



IVD

CE

ANDROSTENEDIONE-RIA-CT

KIP0451

Version : 230123

Date of issue : 23/01/2023

Revision date: 23/01/2023

History

Summary of change:

Current Version:
230123
New logo



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 84.99.91

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 (18-25°C) 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 plasma and thymol. (see exact values on vial labels)			

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 (18-25°C) 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.
 Each tube can only be used once.

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 (18-25°C) with continuous shaking.
6. Aspirate (or decant) the content of each tube (except total counts). Be sure that the plastic tip of the aspirator reaches the bottom of the coated tube in order to remove all the liquid.
7. Wash tubes with 2 ml Working Wash solution (except total counts) and aspirate (or decant). Avoid foaming during the addition of the Working Wash solution.
8. Let the tubes stand upright for two minutes and aspirate the remaining drop of liquid.
9. Count tubes in a gamma counter for 60 seconds.

XI. CALCULATION OF RESULTS

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

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

3. 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 (analog) 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 -hydroxypregnanolone	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	$\text{\bar{X}} \pm \text{SD}$ (ng/ml)	CV (%)	Serum	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 Deviation; CV: Coefficient of variation

D. Accuracy

DILUTION TEST

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

Samples were diluted with the zero calibrator.

RECOVERY TEST

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

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

E. Time delay between last calibrator and sample dispensing

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

TIME DELAY

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

XIV. INTERNAL QUALITY CONTROL

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

XV. REFERENCE INTERVALS

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

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

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

XVI. PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

For *in vitro* diagnostic use only.

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

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

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

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

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

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

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

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

For more information, see Material Safety Data Sheet (MSDS).

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, 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, 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 room temperature (18-25°C) with continuous shaking
Separation	-	Aspirate 2.0 ml	Aspirate carefully
Counting			Count tubes for 60 seconds

Diasource's Instrumentation Service confirms that the kit is valid for use on the platform Stratec Riamat 300. If you need any additional information, please contact IVDInstrumentation@diasource.be

Other translations of this Instruction for Use can be downloaded from our website: <https://www.diasource-diagnostics.com/>



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 84.99.91

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 (18-25°C), 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 Calibrateur zéro dans du sérum humain et du thymol	1 flacon lyophilisé	Jaune	Ajouter 0,5 ml d'eau distillée
CAL N Calibrateurs Androsténédione - N = 1 à 5 (cfr. valeurs exactes sur chaque flacon) dans du sérum humain et du thymol	5 flacons lyophilisés	Jaune	Ajouter 0,5 ml d'eau distillée
WASH SOLN CONC Solution de lavage (TRIS-HCl)	1 flacon 10 ml	Brun	Diluer 70x avec de l'eau distillée (utiliser un agitateur magnétique).
CONTROL N Contrôles - N = 1 ou 2 dans du plasma humain et du thymol (cfr. valeurs exactes sur chaque flacon)	2 flacons lyophilisés	Gris	Ajouter 0,5 ml d'eau distillée

Note : Utiliser le calibrateur zéro pour la dilution des échantillons

VI. MATERIEL NON FOURNI

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

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

VII. PREPARATION DES REACTIFS

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

VIII. STOCKAGE ET DATE D'EXPIRATION DES REACTIFS

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

IX. PREPARATION ET STABILITE DE L'ECHANTILLON

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

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

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

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 (18-25°C) 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. Chaque tube ne peut être utilisé qu'une seule fois.

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 (18-25°C) 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 :

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

3. 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/Bo (%)
Activité totale	48670	
Calibrateur		
0,0 ng/ml	14867	100,0
0,1 ng/ml	13196	88,8
0,4 ng/ml	9450	63,6
1,0 ng/ml	5910	39,8
4,0 ng/ml	2746	18,5
11,0 ng/ml	987	6,6

XIII. PERFORMANCE ET LIMITES DU DOSAGE

A. Limite de détection

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

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

B. Spécificité

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

Composé	Réactivité Croisée (%)
Androstérone	0,0566
Cortisol	0,0148
Corticostérone	0,0047
Cortisone	0,0099
DHEA	0,0155
DHEA-SO ₄	0,0009
21-Déoxycortisone	0,0006
Estradiol-17 β	ND
Estriol	ND
Estrone	0,0270
Etiocochenolone	0,0422
17 α -hydroxypregnénolone	ND
17 α -Hydroxyprogéstérone	0,0840
Isoandrostérone	0,0112
Pregnénolome	ND
Progéstérone	0,0168
Spironolactone	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	$\text{} \pm \text{SD}$ (ng/ml)	CV (%)	Sérum	N	$\text{} \pm \text{SD}$ (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 : Déviation Standard; CV: Coefficient de variation

D. Exactitude

TEST DE DILUTION

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

Les échantillons ont été dilués avec le Calibrateur zéro.

TEST DE RECUPERATION

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

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

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

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

DELAI

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

XIV. *CÔNTROLE 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 duplicat des échantillons doivent être basés sur les pratiques de laboratoire courantes.

XV. VALEURS ATTENDUES

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

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

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

XVI. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

Sécurité

Pour utilisation en diagnostic *in vitro* uniquement.

Cette trousse contient de l'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.

Pour plus d'informations, consultez la fiche signalétique (MSDS)

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, 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. RESUME DU PROTOCOLE

	ACTIVITE TOTALE (μl)	CALIBRATEURS (μl)	ECHANTILLON(S) CONTROLES (μl)
Calibrateurs (0 à 5) Echantillons, contrôles Traceur	- - 250	25 - 250	- 25 250
Incubation			1 heure à température ambiante (18-25°C) sous agitation continue.
Séparation Solution de Lavage Séparation	-	aspiration 2,0 ml aspiration	
Comptage (radioactivité)			Temps de comptage des tubes : 60 secondes

Le service d'instrumentation de Diasource confirme que le kit est valable pour une utilisation sur la plate-forme Stratec Riamat 300. Si vous avez besoin d'informations supplémentaires, veuillez contacter IVDInstrumentation@diasource.be



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 84.99.91

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 equivalenten 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 geëmmobiliseerd zijn aan de wand van een buisje van polystyreen. Na een incubatieperiode van 1 uur bij kamertemperatuur (18-25°C), 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 boveni 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 <i>(zie de exacte waarden op de flaalconetiketten)</i> in humaan plasma 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 <i>(zie de exacte waarden op de flaalconetiketten)</i>			

Opmerking: Gebruik de nulkalibrator voor monsterverdunningen

VI. NIET MEEGELEVERDE MATERIALEN

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

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

VII. BEREIDING VAN HET REAGENS

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

VIII. OPSLAG EN VERVALDATUM VAN REAGENTIA

- Vóór opening of reconstitutie zijn alle kitcomponenten houdbaar tot de vervaldatum, zoals vermeld op het etiket, indien zij bewaard werden bij 2 tot 8°C.
- Na reconstitutie zijn de kalibrators en controles gedurende 1 week houdbaar bij 2 tot 8°C. Voor een langere 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. MONSTERAFNAME EN MONSTERBEREIDING

- Serum en plasmamonsters moeten bij 2-8°C bewaard worden.
- Indien de bepaling niet binnen 24 uur uitgevoerd wordt, dan wordt aanbevolen om ze bij -20°C te bewaren.
- Vermijd herhaalde invriezing en 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 (18-25°C) 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. Elke tube kan maar één keer worden gebruikt.

B. Procedure

1. Etiketteer de gecoate buisjes in duplo voor elke kalibrator, voor elk monster, voor elke controle. Etiketteer 2 normale buisjes voor de bepaling van de totaaltellingen.
2. Vortex de kalibrators, monsters en controles gedurende korte tijd en distribueer 25 μl van elk in het desbetreffende buisje.
3. Distribueer 250 μl Androstenedione dat met ^{125}I gelabeld werd in elk buisje, inclusief de niet gecoate buisjes voor de totaaltellingen.
4. Schud het rek met de buisjes voorzichtig zodat eventuele ingesloten luchtbellen vrijkomen.
5. Incubeer gedurende 1 uur bij kamertemperatuur (18-25°C) terwijl er voortdurend mee geschud wordt.
6. Zuig de inhoud van elk buisje (met uitzondering van de totaaltellingen) op. Zorg ervoor dat de plastic tip van de aspirator tot aan de bodem van het gecoate buisje komt zodat alle vloeistof verwijderd wordt.
7. Was de buisjes met 2 ml werk-wasvloeistof (met uitzondering van de totaaltellingen) en zuig op. Vermijd schuimvorming tijdens toevoeging van de werk-wasvloeistof.
8. Na de wasfase moeten de buisjes gedurende twee minuten rechtop blijven staan en zuig daarna de overblijvende vloeistof op.
8. Tel de buisjes in een gammateller gedurende 60 seconden.

XI. BEREKENING VAN DE RESULTATEN

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

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

3. Zet de (B/B₀(%)) waarden uit voor elk kalibratorpunt, als een functie van de Androstenedione concentratie van elk kalibratorpunt 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/B0(%)) te interpoleren.
- Voor elke bepaling moet het totaalpercentage van de tracer, gebonden in afwezigheid van ongelabeld Androstenedione (B0/T), gecontroleerd worden.

XII. KENMERKENDE GEGEVENS

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

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

XIII. EIGENSCHAPPEN EN GRENZEN

A. Detectielimiet

Twintig 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 -hydroxypregnenolone	ND
17 α -Hydroxyprogesterone	0,0840
Isoandrosterone	0,0112
Pregnenolone	ND
Progesterone	0,0168
Spironolactone	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

Serum	N	<X> ± SD (ng/ml)	VC (%)	Serum	N	<X> ± 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. Tijdspanne tussen de laatste kalibrator en distributie van het monster

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

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

XIV. INTERNE KWALITEITSCONTROLE

- Indien de resultaten, die verkregen werden voor controle 1 en/of controle 2, niet binnen het bereik vallen zoals vermeld op het 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 conserveremiddel) 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.

Zie veiligheidsinformatieblad (MSDS) voor meer informatie

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. Barend-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.
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) Monsters, controles Tracer	- - 250	25 - 250	- 25 250
Incubatie			1 uur bij kamertemperatuur (18-25°C) terwijl er voortdurend geschud wordt
Scheiding Werk-wasoplossing Scheiding	-		opzuigen 2,0 ml opzuigen
Telling			Tel buisjes gedurende 60 seconden

Diasource's Instrumentation Service bevestigt dat de kit geldig is voor gebruik op het platform Stratec Riamat 300. Neem voor meer informatie contact op met IVDInstrumentation@diasource.be



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 84.99.91

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. Darüber hinaus kann der Androstendion-Wert gegenüber dem 17-Hydroxyprogesteron-Wert bei der Kontrolle der Behandlung dieser Erkrankung Vorteile bieten, z.B. weniger ausgesprochene Schwankung im Tagesverlauf und geringere Suppression nach kurzer Glukokortikoid-Exposition (4). Die Androstendion-Werte im Serum sind auch beim polyzystischen Ovariensyndrom, 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 (18-25°C), beendet das Absaugen die Verdrängungsreaktion. Die Röhrchen werden anschliessend mit Waschlösung gewaschen, danach wird nochmals abgesaugt. Eine Standardkurve wird gedruckt und die ANDROSTENDION-Konzentrationen der Proben werden über Dosis Interpolation der Kalibrationskurve bestimmt.

V. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

Reagenz	96 Test Kit	Farbcode	Rekonstitution
Mit anti Androstendion - beschichtete Röhrchen	2 x 48	Gelb	gebrauchsfertig
Ag ^{125}I	1 Gefäß 26 ml 111 kBq	Rot	gebrauchsfertig
TRACER: ^{125}I -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 Humanplasma und Thymol (genaue Werte auf Gefäß-Etiketten)			

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 (18-25°C).
 Mischen Sie alle Reagenzien und Proben gründlich durch sanftes Schütteln oder Rühren.
 Verwenden Sie saubere Einwegpipettenspitzen, um Kreuzkontamination zu vermeiden. Präzisionspipetten oder ein automatisches Pipettiersystem erhöhen die Präzision.
 Achten Sie auf die Einhaltung der Inkubationszeiten.
 Erstellen Sie für jeden Durchlauf eine Kalibrationskurve, verwenden Sie nicht die Daten von früheren Durchläufen.
 Jedes Röhrchen kann nur einmal verwendet werden.

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 -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 (18-25°C) 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:

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

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

Bemerkung: Diese Tabelle zeigt die Kreuzreaktivität für die anti-

ANDROSTENDION

NN: nicht nachweisbar

C. Präzision

INTRA-ASSAY PRÄZISION

INTER-ASSAY PRÄZISION

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

SD: 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 Abflussröhren reagieren und so hochexplosive Metallazide bilden. Spülen Sie während der Waschschriften den Abfluss gründlich mit viel Wasser, um die Metallazidbildung zu verhindern.

Weitere Informationen finden Sie im Sicherheitsdatenblatt (MSDS).

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

XVII. LITERATUR

1. Dorfman RI, Shipley RA : **Androgens**. John Wiley and Sons, New York, pp. 116-128, 1956.
2. Horton R, Tait J : **Androstenedione production and interconversion rates measured in peripheral blood and studies on the possible site of its conversion to testosterone**. J Endocrinol Invest 45:301-313, 1966.
3. Pang S, Riddick L : Hirsutism. IN Lifshitz T (ed) : **Pediatric Endocrinology, A Clinical Guide, second edition**. Marcel Dekker, Incl., New York, pp. 259-291, 1990.
4. Cavallo A, Corn C, Bryan GT, Meyer WJ III : **The use of plasma androstenedione in monitoring therapy of patients with congenital adrenal hyperplasia**. J Pediatr 95:33-37, 1979. Bull NY Acad Med 53, 347, 1977
5. Barett-Connor E, Garland C, McPhililips JB, Kaw K-T, Wingard DL : **A prospective, population based study of androstenedione, estrogens and prostate cancer**. Canc res 50:169-173, 1990.
6. Rittmaster RS, Thompson DL : **Effects of leuprolide and esamephasone 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 (18-25°C) unter ständigem Schütteln.		
Separation Waschlösung Separation	- - -	Absaugen (oder dekantieren) 2,0 ml Absaugen (oder dekantieren)	
Auswertung	Messen der Röhrchen 60 Sekunden		

Der Instrumentation Service von Diasource bestätigt, dass das Kit für die Verwendung auf der Plattform Strattec Riamat 300 gültig ist. Wenn Sie zusätzliche Informationen benötigen, wenden Sie sich bitte an IVDInstrumentation@diasource.be



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 84.99.91

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 (18-25°C), la reazione di competizione viene interrotta per aspirazione della miscela di reazione. Le provette vengono quindi lavate con tampone di lavaggio diluito e aspirate. La concentrazione di Androstenedione nei campioni viene calcolata per interpolazione sulla curva calibratore.

V. REATTIVI FORNITI

Reattivi	Kit da 96 test	Codice colore	Volume di ricostituzione
Provette sensibilizzate con anticorpo anti DELTA 4	2 x 48	giallo	Pronte per l'uso
Ag 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 plasma umano e timolo (le concentrazioni esatte degli calibratore sono riportate sulle etichette dei flaconi)			

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.

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

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

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 (18-25°C). Mescolare delicatamente i campioni per inversione o rotazione. Per evitare cross-contaminazioni, cambiare il puntale della pipetta ogni volta che si usa 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. Ogni tubo può essere utilizzato una sola volta.

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 (18-25°C) 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).

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

- 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.

6. Per ogni dosaggio determinare la capacità legante B0/T.

XII. CARATTERISTICHE TIPICHE

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

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

XIII. CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO

A. Sensibilità

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

B. Specificità

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

Composto	Cross-Reattività (%)
Androsterone	0,0566
Cortisolo	0,0148
Corticosterone	0,0047
Cortisone	0,0099
DHEA	0,0155
DHEA-SO ₄	0,0009
21-Deoscorticosterone	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 -Dihidrotestosterone	0,0105
Testosterone	0,2406

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

Questa tabella mostra
ND : non dosabile

C. Precisione

INTRA SAGGIO

INTER SAGGIO

Siero	N	$\text{} \pm \text{SD}$ (ng/ml)	CV (%)	Siero	N	$\text{} \pm \text{SD}$ (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 DILUIZIONE

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

I campioni sono stati diluiti con calibratore zero.

TEST DI RECUPERO

Campione	Androstanedione aggiunto (ng/ml)	Androstanedione 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.

Per ulteriori informazioni, consultare la scheda di sicurezza (MSDS)

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, Inc., New York, pp. 259-291, 1990.
- Cavollo 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 esametehasone o hair growth and hormone levels in hirsute women : the relative importance of the ovary and adrenal in the pathogenesis of hirsutism. *J Clin Endocrinol Metab* 70:112-116, 1993.
- Zwicker H, Rittmaster RS : Androsterone sulfate : Physiology and significance in hirsute women. *J Clin Endocrinol Metab* 76:112-116, 1993.

XVIII. SCHEMA DEL DOSAGGIO

	Attività totale μl	Calibratore μl	Campioni Controlli μl
Calibratore (0 - 5)	-	25	-
Campioni, controlli	-	-	25
Marcato	250	250	250
Incubazione	1 ore a temperatura ambiente (18-25°C) in agitazione.		
Separazione		Aspirare 2 ml	
Soluzione di lavoro del tamponcino di lavaggio			Aspirare
Separazione			
Conteggio	Contare le provette per 1 minuto		

Il servizio di strumentazione di Diasource conferma che il kit è valido per l'uso sulla piattaforma Stratec Riamat 300. Se sono necessarie ulteriori informazioni, contattare IVDInstrumentation@diasource.be



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 84.99.91

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 varían 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. Despues de 1 hora de incubación a temperatura ambiente (18-25°C), 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 125I	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%)			
CAL 0	1 vial liofilizados	amarillo	Añadir 0,5 ml de agua destilada
Calibrador cero en suero humano con thymol			
CAL 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			
WASH SOLN CONC	1 vial 10 ml	marrón	Diluir 70 x con agua destilada (utilizar agitador magnético)
Solución de lavado (TRIS-HCl)			
CONTROL N	2 viales liofilizados	plateado	Añadir 0,5 ml de agua destilada
Controles - N = 1 o 2 en plasma humano con thymol (mirar los valores exactos en las etiquetas)			

Nota: Para diluciones de muestras utilizar calibrador cero.

VI. MATERIAL NO SUMINISTRADO

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

1. Agua destilada
2. Pipetas de 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.
- Despues de su reconstitución los calibradores y controles son estables durante una semana a 2-8°C. Para periodos más largos, alicuotar y guardar a -20°C. Evitar congelar y descongelar sucesivamente.
- La solución de lavado de trabajo recién preparada solo debe utilizarse en el mismo día.
- Despues 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 numero de lote. Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente (18-25°C) antes de su uso.

Agitar muniosamente todos los reactivos y muestras, agitándolos o girándolos suavemente. Con el fin de evitar ninguna contaminación utilizar puntas de pipetas desechables y limpias para la adición de cada reactivo y muestra.

El uso de pipetas de precisión ó equipamiento de dispensación automática mejorara la precisión. Respetar los tiempos de incubación.

Preparar la curva de calibración en cada ensayo, no utilizar los datos de un ensayo previo.

Cada tubo solo se puede usar una vez.

B. Protocolo

1. Marcar los tubos recubiertos por duplicado para cada unos de los estándares, muestras y controles. Para la determinación de las Cuentas Totales, marcar 2 tubos normales.
2. Agitar brevemente los calibradores, muestras y controles y dispensar 25 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 (18-25°C) 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 formula:

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

3. 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
Isoandroterona	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, lo cuales se guardan en alícuotas congeladas.
- Los criterios de aceptación de la diferencia entre los resultados in duplo de las muestras se apoyan en las prácticas de laboratorio corrientes.

XV. INTERVALOS DE REFERENCIA

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

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

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

XVI. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Seguridad

Para uso solo en diagnóstico in vitro.

Este kit contiene 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.

Para obtener más información, consulte la Hoja de datos de seguridad del material (MSDS)

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-Conner 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 esamefetahasone 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. RESUMEN DEL PROTOCOLO

	CUENTAS TOTALES (μl)	CALIBRADO RES (μl)	MUESTRA(S) CONTROL(S) (μl)
Calibradores (0 al 5)	-	25	-
Muestras, controles	-	-	25
Trazador	250	250	250
Incubación	1 hora a temperatura ambiente (18-25°C) en agitación constante.		
Separación	-	aspirar 2,0 ml	aspirar
Solución de lavado de trabajo	-		
Separación	-		
Contaje	Contar los tubos durante 60 segundos		

El servicio de instrumentación de Diasource confirma que el kit es válido para su uso en la plataforma Stratec Riamat 300. Si necesita información adicional, comuníquese con IVDInstrumentation@diasource.be



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 84.99.91

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 decrece 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 imobilizado nas paredes dos tubos de poliestireno. Após 1 hora de incubação a temperatura ambiente (18-25°C) no shaker, a reacção de competição termina com a operação de aspiração. A seguir os tubos são lavados com 2ml de solução de lavagem de trabalho e novamente aspirados. Traça-se uma curva de calibração e as concentrações de Androstenediona nas amostras são determinadas por interpolação da dose a partir da curva de calibração.

V. REAGENTES FORNECIDOS

Reagentes	Kit 96 Testes	Código de cor	Reconstituição
Tubos revestidos com anti Androstenedione	2 x 48	amarelo	Pronto para utilizar
Ag ^{125}I	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 plasma humano e timol (ver os valores exactos nos rótulos do recipiente)	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 (18-25°C) (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.

Cada tubo pode ser usado apenas uma vez.

B. Procedimento

- Rotule os tubos revestidos em duplicado, para cada calibrador, amostra, controlo. Para a determinação das contagens totais, rotule 2 tubos normais.
- Agite levemente no vortex calibradores, amostras e controlos e dispense 25 μl de cada, para os tubos respectivos.
- Dispense 250 μl de Androstenediona marcado com ^{125}I para cada tubo, incluindo os tubos normais para as contagens totais.
- Agite suavemente o suporte dos tubos, para libertar possíveis bolhas de ar.
- Incube por 1 hora a temperatura ambiente (18-25°C) com agitação contínua.
- 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.
- 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.
- Depois da lavagem, deixe os tubos direitos durante 2 minutos e seguidamente aspire a última porção de líquido.
- Conte os tubos num contador gamma durante 60 segundos.

XI. CÁLCULO DOS RESULTADOS

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

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

- 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.
- 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.
- Por interpolação dos valores das amostras (B/B0(%)), determine as concentrações de Androstenediona das amostras da curva de referência.
- 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
Isoandrosterona	0,0112
Pregnenolona	ND
Progesterona	0,0168
Spirolactona	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	$<X> \pm DP$ (ng/ml)	CV (%)	Soro	N	$<X> \pm DP$ (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
	1/1	-	8,94
Soro 2	1/2	4,47	3,89
	1/4	2,24	2,05
	1/8	1,12	0,98
	1/16	0,56	0,49
	1/32	0,28	0,27
	1/64	0,14	0,18
	1/128	0,07	0,09

As amostras foram diluídas com calibrador zero.

TESTE DE RECUPERAÇÃO

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

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

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

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

INTERVALO DE ATRASO DE TEMPO

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

XIV. CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO

- Se os resultados obtidos para o controlo 1 e/ou controlo 2 não estão dentro do intervalo especificado no rótulo do recipiente, os resultados não podem ser utilizados, a menos que seja dada uma explicação satisfatória para a 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

Apênas para uso em diagnóstico *in vitro*.

Este kit contém ^{123}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.

Para obter mais informações, consulte Folha de dados de segurança do material (MSDS)

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 esametehasone o hair growth and hormone levels in hirsute women : the relative importance of the ovary and adrenal in the pathogenesis of hirsutism**. J Clin Endocrinol Metab 70:112-116, 1993.
- Zwicker H, Rittmaster RS : **Androsterone sulfate : Physiology and significance in hirsute women**. J Clin Endocrinol Metab 76:112-116, 1993.

XVIII. RESUMO DO PROTOCOLO

CONTAGENS TOTAIS (μl)	CALIBRADORES (μl)	CONTROLOS DAS AMOSTRAS (μl)
Calibradores (0 to 5) Amostras, controlos Marcador	- - 250	25 - 250
Incubação		1 hora a temperatura ambiente (18-25°C) com agitação contínua
Separação Solução de lavagem de trabalho Separação	-	Aspirat 2,0 ml Aspirat cuidadosamente
Contagem		Contar os tubos durante 60 segundos

O Serviço de Instrumentação da Diasource confirma que o kit é válido para uso na plataforma Stratec Riamat 300. Se você precisar de mais informações, entre em contato com IVDInstrumentation@diasource.be

CE

el

Διαβάστε ολόκληρο το πρωτόκολλο πριν από τη χρήση.

ANDROSTENEDIONE-RIA-CT

I. ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ

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

II. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

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

B. Αριθμός καταλόγου: KIP0451: 96 προσδιορισμοί

G. 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 84.99.91

III. ΚΛΙΝΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

A. Βιολογική δράση

Η 4-ανδροστεν-3, 17-διόνη (Ανδοστενεδίονη) είναι ένα C19 στεροειδές. Παράγεται στα επινεφρίδια και τις γονάδες. Η Ανδοστενεδίονη 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 Ανδοστενεδίονη έχει σχετικά ασθενή ανδρογόνο δράση, που υπολογίζεται σε ≤ 20% της τεστοσετρόνης. Παρότι πρόκειται για ασθενές ανδρογόνο, τα επίπεδα της Ανδοστενεδίονη 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 Ανδοστενεδίονη σε τεστοσετρόνη. Επιπλέον, η συγγένεια της φυλοδεσμευτικής σφαιρίνης για τη Ανδοστενεδίονη είναι πολύ μικρότερη από ότι για τη τεστοσετρόνη ή την οιστραδιόλη (1 – 3).

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

B. Κλινικές εφαρμογές

Η μέτρηση της Ανδοστενεδίονη παρέχει ένα χρήσιμο δείκτη της βιοσύνθεσης ανδρογόνων: Αυξημένα επίπεδα Ανδοστενεδίονη έχουν εμφανιστεί σε αρρενοποιητική συγγενή υπερπλασία των επινεφρίδων. Ακόμη, η μέτρηση των επίπεδων της Ανδοστενεδίονη 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 Ανδοστενεδίονη 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 Ανδοστενεδίονη είναι φυσιολογικά στον ιδιωπαθή δασυτριχισμό. Αυξημένα επίπεδα της Ανδοστενεδίονη 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 ανδροστενεδίονη 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 (18-25°C), η αντίδραση ανταγωνισμού τερματίζεται με ένα βήμα αναρρόφησης. Τα σωληνάρια κατόπιν πλένονται με 2 ml διαλύματος πλύσης εργασίας και αναρροφούνται. Παριστάνεται γραφικά μια καμπύλη βαθμονόμησης και προσδιορίζονται οι συγκεντρώσεις της 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 βάσια καζένη και αζίδιο (<0,1%)			
CAL 0 Μηδενικός βαθμονομητής σε ανθρώπινο ορό και θυμόλη και	1 φιαλίδιο λυοφιλοποιημένο	κίτρινο	Προσθέστε 0,5 ml απεσταγμένου νερού
CAL N Βαθμονομητές - N = 1 έως 5 (δείτε τις ακριβείς τιμές πάνω στις ετικέτες των φιαλιδίων) σε ανθρώπινο ορό και θυμόλη	5 φιαλίδια λυοφιλοποιημένο	κίτρινο	Προσθέστε 0,5 ml απεσταγμένου νερού
WASH SOLN CONC Διάλυμα πλύσης (TRIS-HCl)	1 φιαλίδιο 10 ml	καφέ	Αραιώστε 70 x με απεσταγμένο νερό (χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα).
CONTROL N Οροί ελέγχου - N = 1 ή 2 σε ανθρώπινο πλάσμα και θυμόλη (δείτε τις ακριβείς τιμές πάνω στις ετικέτες των φιαλιδίων)	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 αναλόγιμα πλαστικά ρύγχη)
- Αναμείκτης στροβιλισμού
- 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 μετρησης 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 κατάψυξης-απόψυξης.
- Φρέσκο, παρασκευασμένο διάλυμα πλύσης εργασίας θα πρέπει να χρησιμοποιείται την ίδια ημέρα.
- Μετά την πρώτη χρήση του, ο ιχνηθέτης παραμένει σταθερός έως την ημερομηνία λήξης, εφόσον διατηρείται στο αρχικό, ερμητικά κλειστό φιαλίδιο σε θερμοκρασία 2 έως 8°C.
- Τυχόν μεταβολές της φυσικής εμφάνισης των αντιδραστηρίων του κιτ ενδέχεται να υποδηλώνουν αστάθεια ή αλλοίωση.

IX. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΛΕΙΓΜΑΤΩΝ

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

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

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

X. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

A. Σημειώσεις σχετικά με το χειρισμό

Μη χρησιμοποιείτε το κιτ ή τα συστατικά μετά την ημερομηνία λήξης. Μην αναμειγνύετε υλικά από διαφορετικές παρτίδες κιτ. Φέρτε όλα τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία δωματίου (18-25°C) πριν από τη χρήση. Αναμείξτε καλά όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα με απαλή ανακίνηση ή ανάδευση. Χρησιμοποιείτε ένα καθαρό αναλώσιμο ρύγχος πιπέτας για την προσθήκη κάθε διαφορετικού αντιδραστηρίου και δείγματος προκειμένου να αποφύγετε την επικύρωση. Η ακρίβεια βελτιώνεται με χρήση πιπετών υψηλής ακριβείας ή αυτοματοποιημένου εξοπλισμού διανομής με πιπέτες. Τηρήστε τους χρόνους επώασης. Προετοιμάστε μια καμπύλη βαθμονόμησης για κάθε ανάλυση και μη χρησιμοποιείτε δεδομένα από προηγούμενες αναλύσεις. Κάθε σωλήνας μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο μία φορά.

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 αναμείκητη στροβιλισμού τύπου vortex) ορούς ελέγχου και δείγματα και διανείμετε 25 μl από έκαστο σε αντίστοιχα σωληνάρια.
- Διανείμετε 250 μl Ανδοστενεδίονη σημασμένης με ^{125}I σε κάθε σωληνάριο, συμπεριλαμβάνοντας τα μη επιστρωμένα σωληνάρια που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ^{125}I ("total").
- Ανακινήστε απολύ με το χέρι τη βάση στήριξης των σωληναρίων για να απελευθερώσετε τυχόν παγιδευμένες φυσαλίδες αέρα.
- Επωάστε για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου (18-25°C) με συνεχή ανάδευση.
- Αναφροφήστε (ή μεταγγίστε) το περιεχόμενο κάθε σωληναρίου (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ^{125}I ("total")). Βεβαιωθείτε ότι το πλαστικό ρύγχος του αναρροφητή φθάνει στον πυθμένα του επιστρωμένου σωληναρίου προκειμένου να αφαιρεθεί όλη η ποσότητα του υγρού.
- Πλύνετε τα σωληνάρια με 2 ml διαλύματος πλύσης εργασίας (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ^{125}I ("total")) και αναφροφήστε (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 αναφροφήστε 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.
- Υπολογίστε τη δεσμευμένη ραδιενέργεια ως ποσοστό της δέσμευσης που προσδιορίζεται στο σημείο μηδενικού βαθμονομητή (0) σύμφωνα με τον ακόλουθο τύπο:

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

- 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.
- 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.
- Με αναγωγή των τιμών των δειγμάτων ($B/B0 (%)$), προσδιορίστε τις συγκεντρώσεις Ανδοστενεδιόνη των δειγμάτων από την καμπύλη βαθμονόμησης.
- Για κάθε προσδιορισμό, πρέπει να ελέγχεται το ποσοστό του συνολικού υγρηθέτη που δεσμεύεται εν τη απονομή 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 υγρηθέτη ^{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 μηδενικοί βαθμονομητές μαζί με ένα σύνολο άλλων βαθμονομητών.

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

B. Ειδικότητα

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

Ένωση	Διασταρούμενη αντίδραση (%)
Ανδροεστερόνη	0,0566
Κορτιζόλη	0,0148
Κορτικοστερόνη	0,0047
Κορτιζόνη	0,0099
DHEA	0,0155
DHEA-SO4	0,0009
21-δεξικορτιζόνη	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-διυδροεστοστερόνη	0,0105
Τεστοστερόνη	0,2406

Σημείωση: Στον πίνακα αυτό παρουσιάζεται η διασταρούμενη αντίδραστικότητα για την αντι-Ανδοστενεδιόνη.

Μη ανιχν: μη ανιχνεύσιμο

Γ. Ακρίβεια

ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΙΔΙΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ

ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΜΕΤΑΞΥ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΩΝ

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

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 αραίωθηκαν 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
	1,69		2,08

XIV. ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΣ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

- Εάν τα αποτελέσματα που λαμβάνονται για τον ορό ελέγχου 1 ή/και τον ορό ελέγχου 2 δε βρίσκονται εντός του πεδίου τιμών που καθορίζεται στην ετικέτα του φιαλιδίου, τα αποτελέσματα δεν είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν, εκτός εάν έχει δοθεί ικανοποιητική εξήγηση για την ασυμφωνία.

- Εάν είναι επιθυμητό, κάθε εργαστήριο μπορεί να δημιουργήσει τα δικά του μείγματα δειγμάτων ελέγχου (pools), τα οποία πρέπει να διατηρούνται κατεψυγμένα σε κλάσματα/δόσεις μιας χρήσης.
- Τα κριτήρια αποδοχής για τη διαφορά μεταξύ των διπλών αποτελεσμάτων των δειγμάτων θα πρέπει να βασίζονται σε ορθές εργαστηριακές πρακτικές.

XV. ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

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

Άτομα	N	Μέση τιμή ng/ml	Πεδίο τιμών
ΠΑΙΔΙΑ	25	0,4	0,1 – 0,9
ΑΝΔΡΕΣ	64	2,0	0,5 – 4,8
ΓΥΝΑΙΚΕΣ:	250	2,1	0,5 – 4,7
Ωθυλακική φάση	45	1,9	0,9 – 3,0
Ανώτατο επίπεδο ωθυλακικής φάσης	14	2,9	1,9 – 4,7
Σχρινική φάση	27	2,0	1,1 – 4,2
Σύνδρομο πολύκυστικών ωθηκών	25	3,6	2,2 – 6,5
Μετεμμηνοπαυσιακές	45	1,7	0,3 – 3,7

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

XVI. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

Ασφαλείας

Μόνο για διαγνωστική χρήση *in vitro*.

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

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

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

Τυχόν διαρροές ραδιενεργών υγρών πρέπει να καθαρίζονται αμέσως σύμφωνα με τις διαδικασίες ασφαλείας 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 ασφαλείας 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 μεθόδος δεν είναι δυνατό να παρέχει πλήρη διασφάλιση ότι παράγοντα 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 ασφαλείας.

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 επαρή του δέρματος με αντιδραστήρια (χρησιμοποιείται αζίδιο του νατρίου ως συντηρητικό). Το αζίδιο στο κιτ αυτό ενδέχεται να αντιδράσει με μόλυβδο και χαλκό των υδραυλικών σωληνώσεων και να σχηματίσει με τον τρόπο αυτό ιδιαίτερα εκρηκτικά αζίδια μετάλλων. Κατά τη διάρκεια του βήματος πλύσης, εκτελύνετε 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.

Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στο Φύλλο δεδομένων ασφαλείας υλικού (MSDS)

XVII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Dorfman RI, Shipley RA : **Androgens**. John Wiley and Sons, New York, pp. 116-128, 1956.
2. Horton R, Tait J : **Androstenedione production and interconversion rates measured in peripheral blood and studies on the possible site of its conversion to testosterone**. J Endocrinol Invest 45:301-313, 1966.
3. Pang S, Riddick L : **Hirsutism**. IN Lifshitz T (ed) : **Pediatric Endocrinology, A Clinical Guide, second edition**. Marcel Dekker, Incl., New York, pp. 259-291, 1990.
4. Cavallo A, Corn C, Bryan GT, Meyer WJ III : **The use of plasma androstanedione 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 androstanedione, estrogens and prostate cancer**. Canc res 50:169-173, 1990.
6. Rittmaster RS, Thompson DL : **Effects of leuprolide and esamephasone 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. 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 (18-25°C) με συνεχή ανάδευση	
Διαχωρισμός Διάλυμα πλύσης εργασίας Διαχωρισμός	-	Αναρρόφηση (ή μετάγγιση) 2,0 ml Αναρρόφηση (ή μετάγγιση)
Μέτρηση	Μέτρηση σωληναρίων επί 60 δευτερόλεπτα	

Η υπηρεσία οργάνων της Diasource επιβεβαίωνε ότι το κιτ είναι έγκυρο για χρήση στην πλατφόρμα Stratec Riamat 300. Εάν χρειάζεστε επιπλέον πληροφορίες, επικοινωνήστε με το IVDInstrumentation@diasource.be

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 84.99.91

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 wzrastały 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 przeciwciwfach unieruchomionych na ściance probówki polistyrenowej. Ze względu na wysoką swoistość opłaszczonej przeciwciwf nie jest wymagane zastosowanie ani ekstrakcji, ani chromatografii. Po jednogodzinnej inkubacji w temperaturze pokojowej (18-25°C) w wytrząsarce, wykonanie aspiracji przerywa reakcję kompetycyjną. Następnie próbki są płukane przy pomocy 2 ml roztworu pluczającego i aspirowane. Wykreślana jest krzywa kalibracyjna a stężenia androstenodionu w próbках są określone 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.
	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%).			
	1 fiołka materiał liofilizowany	żółty	Dodać 0,5 ml wody destylowanej
Kalibrator zerowy na bazie surowicy ludzkiej z zawartością tymolu.			
	5 fiołek materiał liofilizowany	żółty	Dodać 0,5 ml wody destylowanej
Kalibrator - N = od 1 do 5 (dokładne wartości na etykietach fiolek) na bazie osocze ludzkiej z zawartością tymolu.			
	1 fiołka 10 ml	brązowy	Rozcieńczyć 70x wodą destylowaną (wykorzystać mieszadło magnetyczne).
Roztwór pluczający (TRIS HCl)			
	2 fiołki materiał liofilizowany	srebrny	Dodać 0,5 ml wody destylowanej
Kontrole - N = od 1 do 2 na bazie surowicy ludzkiej z zawartością tymolu. (dokładne wartości na etykietach fiolek)			

Uwaga: Do rozcieńczeń próbek należy stosować kalibrator zerowy.

VI. MATERIAŁY WYMAGANE, ALE NIEDOSTARCZONE

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

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

VII. PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

- A. **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 (18-25°C).
 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.
 Każda rura może być użyta tylko raz.

B. Procedura

1. Dla każdego kalibratora, próbki i kontroli, należy oznaczyć opłaszczone probówki w badaniach podwójnych. W celu określenia całkowitych zliczeń, należy oznaczyć 2 standardowe probówki.
2. Należy szybko wymieszać, wirując: kalibrator, próbki i kontrole, i dozować po 25 µl każdej substancji do odpowiednich probówek.
3. Do każdej probówki, w tym do próbówek nieopłaszczonych do całkowitego zliczania, należy dodać po 250 µl androstenodionu oznakowanego jodem 125 .
4. Należy delikatnie potrząsnąć statywem, w celu uwolnienia uwięzionych pęcherzyków powietrza.
5. Należy inkubować przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej (18-25°C) ciągle wytrząsając.
6. Należy aspirować (lub odlać) zawartość każdej probówki (z wyjątkiem próbówek do całkowitego zliczania). Aby usunąć cały płyn, należy upewnić się, że plastikowa końcówka aspiratora osiągnęła dno opłaszczonej probówki.
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

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

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

- Należy wykreślić wartości (B/B0(%)) dla każdego punktu kalibratora, jako funkcję stężenia androstenodionu każdego punktu kalibratora. Należy odrzucić oczywiste wartości graniczne.
- 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.
- Nakładając wartości (B/B0 (%)) próbki, należy określić stężenia androstenodionu w próbkach z krzywej kalibracyjnej.
- Dla każdego oznaczenia należy sprawdzić odsetek całkowitego związanego znacznika izotopowego, przy braku nieoznakanego androstenodionu (B0/T).

XII. PRZYKŁAD DANYCH TYPOWYCH

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

ANDROSTENEDION-RIA-CT	cpm	B/B0 (%)
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 przeciwniała poliklonalnego, wykorzystywanego w tym oznaczeniu, została oceniona za pomocą metody RIA jako stosunek ilości androstenodionu, która prowadzi do 50% zahamowania wiążania 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
17 β -Estradiol	n.w.
Estriol	n.w.
Estron	0,0270
Etiocholanolon	0,0422
17 α -hydroksypregnanolon	n.w.
17 α -hydroksyprogesteron	0,0840
Izoandrosteron	0,0112
Pregnenolon	n.w.
Progesteron	0,0168
Spironolakton	0,0006
5 α -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 MIEDZYSERIAMI

Surowica	N	$\text{} \pm \text{SD}$ (ng/ml)	CV (%)	Surowica	N	$\text{} \pm \text{SD}$ (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: Odchylenie standardowe; CV: Współczynnik zmienności

D. Dokładność

BADANIE ROZCIEŃCZENIA

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

Próbki zostały rozcieńczone przy pomocy kalibratora zerowego.

BADANIE ODZYSKU

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

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

E. Opóźnienie pomiędzy oznaczeniem ostatniego kalibratora i dodowaniem 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		
	1,69		
			0,45
			2,08

XIV. WEWNĘTRZNA KONTROLA JAKOŚCI

- Jeżeli wyniki uzyskane dla kontroli 1 i 2 nie znajdują się w zakresie określonym na etykiecie fiolki, wyniki nie mogą zostać wykorzystane, dopóki nie uda się znaleźć właściwego wyjaśnienia tego odchylenia.
- Jeżeli to konieczne, każde laboratorium może wykonać własne próbki zbiorcze w celach kontrolnych, które powinny być zamrożone w małych objętościach.

- Dopuszczalne kryteria, dotyczące różnicy pomiędzy wynikami oznaczeń podwójnych próbek, powinny być zgodne z zasadami prawidłowej pracy w laboratorium.

XV. ZAKRESY REFERENCYJNE

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

osobnicy	N	Medianą (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}T (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 oczyszczane, 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 azydok sodowy jako środek konserwujący). Azydok znajdujący się w zestawie, może reagować z miedzią i ołówkiem w układzie kanalizacyjnym, tworząc związki o właściwościach wybuchowych. W czasie płukania odprowadzany płyn należy płukać dużymi objętościami wody, aby zapobiec kumulacji azydków.

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

Aby uzyskać więcej informacji, zobacz kartę charakterystyki materiału (MSDS)

XVII. BIBLIOGRAFIA

1. Dorfman RI, Shipley RA : **Androgens**. John Wiley and Sons, New York, pp. 116-128, 1956.
2. Horton R, Tait J : **Androstenedione production and interconversion rates measured in peripheral blood and studies on the possible site of its conversion to testosterone**. J Endocrinol Invest 45:301-313, 1966.
3. Pang S, Riddick L : **Hirsutism**. IN Lifshitz T (ed) : **Pediatric Endocrinology, A Clinical Guide, second edition**. Marcel Dekker, Inc., 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, 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 esamephasone 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. 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 (18-25°C) w wytrząsając.	
Rozdzielenie Roboczy roztwór pluczający Rozdzielenie	- - -	Aspiracja (lub odlewanie) 2,0 ml Aspiracja (lub odlewanie)
Zliczanie	Zliczanie próbówek przez 60 sekund	

Usługa Instrumentacji Diasource potwierdza, że zestaw jest ważny do użycia na platformie Stratec Riamat 300. Jeśli potrzebujesz dodatkowych informacji, skontaktuj się z IVDInstrumentation@diasource.be



bu

Прочетете целия протокол преди употреба

ANDROSTENEDIONE-RIA-CT

I. УПОТРЕБА

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

II. ОБИЦА 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 84.99.91

III. КЛИНИЧЕН ПРЕГЛЕД

A. Биологична активност

4-андростен-3, 17-дион (андростендион) представлява стероид C19. Той се произвежда в надбъбречната жлеза и гонадите. Андростендионът е непосредствен прекурсор на тестостерона и естрона, които впоследствие могат да се превърнат в естрадиол. Поради наличието на 17-оксо (а не на хидроксилна) група, андростендионът притежава относително слаба андрогенна активност, 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 свързващия полови хормон глобулин към андростендиона е много по-малък от афинитета му към тестостерона или естрадиола (1 – 3).

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

B. Клинични приложения

Измерването на стойностите на андростендиона е полезен маркер за андрогенната биосинтезата: повишени нива на андростендион се наблюдават при вирилизираща вродена хиперплазия на надбъбречната жлеза (водеща до повишаване и ускоряване на половата зрялост); освен това измерването на нивата на андростендиона има предимства пред измерването на нивата на 17-хидрокси-прогестерона при наблюдаване лечението на това състояние, като например установяването на по-слаба амплитуда на денонощната променливост и по-слабо потискане след кратко прилагане на глюкокортикоиди (4). Серумните нива на андростендион се увеличават и при синдрома на поликистозни яйчници, при хипертекоза на стромата на яйчниците, дефицит на 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 едночасова инкубация на стайна температура ($18\text{--}25^\circ\text{C}$) 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	1 флакон 26 ml 111 kBq	червен	Готов за употреба
ПРОСЛЕДЯВАЩО ВЕЩЕСТВО: АНДРОСТЕНДИОН, натоварен с ^{125}I йод (HPLC скала) в буфер с волски казеин и азид (<0.1%)			
CAL 0	1 флакон лиофилизирани	жълт	Добавете 0,5 ml дестилирана вода
Нулев Калибратор в човешки серум с тимол			
CAL N	5 флакона лиофилизирани	жълт	Добавете 0,5 ml дестилирана вода
Калибратор - N = 1 до 5 (виж точните стойности на етикета на флаconите) Нулев Калибратор в човешки серум с тимол			
WASH SOLN CONC	1 флакон 10 ml	кафяв	Разредете 70x с дестилирана вода (използвайте магнитен сепаратор)
Измиващ разтвор (TRIS-HCl)			
CONTROL N	2 флакона лиофилизирани	сребърен	Добавете 0,5 ml дестилирана вода
Контроли 1 и 2 в човешка плазма, тимол (виж точните стойности на етикета на флаconите)			

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 измивящ разтвор (70x). Използвайте магнитен сепаратор, за да хомогенизирате. Изхвърлете неупотребеното количество от работния измиващ разтвор в края на деня.

VIII. СЪХРАНЕНИЕ И СРОК НА ГОДНОСТ НА РЕАГЕНТИТЕ

- Всички компоненти на кита са стабилни до датата на срока на годност, посочен на опаковката, при температура на съхранение от 2°C до 8°C преди отваряне или реконституиране.
- След реконституиране, калибраторите и контролите са стабилни за срок от 7 дни при температури $2\text{--}8^\circ\text{C}$. 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 $2\text{--}8^\circ\text{C}$.
- Промени във физическия вид на реагентите на кита индицират нестабилност или негодност.

IX. СЪБИРАНЕ НА ПРОБИТЕ И ОБРАБОТКА

- Серумните или плазмените преби трябва да се съхраняват при температури $2\text{--}8^\circ\text{C}$.
- 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 ($18\text{--}25^\circ\text{C}$). Внимателно смесвайте всички реагенти с пробите чрез нежно раклащане или въртеливо размесване. За да избегнете кръстосана контаминация, използвайте чист пипетен накрайник за еднократна употреба за добавянето на всеки реагент към съответната проба.

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

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

Всяка епруветка може да се използва само веднъж.

B. Процедура

- Означете две по две покритите епруветки за всеки калибратор, контрола и преба. За определяне на общия брой импулси, обозначете 2 нормални епруветки.
- Разплатете за кратко време калибраторите, контролите и пребите 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.
- Разплатете нежно с ръка контейнера с епруветките, за да освободите всяко останало въздушно мехурче.
- Инкубрайте за 1 час на стайна температура ($18\text{--}25^\circ\text{C}$) при непрекъснато раз克拉щане.
- Аспирирайте (или прелейте) съдържанието на всяка епруветка (освен епруветките за определяне на общия брой импулси). Уверете се, че пластмасовият край на аспиратора достига дължото 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 свързвашата радиоактивност като процент от свързването, определен при нулевата калибрационна точка (0) според следната формула :

3. Нанесете (B/B₀(%)) 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 обработката на резултатите, се препоръчва подходяща 4-параметрова логистична крива.
5. Чрез интерполяция на (B/B₀ (%)) стойностите от пробата се определят АНДРОСТЕНДИОН концентрациите на пробите от калибрационната крива.
6. Процентът на общото проследяващо вещество, свързано при липса на ненатоварен АНДРОСТЕНДИОН (B₀/T), трябва да се провери за всяко изследване.

XII. ХАРАКТЕРНИ ДАННИ

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

ANDROSTENEDIONE-RIA-CT	cpm	B/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-деоксикортизон	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

МЕЖДУ ИЗПИТВАНЕТО

Серум	N	$\text{\bar{x}} \pm \text{SD}$ (ng/ml)	CV (%)	Серум	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 : Стандартно отклонение; CV: Коефициент на вариация

D. Точност

ТЕСТ С РАЗРЕЖДАНЕ

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

Пробите бяха разредени с нулев калибратор

ВЪЗСТАНОВИТЕЛЕН ТЕСТ

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

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

Д. Закъснение

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 пробы, 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. РЕФЕРЕНТИНИ 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 (полужivot: 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 крайния потребител. Този продукт не бива в никакъв случай да се прилага на хора или животни.

Боравенето с радиоактивния продукт трябва да се извърши в определена за целта територия, далеч от регуляри 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 осигуряват 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 преби трябва да бъде в съответствие с местните процедури по безопасност.

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

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

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

За повече информация вижте Информационен лист за безопасност на материалите (MSDS)

XVII. БИБЛИОГРАФИЯ

1. Dorfman RI, Shipley RA : **Androgens**. John Wiley and Sons, New York, pp. 116-128, 1956.
2. Horton R, Tait J : **Androstenedione production and interconversion rates measured in peripheral blood and studies on the possible site of its conversion to testosterone**. J Endocrinol Invest 45:301-313, 1966.
3. Pang S, Riddick L : Hirsutism. IN Lifshitz T (ed) : **Pediatric Endocrinology, A Clinical Guide, second edition**. Marcel Dekker, Incl., New York, pp. 259-291, 1990.
4. Cavallo A, Corn C, Bryan GT, Meyer WJ III : **The use of plasma androstenedione in monitoring therapy of patients with congenital adrenal hyperplasia**. J Pediatr 95:33-37, 1979. Bull NY Acad Med 53, 347, 1977
5. Barrett-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.
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. 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 (18-25°C) при непрекъснато разклащане.		
Сепарация Измиваш разтвор Сепарация	- - -	Аспирирайте 2,0 ml Аспирирайте внимателно	
Броене	Отчетете епруветките за 60 секунди		

Инструментацията на Diasource потвърждава, че комплектът е валиден за използване на платформата Stratec Riamat 300. Ако имате нужда от допълнителна информация, моля свържете се с IVDInstrumentation@diasource.be



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 84.99.91

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 tesztoszteronének 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-hidroxisteroid-dehydrogenáz 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 férfin 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 mennyiségi ^{125}I -dal jelölt androsztendion verseng a mintában vagy a kalibrátorban található androsztendionnal a polisztrén csövek falához rögzített ismert mennyiségi ellenanyag kötőhelyeiért. A csöveket egy órán át szobahőmérsékleten ($18\text{--}25^\circ\text{C}$) rázatva kell inkubálni, majd a folyadékot el kell távolítani. Ekkor a kompetitív reakció leáll. A csöveket ezután át kell mosni 2 ml hígított mosóoldattal, majd a folyadékot ismét el kell távolítani. A kalibrátorok segítségével felrajzolható egy kalibrációs görbe, amiről a minták androsztendion-koncentrációi interpolációval olvashatók le.

V. A REAGENSKÉSZLET TARTALMA

Reagens	Mennyiség 96 mintához	Szín	Feloldás
Anti-androsztendionnal borított csövek	2 x 48	sárga	Használatra kész
Ag 125I	1 ampulla 26 ml 111 kBq	piros	Használatra kész
TRACER: ^{125}I -dal jelölt androsztendion (HPLC tiszta) 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 vérsvában			
CAL N	5 ampulla liofilizált	sárga	Adjon hozzá 0,5 ml desztillált vizet
Androsztendion kalibrátorok - N = 1 - 5 (a pontos értékeket 1. az ampullák címekén) thymolt tartalmazó emberi vérsvában			
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 humán plazma (a pontos értékeket 1. az ampullák címekén)			

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:

- Desztilláltvíz
- Pipetták: 25 μl , 250 μl , 500 μl és 2 ml beméréséhez (ajánlott pontos pipetták és eldobható műanyag pipettahegyek használata)
- Vortex
- Mágneses keverő
- Rázógép (400 rpm)
- 5 ml automata fecskendő (Cornwall) a mosáshoz
- Vízlelgszivattyú (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:** Készítsen megfelelő mennyiségi hígított mosóoldatot úgy, hogy 69 rész desztillált vízhez 1 rész mosóoldatot (70x) kever. Homogenizálja mágneses keverő segítségével. A napi vizsgálatok végezteivel 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 csőbe szétosztva -20°C-on lefagyásztva legfeljebb 3 hónapig eltarthatók. Kerülje a többszöri lefagyásztást és felolvastást.
- A frissen készült hígított mosóoldatot még aznap fel kell használni.
- Amennyiben felnyitás után a traceret az eredeti, jól lezárt ampullában 2-8°C-on tárolja, akkor a címkén feltüntetett időpontig eltartható.
- A reagensek fizikai tulajdonságainak megváltozása valószínűleg azt jelzi, hogy megomlottak.

IX. MINTAVÉTEL ÉS ELŐKÉSZÍTÉS

- Tárolja a vérsavot vagy vérplazma mintákat 2-8°C-on.
- Amennyiben nem végzi el a vizsgálatot 24 órán belül, ajánlott a mintákat -20°C-on szétosztva tárolni.
- Kerülje a minták többszöri lefagyásztását 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. Használat előtt várja meg, amíg a reagensek szobahőmérsékletre ($18\text{--}25^\circ\text{C}$) melegednek. Óvatos mozgatással vagy keveréssel alaposan homogenizálja a reagenseket. minden reagens és minta beméréséhez használjon tiszta eldobható pipettahegyet, hogy elkerülje az anyagok beszenyeződését. 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. minden cső csak egyszer használható fel.

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 mintákból a megfelelő csövekbe.
- Mérjen 250 μl tracer minden csöbe (a totálokba is).
- Kézzel óvatosan rázza meg a kémcsőállványt, hogy a csövekben maradt levegőbuborékok eltávozzanak.
- Folyamatos rázatás mellett inkubálja a csöveket szobahőmérsékleten ($18\text{--}25^\circ\text{C}$) 1 órán át.
- Szírja le (vagy öntse le) a csövek tartalmát (kivéve a totálok). Ügyeljen, hogy a vízlelgszivattyú miatt hegye leérjen a csövek aljáig, és így az összes folyadékot eltávolítsa.
- Mossa a csöveket 2 ml hígított mosóoldattal (kivéve a totálokat), majd távolítsa el a folyadékot. Vigyázzon, hogy a mosóoldat beméréskor ne habosodjon.
- Hagyja általi a csöveket 2 percig, majd távolítsa el a megmaradt folyadékcsépet.
- Mérje a radioaktivitást gamma-sugárzásmérővel 60 másodpercig.

XI. EREDMÉNYEK KISZÁMÍTÁSA

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

$$\text{B/B0 \%} = [\text{kontroll vagy minta cpm} / \text{B0 (nulla kalibrátor) cpm}] \times 100$$
- Ábrázolja a kalibrátorok B/B0(%) értékeit a hozzájuk tartozó androsztendion-koncentrációk függvényében. Hagya figyelen 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 bekötődő tracer százalékos mennyiségét (B0/T).

XII. JELLEMZŐ MÉRÉSI EREDMÉNYEK

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

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

XIII. A VIZSGÁLAT JELLEMZŐI ÉS KORLÁTAI

A. A kimutathatóság alsó határa

Húsz nulla 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 androstendion bekötődését 50%-ban gátló androstendion-mennyiségnél, és az azonos mértékű gátlást okozó keresztreagáló vegyületek (analógok) mennyiségek hányadosát.

Vegyület	Keresztreaktivitás (%)
Androszteron	0.0566
Kortizol	0.0148
Kortikoszteron	0.0047
Kortizon	0.0099
DHEA	0.0155
DHEA-SO ₄	0.0009
21-deoxikortizon	0.0006
17β-Osztradiol	NK
Osztriol	NK
Osztron	0.0270
Etiocolanolone	0.0422
17α-hidroxipregnénolon	NK
17α-hidroxiprogesteron	0.0840
Izoandroszteron	0.0112
Pregnénolon	NK
Progesteron	0.0168
Spironolaktón	0.0006
5α-dihidrotestoszteron	0.0105
Tesztoszteron	0.2406

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

C. Reprodukálhatóság

VIZSGÁLATON BELÜLI

VIZSGÁLATOK KÖZÖTTI

Savó	N	$\text{X} \pm \text{SD}$ (ng/ml)	CV (%)	Savó	N	$\text{X} \pm \text{SD}$ (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 koefficiens

D. Pontosság

HÍGÍTÁSI VIZSGÁLAT

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

A minták hígítása a nulla kalibrátorral történt.

VISSZANYERÉS

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

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

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

Ahogy ezt az alábbi adatok is mutatják, a vizsgálat eredményeit nem befolyásolja, ha egy minta bemérése akár 24 percssel 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 címkein 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 szétoztatva, lefagyaszva 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, használatára, és cseréjére az adott ország törvényei érvényesek. A reagensek alkalmazása emberek és állatokon is minden körfülmények között tilos.

Minden, radioaktív reagenssel végzett műveletet egy arra kijelölt, elkülönített helyen kell elvégezni. A laboratóriumba érkezett radioaktív anyagok átvételéről és tárolásáról vezetett jegyzőkönyvet a laboratórium területén kell tartani. Azokat a laboratóriumi eszközöket és üvegedényeket, amelyek radioaktív anyaggal szennyeződhetek, különítse el, hogy elkerülje a különböző radioizotóppal történő keresztszennyeződést.

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

A készlet emberi vérből készült reagenseit európai szabványok szerinti és/vagy az FDA által minősített módszerrel HBsAg-tól, valamint anti-HCV, és anti-HIV-1 és 2 ellenanyaguktól mentesnek találták. Azonban egyetlen ma ismert módszer alapján sem állítható biztosan, hogy az emberi vérből készült anyagok nem okozhatnak hepatitist, AIDS-et vagy más fertőző betegséget. Ezért minden ilyen reagenst és minden savó-, illetve plazmamaintárt a fertőző anyagokra vonatkozó helyi biztonsági előírásoknak megfelelően kell kezelni.

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

Vigyázzon, hogy a reagensek bőrre ne kerüljenek (tartósítószer: nátrium-azid). A reagensekben található nátrium-azid robbanásveszélyes fém-azidokat képezhet ólom és réz csővezetékek anyagával. A csővek 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.

További információ: Anyagbiztonsági adatlap (MSDS)

XVII. IRODALOM

- 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, 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 esameetasone 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. AZ ELJÁRÁS ÖSSZEFoglalása

	Totálok µl	Kalibrátorok µl	Minták, kontrollok µl
Kalibrátorok (0-5) Minták, kontrollok Tracer	- - 250	25 - 250	- 25 250
Inkubáció	1 óra szobahőmérsékleten (18-25°C) folyamatos rázatással		
Folyadék eltávolítása Hígított mosóoldat Folyadék eltávolítása	-	Leszívás 2.0 ml Óvatos leszívás	
Mérés	Radioaktivitás mérése 60 másodpercig		

A Diasource műszerező szolgálata megerősíti, hogy a készlet a Stratec Riamat 300 platformon való használatra érvényes. Ha további információra van szüksége, kérjük, vegye fel a kapcsolatot a IVDInstrumentation@diasource.be címen.

DIAsource Androstenedione RIA CT [체외진단의료기기]

1. 제품개요

순번	항 목	내 용
1	품목명	내분비물질검사시약
2	제품명	DIAsource Androstenedione RIA CT
3	허가번호	수인 15-393 호
4	사용목적	사람의 혈청과 혈장내 안드로스테네디온 정량 측정
5	포장단위	96 테스트/키트
6	저장방법	2-8°C, 제조일로부터 70일
7	사용기한	2-8°C, 제조일로부터 70일

2. 측정원리

고정된 양의 ^{125}I 표지 Androstenedione이 polystyrene 시험관 벽에 고착된 고정된 양의 항체 부위에 대해 표준용액 내 혹은 검체 내에 있는 측정될 Androstenedione과 경합반응을 한다. 쉐이커에서 실온에서 1시간 반응 후, 흡입 단계에서 경합 반응은 종결된다. 그런 후, 시험관은 세척액 2ml로 세척되고 다시 흡입되어진다. 표준곡선이 작성되고 검체의 Androstenedione 농도가 표준곡선의 내삽에 의해 결정되어진다.

3. 제공되는 시약

번호	명칭	구성	Colour Code
1	Coated tube	2 X 48	Yellow
2	Tracer ^{125}I labelled Androstenedione	1 vial, 26ml	Red
3	Calibrator 0	1 vial, 동결건조	Yellow
4	Calibrator 1-5	5 vial, 동결건조	Yellow
5	Wash Solution	1 vial, 10ml	Brown
6	Control I, II	2 vial, 동결건조	Silver

4. 측정방법

1) 검체 준비

- (1) 혈청만 사용가능, 2-8°C에 보관한다.
- (2) 측정이 24시간 안에 이루어지지 않는다면 검체는 -20°C에 저장해야 한다.
- (3) 냉동, 해동 반복을 피한다.

2) 시약 조제

- (1) 표준용액 : 0.5ml의 증류수로 재구성한다.
- (2) 정도관리 용액 : 0.5ml의 증류수로 재구성한다.
- (3) 세척액 : 70배로 희석한다. 균질화하기 위해 마그네틱 교반기를 이용한다.

3) 검사 방법 (자동화 장비 : GammaPro)

- (1) 각 재구성 한 표준용액, 정도관리 용액, 트레이서를 pipetting stage에 준비한다.
- (2) 검체를 25ul씩 준비하여 시험관 랙에 준비한다.
- (3) 25ul의 표준용액, 정도관리용액, 트레이서 250ul를 차례대로 니들이 흡입 한 후. 검체가 든 시험관에 분주한다. 준비된 시험관에 차례대로 분주한다.
- (4) 분주가 끝난 시험관은 incubation stage로 옮겨져 1 시간동안 300~700rpm으로 쉐이킹 되면서 반응한다.
- (5) 반응이 끝난 후 rinsing stage로 옮겨져 2ml의 세척액으로 각 시험관이 세척되고 모두 흡입단계까지 이루어진다.

4) 결과판정

(1) 자료정리

- ① 중복 측정값의 평균값을 구한다.
- ② Androstenedione농도에 대한 각각의 표준용액에서 얻어진 cpm으로 표준곡선을 그린다.
- ③ 각 정도관리용액과 검체에 대해서 표준곡선에 삽입함으로써 농도를 판독한다.

(2) 참고치

구분	N	평균값ng/ml	범위
아동			
남성	25	0.4	0.1 – 0.9
여성	64	2.0	0.5 – 4.8
여포기	250	2.1	0.5 – 4.7
배란기	45	1.9	0.9 – 3.0
황체기	14	2.9	1.9 – 4.7
다낭성난소증후군	27	2.0	1.1 – 4.2
폐경기	25	3.6	2.2 – 6.5
폐경기	45	1.7	0.3 – 3.7

5. 완제품 시험규격

1) 외관검사

제조원의 품질관리표준지침서(문서번호 POCQ075)에 따라 시험하고,

확인양식(문서번호 FTPK004)에 기입하고 확인한다.

- (1) 문서번호 ITPKKIP0451에 기입된 대로 구성품이 일치하는지 확인한다
- (2) 제품 구성표의 lot과 키트안의 구성품이 일치하는지 확인
- (3) 구성품과 키트의 유효기간을 확인
- (4) 구성품의 라벨상태를 확인
- (5) 구성품의 포장상태를 확인(용량, 물질 등)
- (6) 서류가 맞게 있는지 확인(사용설명서, 품질서류 등)
- (7) 박스에 라벨이 정확히 부착되어 있는지 확인
- (8) 검사 후 담당자는 확인양식(FTP004)에 기입하고 서명한다.

2) 성능시험 (제조원의 품질관리 표준지침서(문서번호 POCQ006)에 따라 시험한다.

(1) 총 계수는 허용범위(4500~55000 cpm)내에 있어야 한다.

(2) 표준물질 0의 결합율은 허용범위(28.6~42.8 %)¹⁾내에 있어야 한다.

(3) 표준물질 1의 결합율은 허용범위(67.1~83.1 %)¹⁾내에 있어야 한다.

(4) 표준물질 5의 결합율은 허용범위(6.1~9.6 %)¹⁾내에 있어야 한다.

(5) 키트에 정도관리용액에서 얻어진 값이 허용범위내에 있어야 한다.
Control I : 0.42-0.78 ng/ml
Control II : 1.26-2.34 ng/ml

(6) 키트에 표준용액에서 얻어진 값이 허용범위내에 있어야 한다.

Calibrator 1 : 0.08-0.15 ng/ml

Calibrator 2 : 0.21-0.39 ng/ml

Calibrator 3 : 0.70-1.30 ng/ml

Calibrator 4 : 2.10-3.90 ng/ml

Calibrator 5 : 7.00-13.0 ng/ml

비고 : 각 로트의 허용범위는 방사면역측정을 위한 표준지침서(문서번호 CACQKIP0451)에 기록되어 있다.
(허용범위는 평균값의 $\pm 3SD$ 를 기준으로 측정된다.)

6. 사용시 주의사항

1) 체외진단용으로만 사용하여야 하며, 체외진단용 이외 흡입이나 체내 투여 등을 금지한다.

2) 동 제품에 포함된 방사성동위원소 취급 시 다음 사항을 준수하여야 한다.

(1) 방사성동위원소는 지정된 장소에 보관하며, 관련 법령에 따라 자격을 갖춘자가 지정된 장소에서 사용한다.

(2) 방사성동위원소를 취급할 때 안전에 영향을 주는 불필요한 행동을 하지 않는다. (예, 음식 섭취, 흡연, 화장 등)

(3) 방사성동위원소를 포함한 시약을 분주해야 하는 경우, 입으로 파이펜팅 하지 않는다.

(4) 방사성동위원소를 취급할 때에는 장갑 및 실험복을 착용하며, 검사가 완료되면 손을 깨끗이 닦는다.

(5) 유출된 모든 물질은 즉시 닦아 낸 후 폐기 또는 취급에 관련된 소관 법령에 따라 처리하여야 하며, 방사성 물질의 오염이나 방사성 물질 등의 분실은 관련 법령에 정한 규정된 절차에 따라 처리한다.

3) 검사를 실시하기 전에 모든 제품(구성품 포함)은 해당 제품별 검사 온도 조건에 따라 실시한다.

4) 그밖에 방사성동위원소의 보관, 이동, 사용 및 폐기 등 취급에 관한 사항은 관련 법규 또는 규정에 따른다.

5) 본 kit 내의 혈액성분은 시험을 거쳤고, HbsAg, 항HIV 1와 항 HIV 2에 대한 반응은 없었다. 알려져 있는 어떠한 방법으로도 간염, AIDS, 감염성혈액 성분 같은 감염성 물질의 부재를 확신시킬 수 없다 그러므로 시약과 환자 검체의 취급은 병원내의 안전절차에 따라야 한다.

6) 시약이 피부에 접촉되지 않게 하라(요오드화나트륨 방부제). 본 kit 내의 요오드화합물은 배관계통의 납과 구리와 반응하여 큰 폭발성을 가진 요오드화금속으로 변화할 수 있다. 세척 단계에서 요오드화합물의 생성을 막기 위해 흐르는 물로 배수관을 씻어 내도록 한다.

7) 방사성물질의 취득과 저장에 대한 일지는 실험실 내에 보관되어야 한다. 방사성 물질로 오염될 수 있는 서로 다른 방사성물질에 의한 교차 오염을 예방하기 위해 실험실 기구와 유리제품은 서로 분리 되어야 한다.

8) 방사성 물질이 쏟아진 경우에는 방사선안전 절차에 따라 즉시 제염하여야 한다. 방사성 폐기물은 특정 규정과 실험실의 관할권을 가지고 있는 신고당국의 지침에 따라 처리되어야 한다. 방사선안전에 대한 기본 규칙의 준수는 충분한 방호를 제공한다.



CZ

Před použitím pozorně pročtěte celý protokol.

ANDROSTENEDIONE-RIA-CT

I. ÚČEL SOUPRAVY

Testovací souprava pro radioimulonogické kvantitativní in vitro stanovení lidského 4-androsten-3, 17-dionu (androstendion) v séru a plazmě.

II. OBECNÉ ÚDAJE

- A. Název výrobku: DIAsource ANDROSTENEDIONE-RIA-CT Kit
- B. Katalogové číslo: KIP0451 : 96 tests
- C. Výrobce: DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

V případě požadavků na odbornou podporu nebo pro objednání informací se obraťte na:

Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. KLINICKÉ INFORMACE

A. Biologická aktivita

4-androsten-3, 17-dion (androstendion) je C19 steroid. Tvoří se v nadledvinkách a gonádách. Androstendion je bezprostředním prekurzorem jak testosteronu, tak i estronu, které mohou být oba následně přeměněny na estradiol. Vzhledem k přítomnosti 17-oxo skupiny (místo hydroxylové) vykazuje androstendion relativně slabou androgenní aktivitu, odhadovanou na ≤ 20 % aktivity testosteronu. I když jde o slabý androgen, mohou být hladiny androstendionu v séru jak v normálním, tak i v chorobném stavu vyšší než hladiny testosteronu, u žen může být rychlosť sekrece a produkce androstendionu vyšší než rychlosť sekrece a produkce testosteronu, a dochází k významné extra-adrenální konverzi androstendionu na testosteron. Navíc je afinita globulinu vázajícího pohlavní hormony na androstendion mnohem nižší než v případě testosteronu a estradiolu (1-3).

Fyziologická úloha androstendionu není přesně určena. Hladiny androstendionu v séru jsou vysoké v zárodečném stadiu a u novorozenců, během dětí klesají, v pubertě pak opět stoupají. U normálních mužů v pubertě a v dospělosti pochází většina androstendionu z varlat, a to buď přímo, nebo přeměnou testosteronu, zatímco u normálních dospělých žen jsou prakticky stejná množství androstendionu produkována nadledvinkami a vaječníky (2.3). Zvýšené hladiny androstendionu mohou hrát určitou úlohu při vývoji druhotného ochlupení v období adrenarche. Sérové hladiny androstendionu vykazují významné změny během dne, v závislosti na sekreci ACTH. Produkce androstendionu ve vaječnících je stimulována luteinizačním hormonem a sérové hladiny androstendionu se mění v průběhu menstruačního cyklu (3). Jak u mužů, tak i u žen produkce androstendionu v nadledvinkách ve vyšším věku postupně klesá. Navíc po menopauze klesá produkce androstendionu ve vaječnících (3).

B. Klinické aplikace

Měření androstendionu poskytuje užitečný marker biosyntézy androgenů: vysoké hladiny androstendionu byly prokázány v případě virilizující formy vrzené adrenální hyperplazie: navíc mohou mít při sledování léčby této choroby hladiny androstendionu výhody proti hladinám 17-hydroxy-progesteronu při monitorování léčby tohoto stavu, např. méně výrazné kolísání v průběhu dne a nižší suprese po krátkodobém působení glukokortikoidů (4). Hladiny androstendionu v séru jsou zvýšené i při syndromu polycystických vaječníků, stromální hyperthecosis vaječníku, deficienci 3b-hydroxysteroid dehydrogenázy a dalších příčinách hirsutismu u žen (3, 6 a 7). Z povahy věci jsou hladiny androstendionu normální v případě idiopatického hirsutismu. Zvýšené hladiny sérového androstendionu se mohou vyskytovat také v případě virilizujících nádorů nadledvinek a vaječníků (3). V prospektivní studii na více než 1000 mužů byl prokázán vztah mezi hladinou androstendionu a rizikem karcinomu prostaty (5); k potvrzení těchto zjištění budou však nutné další studie.

IV. PRINCIP METODY

Známé množství androstendionu značeného 125I konkuruje s androstendionem obsaženým ve vzorku nebo v kalibračních standardech, jehož množství chceme měřit, o daný počet vazných míst na protílátce fixované na povrchu polystyrenové zkumavky. Po hodinové inkubaci při pokojové teplotě (18-25°C) na vibračním míchadle je reakce ukončena odsátním tekutiny. Poté se zkumavky propláchnou 2 ml pracovní prací roztok a ten je opět odsát. Zpracuje se kalibrační křivka a koncentrace androstendionu ve vzorcích se stanoví interpolací z kalibrační křivky.

V. OBSAH SOUPRAVY

Reagencie	Testovací souprava 96	Barevné označení	Příprava
Zkumavky potažené protílátkou na androstendion	2x48	žlutá	Připraveny k použití
Ag ^{125}I			
RADIOINDIKÁTOR: androstendion značený jódem 125 (kvalita pro HPLC) v tlumivém roztoku s hovězím kaseinem a azidem (<0,1%)	1 lahvička 26 ml 111 kBq	červená	Připraven k použití
CAL 0 Nulový kalibrační standard v lidském séru s thymolem.	1 lahvička lyofilizováno	žlutá	Přidejte 0,5 ml destilované vody
CAL N Kalibrační standardy androstendionu – N = 1-5 (přesné hodnoty viz na štítcích lahviček) v lidském séru s thymolem.	5 lahviček lyofilizováno	žlutá	Přidejte 0,5 ml destilované vody
WASH SOLN CONC Vymývací roztok (TRIS-HCl)	1 lahvička 10 ml	hnědá	Nařeďte destilovanou vodou v poměru 1:70 (použijte magnetické míchadlo)
CONTROL N Kontroly – N = 1 nebo 2 v lidské plazmě s thymolem. (přesné hodnoty viz na štítcích lahviček)	2 lahvičky lyofilizováno	stříbrná	Přidejte 0,5 ml destilované vody

Poznámka : K ředění vzorků použijte nulový standard.

VI. MATERIÁL NEDODÁVANÝ SE SOUPRAVOU

Pro stanovení potřebujete i následující materiál, který se se soupravou nedodává:

- Destilovaná voda
- Pipety na odměření 25 µl, 250 µl, 500 µl a 2 ml (doporučuje se použít přesné pipety se špičkami na jedno použití)
- Vortexové míchadlo
- Magnetické míchadlo
- Vibrační míchadlo se stojanem na zkumavky (400 ot./min).
- Automatická stříkačka 5 ml (typu Cornwall) na vymývání
- Odsávací systém (nepovinný)
- Lze použít jakýkoli gama-čítač schopný měřit 125I (min. účinnost 70%)

VII. REAGENT PREPARATION

- Kalibrační standardy:** Nařeďte kalibrační standardy 0,5 ml destilované vody.
- Kontrolní zkumavky:** Nařeďte kontrolní zkumavky 0,5 ml destilované vody.
- Pracovní prací roztok:** Dostatečné množství pracovní prací roztok připravíte tak, že k 1 objemové jednotce vymývacího roztoku přidáte 69 objemových jednotek destilované vody (1:70). K promíchání použijte magnetické míchadlo. Na konci pracovního dne nepoužijte pracovní prací roztok zlikvidujte.

VIII. SKLADOVÁNÍ A EXSPIRACE REAGENCIÍ

- Před otevřením obalu a případným naředěním jsou všechny složky obsažené v soupravě stabilní do data expirace uvedeného na štítku, za podmínky skladování při teplotě 2-8°C.

- Po naředění jsou kalibrační a kontrolní vzorky při teplotě 2-8°C stabilní po dobu jednoho týdne. V případě delšího skladování je nutno připravit alikvoty a uchovávat je při teplotě -20°C, po dobu max. 3 měsíců. Vyhnete se opakování zmrazování a rozmrázování.
- Čerstvě připravený pracovní prací roztok je třeba použít týž den.
- Radioindikátor je po prvním použití stabilní do data expirace, pokud je uchováván v dobré uzavřeném původním obalu při teplotě 2-8°C.
- Změny vzhledu reagencí v soupravě mohou být příznakem nestability nebo znehodnocení.

IX. ODBĚR A PŘÍPRAVA VZORKŮ

- Vzorky séra nebo plazmatu skladujte při teplotách 2-8°C.
- Nebude-li stanovení provedeno do 24 hodin, doporučuje se připravit alikvoty a skladovat je při teplotě -20°C.
- Vyhnete se opakování zmrazování a rozmrázování.
- Výsledky ze séra i z plazmatu jsou obdobné:

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

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

X. POSTUP STANOVENÍ

A. Poznámky k manipulaci se soupravou

Nepoužívejte reagencie ze soupravy po datu expirace. Nemíchejte ani nezaměňujte komponenty z různých šárží. Před použitím nechte všechny reagencie vytemperovat na pokojovou teplotu (18-25°C).

Všechny reagencie i vzorky před použitím důkladně promíchejte lehkým mícháním nebo otáčivým pohybem nádoby.

Aby nedocházelo k vzájemné kontaminaci, použijte pro přidání každé reagencie i vzorku čistou špičku pipety na jedno použití.

Přesnost zlepší přesné pipety nebo automatické pipetovací zařízení. Dodržujte doby inkubace.

Pro každou várku stanovení zpracujte novou kalibrační křivku, nepoužívejte křivky z předchozích stanovení.

Každá zkumavka může být použita pouze jednou.

B. Postup

- Pro každý kalibrační standard, kontrolní sérum i měřený vzorek si označte dvě potažené zkumavky. Pro stanovení celkového počtu rozpadů si označte 2 normální zkumavky.
- Kalibrační standardy, kontrolní sérum i vzorky krátce promíchejte na vortexovém míchadle a do příslušných označených zkumavek pipetu odměřte po 25 µl každého z nich.
- Do každé zkumavky, včetně nepotažených zkumavek pro měření celkového počtu rozpadů, pipetu odměřte po 250 µl androstendionu označeného 125I.
- Stojan se zkumavkami ručně lehce protřepete, aby se uvolnily všechny zachycené blinky vzdachu.
- Za stálého protřepávání na vibračním míchadle inkubujte po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě (18-25°C).
- Ze všech zkumavek (kromě zkumavek pro celkové měření) odsajte (nebo dekanujte) obsah. Přesvědčte se, že plastová špička odsávačky dosáhla až na dno potažené zkumavky tak, aby odstranila veškerou kapalinu.
- Zkumavky (kromě zkumavek pro celkové měření) vypláchněte 2 ml pracovní prací roztok a odsajte (nebo dekanujte). Při přidávání pracovní prací roztok zabráňte tvorbě pěny.
- Zkumavky nechte ve vzpřímené poloze odstát po dobu dvou minut a poté odsajte zbyvající kapku tekutiny.
- Každou zkumavku změřte v gama-čítači po dobu 60 sekund.

XI. VÝPOČET VÝSLEDKŮ

- Pro každou dvojici zkumavek vypočtěte průměr
- Vypočtěte navázanou radioaktivitu vyjádřenou jako procento vaznosti stanovené pro nulový kalibrační bod (0) s použitím následujícího vzorce:

$$\frac{B}{B(0\%)} = \frac{\text{počet rozpadů (kalibrační standard nebo vzorek)}}{\text{počet rozpadů (nulový standard)}} \times 100$$

- Do vyneste hodnoty B/B(0 %) jako funkci koncentrace androstendionu pro každý kalibrační bod. Zjedně vybočující hodnoty vylučte.
- K vytvoření kalibrační křivky lze použít i počítačové metody. Při použití automatického zpracování výsledků se doporučuje použít křivky logistiké funkce o 4 parametrech.
- Koncentraci androstendionu pro vzorky stanovíte interpolací podle křivky proložené kalibračními body.
- U každého stanovení je nutno ověřit procento celkového množství radioindikátoru navázané bez přítomnosti neoznačeného androstendionu (B0/T).

XII. TYPICKÉ ÚDAJE ZE STANOVENÍ

Následující údaje jsou uvedeny pouze pro ilustraci; nikdy je nepoužívejte místo skutečné kalibrační křivky.

ANDROSTENEDIONE-RIA-CT	cpm	B/Bo (%)
Celkem rozpadů	48670	
Kalibrační standard		
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. VÝKONNOST A OMEZENÍ

A. Detekční limit

Bylo testováno 20 nulových kalibračních standardů společně se sadou dalších standardů. Detekční limit definovaná jako zdánlivá koncentrace o dvojnásobek standardní odchylky nižší než střední hodnota při nulovém navázání byla 0,03 ng/ml.

B. Specificita

Specificita polyklonální protilátky použité v tomto testu byla hodnocena pomocí RIA jako poměr mezi množstvím androstendionu, které vyvolá 50% inhibici vaznosti značeného androstendionu, a množstvím látek vyvolávajících zkřížené reakce (analogů), které vede ke stejné inhibici.

Látka	Zkřížená reaktivita (%)
Androsteron	0,0566
Kortizol	0,0148
Kortikosteron	0,0047
Kortizon	0,0099
DHEA	0,0155
DHEA-SO4	0,0009
21-deoxy-kortizon	0,0006
17 β -Estradiol	ND
Estriol	ND
Estron	0,0270
Etiocolanolon	0,0422
17 α -hydroxypregnanolon	ND
17 β -hydroxyprogesteron	0,0840
Isoandrosteron	0,0112
Pregnenolon	ND
Progesteron	0,0168
Spironolakton	0,0006
5 α -dihydrotestosteron	0,0105
Testosteron	0,2406

Poznámka : Tato tabulka udává zkříženou reaktivitu protilátky proti androstendionu.

ND : nejistitelný

C. Přesnost

INTRA-ASSAY

INTER-ASSAY

Sérum	N	$<X> \pm SD$ (ng/ml)	CV (%)	Sérum	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: standardní odchylka CV: variační koeficient

D. Správnost

TEST ŘEDĚNÍ

Vzorek	Ředění	Teoretická koncentrace (ng/ml)	Naměřená koncentrace (ng/ml)
Sérum 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
Sérum 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

Vzorky byly ředěny nulovým kalibračním standardem.

ZKOUŠKA VÝTĚŽNOSTI

Vzorek	added Androstenedion e (ng/ml)	Androstenedion e se vzpamatoval (ng/ml)	Výtěžnost (%)
Sérum	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

Nakolik je nám známo, pro tento parametr neexistuje mezinárodní referenční materiál.

E. Časový odstup mezi nalitím posledního kalibračního standardu a vzorku

Jak ukazuje následující tabulka, výsledky stanovení jsou správné i v případě, že je vzorek přidán do zkumavky 24 minut poté, co byl do potažených zkumavek vložen poslední standard.

TIME DELAY

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

XIV. INTERNÍ KONTROLA KVALITY

- Nejsou-li výsledky dosažené pro kontrolní sérum 1 a kontrolní sérum 2 v rozsahu stanoveném na štítku lahvičky, nelze výsledky použít, pokud nebylo pro tento nesoulad nalezeno vyhovující vysvětlení.
- Každá laboratoř si může případně vytvořit vlastní soubor kontrolních vzorků, které je nutno uchovávat zmrazené v alikvotech.
- Kritéria přijatelnosti pokud jde o rozdíl mezi výsledky obou stanovení pro stejný vzorek se řídí správnou laboratorní praxí.

XV. REFERENČNÍ INTERVALY

Tyto hodnoty jsou uvedeny pouze jako orientační: každá laboratoř si musí stanovit vlastní normální rozsah hodnot.

Rozsahy jsou vyjádřeny jako percentily 2,5% - 97,5%.

Subjekty	N	Střední hodnota ng/ml	Rozsah
DĚTI	25	0,4	0,1 – 0,9
MUŽI	64	2,0	0,5 – 4,8
ŽENY	250	2,1	0,5 – 4,7
Folikulární fáze	45	1,9	0,9 – 3,0
Vrchol ovulace	14	2,9	1,9 – 4,7
Luteální fáze	27	2,0	1,1 – 4,2
Syndrom polycystických vaječníků	25	3,6	2,2 – 6,5
Po menopauze	45	1,7	0,3 – 3,7

XVI. UPOZORNĚNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

Bezpečnost

Výrobek je určen výhradně k použití pro diagnostické účely in vitro. Souprava obsahuje ^{125}I (poločas rozpadu: 60 dnů), který emiteme ionizující záření X (28 keV) a γ (35,5 keV).

Tento radioaktivní přípravek může být předáván pouze oprávněným osobám a jimi používán; nákup, skladování, používání a předávání radioaktivních látek podléhají legislativě platné ve státě konečného uživatele. Tento přípravek nesmí být v žádném případě podán lidem ani zvířatům.

Veškerou manipulaci s radioaktivními látkami provádějte v určeném prostoru, kudy běžně neprocházejí osoby. V laboratoři musí být veden deník o příjmu a skladování radioaktivního materiálu. Laboratorní zařízení a sklo, které by mohlo být kontaminováno radioaktivními látkami, je nutno uchovávat odděleně, aby nedocházelo ke zkřížené kontaminaci různých radioizotopů.

V případě rozlití radioaktivní látky je nutno rozlitou látku okamžitě odstranit v souladu s bezpečnostními postupy pro manipulaci s radioaktivními látkami. Radioaktivní odpad musí být likvidován při dodržení místních předpisů a pokynů orgánů příslušných pro každou laboratoř. Dodržování základních pravidel radiační bezpečnosti poskytuje dostatečnou ochranu.

Krevní deriváty lidského původu použité v soupravě byly testovány s použitím metod schválených v Evropě a/nebo schválených americkou FDA a měly negativní test na přítomnost protilaterk proti HBsAg, HCV a HIV-1 a 2. Žádná známá metoda plně nezaručí, že krevní deriváty lidského původu nepřenáší hepatitidu, AIDS nebo jiné infekční choroby. Proto je s reagenciemi, vzorky séra nebo plazmatu nutno nakládat v souladu s místními bezpečnostními postupy.

Veškeré produkty a deriváty zvířecího původu byly získány od zdravých zvířat. Komponenty získané od skotu pocházejí ze státu, kde nebyla zjištěna BSE. S komponenty obsahujícími látky zvířecího původu je proto nutno manipulovat jako s potenciálně infekčním materiálem.

Zabraňte zasažení pokožky reagenciemi (jako konzervační látka je použit azid sodný). Azid v soupravě může reagovat s olovem a mědi v kanalizačních rozvodech a vytvářet tak výsoce výbušné azidy kovů. Při mytí vypláchněte odpad velkým množstvím vody, aby nedocházelo k hromadění azidů.

Na pracovišti nekuřte, nejezte, nepijte ani neaplíkujte kosmetické přípravky. K pipetování nepoužívejte ústa. Používejte ochranný oděv a rukavice na jedno použití.

Další informace naleznete v bezpečnostním listu (MSDS).

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. 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 esameetasone 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. SHRNUTÍ PROTOKOLU

	Celkové měření μl	Kalibrační standardy μl	Vzorky, kontrolní vzorky μl
Kalibrační standardy (0-5)	-	25	-
Vzorky, kontrolní vzorky	-	-	25
Radioindikátor	250	250	250
Inkubace	1 hodina, protřepávání při pokojové teplotě (18-25°C)		
Separace	-	odsát 2,0 ml	pečlivě odsát
Pracovní prací roztok			
Separace			
Měření	Změřit zkumavky na čítači po dobu 60 sekund		

Diasource's Instrumentation Service potvrzuje, že sada je platná pro použití na platformě Stratec Riamat 300. Pokud potřebujete další informace, kontaktujte IVDInstrumentation@diasource.be

Pred použitím si prečítajte celý protokol.

ANDROSTENEDIONE-RIA-CT

I. ZAMÝŠLANÉ POUŽITIE

Rádioimunoanalýza pre kvantitatívne zmeranie *in vitro* humánneho 4-androstenónu-3, 17-dión (androstendión) v sére a plazme.

II. VŠEOBECNÉ INFORMÁCIE

A. Obchodný názov: DIAsource ANDROSTENEDIONE-RIA-CT Kit

B. Katalógové číslo: KIP0451: 96 testov

C. Výrobca: DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgicko.

V prípade potreby technickej pomoci alebo informácií pre objednávku sa obráťte na:

Tel.: +32 (0)10 84.99.11

Fax: +32 (0)10 84.99.91

III. KLINICKÉ POZADIE

A. Biologická činnosť

4-Androsten-3, 17-dión (Androstendión) je C19 steroid. Produkujie sa v nadobličkách a pohlavných žľazách. Androstendión je bezprostredným prekurzorom testosterónu a estrónu, pričom oba sa môžu následne zmeniť na estradiol. Z dôvodu prítomnosti 17-oxo (namiesto hydroxylu) skupiny, androstendión má relatívne slabé androgénne pôsobenie, odhadované na ≤ 20 % testosterónu. Hoci ide o slabý androgén, hladiny séra androstendiónu môžu prekročiť testosterón v normálnom ako aj chorobnom stave, vylučovanie androstendiónu a produktivita prekračujú úroveň testosterónu u žien a dochádza k významnej konverzii androstendiónu na testosterón mimo nadobličiek. Okrem toho je náklonnosť globulínu viažuceho pohlavný hormón k androstendiónu oveľa menšia k testosterónu alebo estradiolu (1 – 3).

Fyziologická úloha androstendiónu nie je dobre zadefinovaná. Hladiny séra androstendiónu sú vysoké vo fetálnom a neonatálnom sére, klesajú počas detstva a zvyšujú sa v puberte. U normálnych pubertálnych a dospelých mužov pochádza najväčší podiel androstendiónu zo semenníkov, a to buď priamo alebo z premeny testosterónu, pričom u normálnych dospelých žien sa v podstate rovnaké množstvo androstendiónu tvorí v nadobličkách a vaječníkoch (2,3). Zvýšené hodnoty androstendiónu môžu zohrávať vo vývoji sekundárneho pohlavného ochlpenia počas predčasnej puberty. Hladiny séra androstendiónu vykazujú významné denné kolísanie závislé od vylučovania ACTH. Tvorbu androstendiónu vo vaječníkoch stimuluje luteinizačný hormón a hladiny séra androstenedionu kolísajú podľa menštruačného cyklu (3). Tvorba androstendiónu v nadobličkách vekom postupne klesá u mužov, ako aj u žien. Okrem toho tvorba androstendiónu vo vaječníkoch klesá po menopauze (3).

B. Klinické aplikácie

Meranie androstendiónu je užitočným ukazovateľom biosyntézy androgénu: Zvýšené hladiny androstendiónu sa prejavujú v kongenitálnej adrenálnej hyperplázii s virilizáciou; navyše hladiny androstendiónu môžu prevládať nad hladinami 17-hydroxy-progesterónu v monitorovaní liečby tohto ochorenia, napr. menej výrazné denné kolísanie a menšia supresia po krátkom vystavení glukokortikoidom (4). Hladiny séra androstendiónu sú zvýšené aj v prípade syndrómu polycystických vaječníkov, stromálnej hypertekózy vaječníkov, nedostatočnosti 3b-hydroxysteroid dehydrogenázy a iných príčin zvýšeného ochlpenia u žien (3,6 & 7). Z definície vyplýva, že hladiny androstendiónu sú normálne pri idiopatickej zvýšenom ochlpení. Zvýšené hladiny séra androstendiónu sa môžu zároveň vyskytovať vo virilizujúcich nádoroch nadobličiek a vaječníkov (3). V rámci výhľadovej štúdie u vyše 1 000 mužov sa preukázalo riziko rakoviny prostaty vyplývajúce zo vzťahu dávky a účinku androstendiónu (5); na potvrdenie týchto výsledkov budú potrebné ďalšie štúdie.

IV. PRINCÍP METÓDY

Stanovené množstvo androstendiónu s označením ^{125}I konkuruje androstendiónu, ktorého prítomnosť sa má merať vo vzorke alebo v kalibrátore pre stanovené množstvo protílátok imobilizovaných na stenu polystyrenej skúmavky. Po 1 hodine inkubácie pri izbovej teplote ($18 - 25^\circ\text{C}$) na trepačke sa konkurenčná reakcia ukončí aspiráciou. Skúmavky sa potom premýjú 2 ml pracovným premývacím roztokom a odsajú. Zostrojí sa kalibračná krivka a stanovia sa koncentrácie androstendiónu vo vzorkách interpoláciou dávky z kalibračnej krivky.

V. DODÁVANÉ ČINIDLÁ

Činidlá	Sada 96 testov	Farba Kód	Obnova
Skúmavky potiahnuté androstenediónom	2 x 48	žltá	Pripravené na použitie
Ag ^{125}I	1 ampulka 26 ml 111 kBq	červená	Pripravené na použitie
STOPOVACIA LÁTKA: Androstendión s označením jódumu- 125 (stupeň HPLC) v pufri s kravským kazefinom a azidom (< 0,1 %)			
CAL 0	1 ampulka lyofilizovaná	žltá	Pridajte 0,5 ml destilovanej vody
Nulovací kalibrátor v humánnom sére a tymole.			
CAL N	5 ampuliek lyofilizovaná	žltá	Pridajte 0,5 ml destilovanej vody
Kalibrátor androstendión - N = 1 až 5 (pozri presné hodnoty na štítkoch ampuliek) v humánnom sére a tymole.			
WASH SOLN CONC	1 ampulka 10 ml	hnedá	Rozriedzte 70 x destilovanou vodou (použitie magnetického miešadla).
Premývací roztok (TRIS-HCl)			
CONTROL N	2 ampulky lyofilizovaná	strieborná	Pridajte 0,5 ml destilovanej vody
Kontrolné séra - N = 1 alebo 2 v humánnej plazme a tymole. (pozri presné hodnoty na štítkoch ampuliek)			

Pozn.: Na riedenie vzoriek použite nulovací kalibrátor.

VI. NEDODÁVANÝ MATERIÁL

Tento materiál je potrebný, avšak nedodáva sa so sadou:

- Destilovaná voda
- Pipety na dávkovanie: 25 μl , 250 μl , 500 μl a 2 ml (odporúča sa používať presné pipety s jednorázovými plastovými špičkami)
- Odstredívka
- Magnetické miešadlo
- Skúmavková trepačka (400 rpm)
- 5 ml automatická striekačka (typu Cornwall) na premývanie
- Odsávací systém (voliteľné)
- Môže sa použiť akýkolvek merač žiarenia gama schopný merať ^{125}I (minimálny výnos 70 %).

VII. PRÍPRAVA ČINIDLA

- Kalibrátory:** Rozpustite kalibrátory s 0,5 ml destilovanej vody
- Kontrolné séra:** Rozpustite kontrolné séra s 0,5 ml destilovanej vody.
- Pracovný premývací roztok:** Pripravte primerané množstvo pracovného premývacacieho roztoku pridaním 69 dielov destilovanej vody do 1 dielu premývacacieho roztoku (70 x). Na premiešanie použite magnetické miešadlo. Na záver dňa nepoužívať pracovný premývací roztok zlikvidujte.

VIII. SKLADOVANIE A DÁTUM EXSPIRÁCIE ČINIDIEL

- Pred otvorením alebo obnovou sú všetky komponenty sady stabilné až do dátumu exspirácie uvedeného na štítku pod podmienkou uskladnenia pri teplote 2 až 8°C .
- Po rozpustení budú kalibrátory a kontrolné séra stabilné ešte týždeň pri teplote 2 až 8°C . V prípade dlhodobejšieho skladovania by sa mali urobiť alikvotné podielne a uchovávať pri teplote -20°C najviac počas 3 mesiacov. Vyhýbajte sa opakovaniu zmrazovania a rozmrázovania.
- Čerstvo pripravený pracovný premývací roztok by sa mal spotrebovať v ten istý deň.
- Po prvom použití zostane stopovacia látka stabilná až do dátumu exspirácie, ak sa uskladní v pôvodnej dobre uzavretej ampulke pri teplote 2 až 8°C .
- Zmeny vo fyzickom vzhľade činidiel zo sady môžu poukazovať na nestabilitu alebo skazenie.

IX. ODBER VZORIEK A PRÍPRAVA

- Sérové alebo plazmové vzorky sa musia uskladňovať pri teplote 2-8 $^\circ\text{C}$.
- Ak sa skúška nevykoná do 24 hodín, odporúča sa uskladnenie alikvotných podielov pri teplote -20°C .
- Vyhýbajte sa opakovaniu zmrazovania a rozmrázovania.
- Sérum a plazma poskytujú podobné výsledky:

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

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

X. POSTUP

A. Poznámky k spracovaniu

Sadu ani jej časti po uplynutí dátumu exspirácie nepoužívajte. Nemiešajte materiál z rôznych šarží sád. Pred použitím zahrejte všetky činidlá na izbovú teplotu ($18 - 25^\circ\text{C}$).

Všetky činidlá a vzorky riadne zamiešajte jemným potrepaním alebo krúžením.

Na pridávanie každého činidla a vzorky používajte čistú jednorázovú pipetu špičku, aby sa zabránilo krízovej kontaminácii.

Vysoko presné pipety alebo automatizované vybavenie zvýši presnosť. Dodržiavajte časy inkubácie.

Pre každý pokus pripravte kalibračná krivku, nepoužívajte údaje z predchádzajúcich pokusov.

Každá skúmavka sa môže použiť len raz.

B. Postup

- Označte potretné skúmavky dvojmo pre každý kalibrátor, kontrolné sérum a vzorku. Na stanovenie celkového množstva označte 2 normálne skúmavky.
- Krátko odstredte kalibrátory, kontrolné séra a vzorky a nadávkujte 25 μl z každého do príslušných skúmaviek.
- Do každej skúmavky nadávkujte 250 μl androstendiónu s označením ^{125}I vrátane neznačených skúmaviek pre celkové množstvo.
- Rukou jemne potraste stojan so skúmavkami s cieľom uvoľniť prípadný vzduch zachytený do bubliniek.
- Nechajte inkubovať počas 1 hodiny pri izbovej teplote ($18 - 25^\circ\text{C}$) za stáleho pretrepávania.
- Odsajte (alebo dekantujte) obsah z jednotlivých skúmaviek (okrem celkového množstva). Dbajte, aby sa špička odsávačky dostala až na dno potrenej skúmavky s cieľom odsať všetku kvapalinu.
- Premyte skúmavky 2 ml pracovného premývacacieho roztoku (okrem celkového množstva) a odsajte (alebo dekantujte). Počas pridávania pracovného premývacacieho roztoku sa vydýhajte peneniu.
- Skúmavky nechajte stáť zvislo počas dvoch minút a odsajte zostávajúcu kvapku kvapaliny.
- Skúmavky zmerajte v merači žiarenia gama počas 60 sekúnd.

XI. VÝPOČET VÝSLEDKOV

- Vypočítajte priemer duplikátnych stanovení.
- Vypočítajte viazanú rádioaktivitu ako percentuálny podiel väzby stanovenej pri nulovacom bode kalibrátora (0) podľa tohto vzorca:

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

- Zostavte graf (B/B0(%)) hodnôt pre každý bod kalibrátora ako funkciu koncentrácie androstendiónu každého bodu kalibrátora. Vylúčte zjavné anomálie.

- Počítacom podporované metódy sa môžu zároveň použiť na zostavenie kalibračnej krivky. V prípade využitia automatického spracovania výsledku sa odporúča zstrojenie krivky 4 parametrovej logistickej funkcie.
- Interpoláciou hodnôt vzorky (B/B₀ (%)) stanovte koncentrácie androstendiónu vzoriek z kalibračnej krivky.
- Pri každom rozbore sa musí skontrolovať percentuálny podiel stopovacej látky viazanej v absencii neoznačeného androstendiónu (B₀/T).

XII. TYPICKÉ ÚDAJE

Nasledujúce údaje slúžia len na ilustráciu a nesmú sa nikdy použiť namiesto kalibračnej krivky v reálnom čase.

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

XIII. VÝKONNOSŤ A OBMEDZENIA

A. Detekčný limit

Súbežne so sadou iných kalibrátorov sa vykonal rozbor dvadsiatich nulovacích kalibrátorov.

Detekčný limit, definovaný ako zjavná koncentrácia dve štandardné odchýlky pod priemerným množstvom pri nulovej väzbe, bol 0,03 ng/ml.

B. Špecifickosť

Špecifickosť polyklonálnych protilátok používaných v tomto rozbore bola vyhodnotená v rámci RIA ako pomer množstva androstendiónu, ktorý dosahuje 50 % inhibície väzby označeného androstendiónu, a množstva zlúčenín s križovou reaktivitou (analógy) s rovnakou inhibíciou.

Zlúčenina	Križová reaktivita (%)
Androsterón	0,0566
Kortizol	0,0148
Kortikosterón	0,0047
Kortizon	0,0099
DHEA	0,0155
DHEA-SO ₄	0,0009
21-Deoxykortizón	0,0006
Estradiol-17 β	ND
Estriol	ND
Estrón	0,0270
Etiocholanolón	0,0422
17 α -hydroxypregnenolón	ND
17 α -Hydroxyprogesterón	0,0840
Izoandrosterón	0,0112
Pregnenolón	ND
Progesterón	0,0168
Spiromolaktón	0,0006
5 α -Dihydrotestosterón	0,0105
Testosterón	0,2406

Pozn.: V tejto tabuľke sa uvádzajú križová reaktivita pre anti androstendión.

ND: nedetektovateľné

C. Presnosť

PRESNOSŤ V RÁMCI ROZBORU PRESNOSŤ MEDZI ROZBORMI

Sérum	N	$<X> \pm SD$ (ng/ml)	CV (%)	Sérum	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: štandardná odchýlka; CV: variačný koeficient

D. Správnosť

SKÚŠKA RIEDENIA

Vzorka	Riedenie	Teoretická koncent. (ng/ml)	Meraná koncent. (ng/ml)
Sérum 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
Sérum 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

Vzorky boli zriedené s nulovacím kalibrátorom.

REGENERAČNÝ TEST

Vzorka	priádny androstendión (ng/ml)	Zregenerovaný Androstendión (ng/ml)	Zregenerovaný (%)
Sérum	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

Pokiaľ je nám známe, pre tento parameter neexistuje žiadny medzinárodný referenčný materiál.

E. Oneskorenie medzi posledným kalibrátorom a dávkovaním vzorky

Ako sa ďalej uvádzajú, výsledky rozboru zostávajú správne aj po nadávkovaní vzorky 24 minút po pridaní kalibrátora do potretych skúmaviek.

ONESKORENIE

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

XIV. INTERNÁ KONTROLA KVALITY

- Ak výsledky získané pre kontrolné sérum 1 a/alebo kontrolné sérum 2 nie sú v rozsahu stanovenom na štítku ampulky, nesmú sa použiť, ak sa neuvedie uspokojivé vysvetlenie takejto nezrovnalosti.
- Ak je to vhodné, každé laboratórium môže vytvoriť svoju vlastné skupiny kontrolných sér, ktoré by sa mali udržiavať zmrazené v alikvotných podieloch.
- Kritériá prípustnosti pre rozdiel medzi duplicitnými výsledkami vzoriek musia vychádzať zo správnej laboratórnej praxe.

XV. REFERENČNÉ INTERVALY

Tieto hodnoty sa uvádzajú len orientačne; každé laboratórium by malo zostaviť svoj vlastný normálny rozsah hodnôt.

Rozsahy sú vyjadrené ako 2,5 % až 97,5 % percentilu.

subjekty	N	Priemer ng/ml	Rozsah
DETÍ	25	0,4	0,1 – 0,9
MUŽI	64	2,0	0,5 – 4,8
ŽENY	250	2,1	0,5 – 4,7
Folikulárna fáza	45	1,9	0,9 – 3,0
Vrchol ovulácie	14	2,9	1,9 – 4,7
Luteálna fáza	27	2,0	1,1 – 4,2
Syndróm polycystických vaječníkov	25	3,6	2,2 – 6,5
Po menopauze	45	1,7	0,3 – 3,7

XVI. OPATRENIA A UPOZORNENIA

Bezpečnosť

Len na diagnostické účely *in vitro*.

Táto sada obsahuje ^{125}I (polčas rozpadu: 60 dní), emitujúce ionizujúce X (28 keV) a γ (35,5 keV) žiarenia.

Tento rádioaktívny produkt sa môže odovzdať len oprávneným osobám, ktoré ho môžu používať; nákup, skladovanie, používanie a výmenu rádioaktívnych produktov upravujú právne predpisy krajinu koncového používateľa. Produkt sa v žiadnom prípade nesmie podávať ľuďom ani zvieratám.

Akákoľvek manipulácia s rádioaktívnymi látkami sa musí vykonávať v určených priestoroch, mimo bežne vykonávanej práce. V laboratóriu musí byť kniha záznamov o prijatí a skladovaní rádioaktívnych materiálov. Laboratórne vybavenie a sklo, ktoré by sa mohli kontaminovať rádioaktívnymi látkami, musia byť oddelené, aby nedošlo ku krízovej kontaminácii rôznymi rádioizotopmi.

Prípadné rádioaktívne úniky sa musia ihneď vyčistiť v súlade s postupmi pre radiačnú bezpečnosť. Rádioaktívny odpad sa musí zlikvidovať v súlade s miestnymi predpismi orgánov príslušných pre dané laboratórium. Dodržiavanie základných pravidiel pre radiačnú bezpečnosť poskytuje primeranú ochranu.

Zložky ľudskej krvi v tejto sade boli odsúšané európskymi a/alebo FDA schválenými metódami a sú negatívne na HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 a 2. Žiadna známa metóda nie je schopná zabezpečiť úplnú istotu, že v derivátoch ľudskej krvi sa nepreniesie hepatitída, AIDS alebo iné infekcie. Z toho dôvodu musí byť manipulácia s činidlami, vzorkami séra alebo plazmy v súlade s miestnymi bezpečnostnými postupmi.

Všetky zvieracie produkty a deriváty boli zozbierané zo zdravých zvierat. Zložky z hovädzieho dobytku pochádzajú z krajín bez hláseného výskytu BSE. Napriek tomu sa so zložkami obsahujúcimi zvieracie látky sa musí zaobchádzať ako s potenciálne infekčnými.

Predchádzajte akémukoľvek kontaktu s činidlami (azid sodný ako konzervačná látka). Azid v tejto sade môže reagovať s olovom a meďou v potrubí a môže tak vytvárať vysoko výbušné kovové azidy. Počas premývania prepláchnite odtok veľkým množstvom vody s cieľom zabrániť hromadeniu azidu.

V pracovných priestoroch nefajčte, nepite, nejedzte a nepoužívajte kozmetiku. Nepipetujte ústami. Používajte ochranné odevy a jednorazové rukavice.

Viac informácií nájdete v karte bezpečnostných údajov o materiáli (MSDS).

XVII. LITERATÚRA

- 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

5. Barrett-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.

6. Rittmaster RS, Thompson DL : **Effects of leuprolide and esameetasone 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. ZHRNUTIE PROTOKOLU

CELKOVÉ MNOŽSTVO μl	KALIBRÁTORY μl	VZORKA(Y) KONTROL NÉ SÉRA μl
Kalibrátory (0-5) Vzorky, kontrolné séra Stopovacia látka	- - 250	25 - 250
Inkubácia	1 hodinu pri izbovej teplote (18 – 25 °C) za stáleho pretepovania	
Separácia Pracovný premývací roztok Separácia	-	Odsávanie 2,0 ml Odsávajte obozretne
Meranie	Skúmavky merajte počas 60 sekúnd	

Oddelenie pre prístroje a zariadenia spoločnosti Diasource potvrzuje, že sada sa môže používať na platформe Stratec Riamat 300. V prípade potreby dodatočných informácií sa obráťte na IVDInstrumentation@diasource.be

Ďalšie preklady tohto návodu na použitie sú k dispozícii na stiahnutie na našej webovej stránke: <https://www.diasource-diagnostics.com/>