOT | | Numéro de lot |
| REF | | Référence de catalogue |
| CONTROL | | Contrôle |
| IVD | | Dispositif médical de diagnostic in vitro |
| | | Fabricant |
| | | Contenu suffisant pour <n> tests |
| | | Solution de lavage concentrée |
| | | Calibrateur zéro |
| | | Calibrateur # |
| | | Contrôle # |
| | | Traceur |
| | | Traceur |
| | | Traceur concentré |
| | | Traceur concentré |
| | | Tubes |
| | | Tampon d'incubation |
| | | Acétonitrile |
| | | Sérum |
| | | Diluant du spécimen |
| | | Tampon de dilution |
| | | Antisérum |
| | | Immunoadsorbant |
| | | Diluant de calibrateur |
| | | Solution de reconstitution |
| | | Glycol Polyéthylène |
| | | Solution d'extraction |
| | | Solution d'elution |
| | | Cartouches Bond Elut Silica |
| | | Solution de pré-traitement |
| | | Solution de neutralisation |
| | | Tampon traceur |
| | | Microplaques de titration |
| | | HRP Conjugué |
| | | HRP Conjugué |
| | | HRP Conjugué concentré |
| | | HRP Conjugué concentré |
| | | Tampon conjugué |
| | | Chromogène TMB concentré |
| | | Solution chromogène TMB |
| | | Tampon substrat |
| | | Solution d'arrêt |
| | | Sérum d'incubation |
| | | Tampon |
| | | AP Conjugué |
| | | Tampon PNPP |
| | | Biotine conjugué concentré |
| | | Avidine HRP concentré |
| | | Tampon de test |
| | | Biotine conjugué |
| | | Anticorps spécifique |
| | | Concentré streptavidine HRP |
| | | Liant non spécifique |
| | | Second anticorps |
| | | Tampon d'acidification |

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

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

| | | <u>Símbolos utilizados</u> |
|----------------|--|--|
| | | Consultar las instrucciones de uso |
| | | Limitación de temperatura |
| | | Fecha de caducidad |
| LOT | | Código de lote |
| REF | | Número de catálogo |
| CONTROL | | Control |
| IVD | | Producto sanitario para diagnóstico in vitro |
| | | Fabricante |
| | | Contenido suficiente para <n> ensayos |
| | | Solución de lavado concentrada |
| | | Calibrador cero |
| | | Calibrador # |
| | | Control # |
| | | Trazador |
| | | Trazador |
| | | Trazador concentrada |
| | | Trazador concentrada |
| | | Tubos |
| | | Tampón de incubación |
| | | Acetonitrilo |
| | | Suero |
| | | Diluyente de Muestra |
| | | Tampón de dilución |
| | | Antisuero |
| | | Inmunoabsorbente |
| | | Diluyente de calibrador |
| | | Solución de Reconstitución |
| | | Glicol Polietileno |
| | | Solución de extracción |
| | | Solución de elución |
| | | Cartuchos Bond Elut Silica |
| | | Solución de Pre-tratamiento |
| | | Solución de Neutralización |
| | | Tampón de trazador |
| | | Placa de microvaloración |
| | | HRP Conjugado |
| | | HRP Conjugado |
| | | HRP Conjugado concentrada |
| | | HRP Conjugado concentrada |
| | | Tampón de Conjugado |
| | | Cromógena TMB concentrada |
| | | Solución Cromógena TMB |
| | | Tampón de sustrato |
| | | Solución de Parada |
| | | Suero de Incubación |
| | | Tampón |
| | | AP Conjugado |
| | | Sustrato PNPP |
| | | Concentrado de conjugado de biotina |
| | | Concentrado avidina-HRP |
| | | Tampón de ensayo |
| | | Conjugado de biotina |
| | | Anticuerpo específico |
| | | Estreptavidina-HRP Concentrado |
| | | Unión no específica |
| | | Segundo anticuerpo |
| | | Tampón de Acidificación |

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

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

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

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

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

| | | <u>Símbolos utilizados</u> |
|----------------|-----------------------|--|
| | | Consulte instruções de utilização |
| | | Temperatura de conservação |
| | | Utilizar antes de |
| LOT | | Código de lote |
| REF | | Número de catálogo |
| CONTROL | | Controlo |
| IVD | | Dispositivo médico de diagnóstico in vitro |
| | | Fabricante |
| | | Conteúdo suficiente para <n> testes |
| | WASH | 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 |
| | | Acetonitrilo |
| | | Soro |
| | DIL SPE | Diluidor de espécimes |
| | DIL BUF | Tampão de diluição |
| | | Anti-soro |
| | | Imunoadsorvente |
| | DIL CAL | Diluente do calibrador |
| | REC SOLN | Solução de Reconstituição |
| | PEG | Polietileno-glicol |
| | EXTR SOLN | Solução de Extração |
| | ELU SOLN | Solução de Eluição |
| | GEL | Cartuchos de silica Bond Elut |
| | PRE SOLN | Solução de pré-tratamento |
| | NEUTR SOLN | Solução de neutralização |
| | TRACEUR BUF | Tampão Marcador |
| | | Placa de micro titulação |
| | Ab HRP | HRP Conjugação |
| | Ag HRP | HRP Conjugação |
| | Ab HRP CONC | HRP Conjugação concentrada |
| | Ag HRP CONC | HRP Conjugação concentrada |
| | CONJ BUF | Conjugue o tampão |
| | CHROM TMB CONC | Cromogénica TMB concentrada |
| | CHROM TMB | Solução Cromogénica TMB |
| | SUB BUF | Tampão de substrato |
| | STOP SOLN | Solução de Paragem |
| | INC SER | Soro de incubação |
| | | 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 |