



IVD

CE

DHT-RIA

KIPI9900

Version : 230123

Date of issue : 23/01/2023

Revision date: 23/01/2023

History

Summary of change:

Current Version: 230123
New logo

Read entire protocol before use.

DHT-RIA

I. INTENDED USE

Radioimmunoassay for the *in vitro* quantitative measurement of human 5- α -Dihydrotestosterone (DHT) in serum and plasma.

II. GENERAL INFORMATION

- A. **Proprietary name :** DIAsource DHT-RIA - Kit
- B. **Catalog number :** KIP19900 : 100 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 activities of 5 α -Dihydrotestosterone*

5 α -Dihydrotestosterone (DHT; 17 β -Hydroxy-5 α -androstane-3-one), the most potent naturally-occurring androgen, is produced from testosterone through the action of cholesterol 5 α -reductase [1]. The concentrations of 5 α -reductase are highest in certain peripheral tissues, including genital skin and hair follicles, and is localized intracellularly in apparent association with the nuclear membrane. DHT exerts its biological action by intracellular binding to the androgen receptor; this complex is then transferred to the nucleus where DNA-binding occurs with resultant effects on DNA transcription [2]. Most of the residual DHT undergoes intracellular metabolism to 3 α -androstane-20-one and 3 α -androstane-20-one glucuronide. Only a small proportion of DHT escapes into the peripheral circulation, where it is present primarily complexed to sex-hormone binding globulin [3].

B. *Clinical applications of 5 α -Dihydrotestosterone level measurement*

Testosterone causes virilization of the Wolffian ducts during fetal life, while DHT is responsible for the development of the male external genitalia and prostate, and is primarily responsible for the physical changes which occur during male sexual maturation. An autosomal-recessive genetic deficiency of 5 α -reductase, sometimes called male pseudohermaphroditism or pseudovaginal perineoscrotal hypospadias, leads to inadequate differentiation of DHT-dependent peripheral tissues. Male infants with this disorder have ambiguous genitalia and are often raised as females, although significant virilization may occur later in life presumably due to the natural increase in testosterone levels [2].

Measurement of DHT concentrations can be complicated by antibody cross-reactivity to testosterone. The DHT Double Antibody radioimmunoassay utilizes a sample oxidation / extraction procedure to remove most of the testosterone, coupled with a specific immunoassay for DHT.

IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

The procedure follows the basic principle of radioimmunoassay where there is competition between the radioactive and non-radioactive antigen for a fixed number of antibody binding sites. The amount of (I-125)-labeled analyte bound to the antibody is inversely proportional to the concentration of unlabeled analyte present. The separation of free and bound antigen is achieved by using a double antibody system.

V. REAGENTS PROVIDED

Reagents	100 Tests	Colour code	Reconstitution
ANTISERUM Lyophilized anti-DHT rabbit serum with sodium azide (< 0.1%)	1 vial Lyophilized	Blue	Reconstitute with 10.2 ml of buffer
Ag 125I TRACER: 125I labelled DHT in a protein based buffer with sodium azide (<0.1%)	1 vial 10.5 ml 185 kBq	Red	Ready to use
PEG Sheep anti-rabbit gamma globulin in a buffer containing polyethylene glycol and sodium azide (< 0.1%)	1 vial 105 ml	Green	Ready to use Mix well, with the use of a magnetic stirrer before use
KMnO4 Potassium permanganate solution	1 vial 50 ml	Black	Ready to use
RTIF Buffer : phosphate buffered saline 0.1M with sodium azide (< 0.1%)	1 vial 100 ml	Black	Ready to use
CAL Calibrator : ethanolic stock solution, containing 100 ng/ml DHT.	1 vial	Yellow	Preparation of the standard curve : refer to VII B.
CONTROL N Controls : DHT in a buffer containing sodium azide (< 0.1%)	2 vials Lyophilized	Silver	Reconstitute with 2 ml Water. Exact concentrations are indicated on the labels

VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

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

1. Distilled water
2. Pipettes for delivery of: 100 µl, 200 µl, 500 µl and 1 ml (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
3. Vortex mixer
4. Magnetic stirrer
5. Water bath at 37°C
6. 12 x 75 mm glass tubes.
7. Aspiration system (optional)
8. Refrigerated centrifuge capable of 1800 g.
9. Hexane HPLC grade
10. Ethanol HPLC grade
11. Any gamma counter capable of measuring 125I may be used (minimal yield 70%).

VII. REAGENT PREPARATION

A. Controls : Reconstitute the controls with 2 ml distilled water. Allow 15 minutes to reconstitute; mix gently to avoid foaming. **Controls don't need to be extracted or oxidized.**

B. Standard curve preparation :

Prepare the following dilutions to obtain the curve:

Calibrator	Conc (pg/ml)	Calibrator (ml)	Buffer (ml)
C7	2500	Stock cal: 0.1	3.9
C6	1000	Stock cal: 0.1	9.9
C5	500	C6: 1.0	1.0
C4	200	C6: 0.2	0.8
C3	100	C6: 0.1	0.9
C2	50	C6: 0.1	1.9
C1	25	C2: 0.5	0.5

Buffer serves as "0" calibrator. Store the calibrators at 2-8°C for up to 12 weeks.

C. Antiserum: reconstitute the vial with 10.2 ml of buffer.

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, controls are stable for 12 weeks at 2 to 8°C. For longer storage periods, aliquots should be made and kept at -20°C for 3 months.
- Freshly prepared calibrators are stable for up to 12 weeks at 2-8°C.
- After its first use, tracer is stable until expiry date, if kept in the original well-closed vial at 2 to 8°C.
- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration.

IX. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- Serum or plasma samples must be kept at 2-8°C.
- If the test is not run within 48 hrs., storage at -20°C is recommended.
- Avoid successive freezing and thawing.

X. PROCEDURE

A. Handling notes

Do not use the kit or components beyond expiry date.
Do not mix materials from different kit lots.
Bring all the reagents to room temperature prior to use.
Thoroughly mix all reagents and samples by gentle agitation or swirling.
The PEG reagent must be mixed at room temperature with the use of a magnetic stirrer at least 10 minutes before use.
Use a clean disposable pipette tip for addition of each different reagent and sample in order to avoid cross-contamination. High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision.
Respect the incubation times.
Prepare a calibration curve for each run, do not use data from previous runs.

B. Extraction of the samples:

Do not apply this procedure to calibrators or controls !

1. Take **300 µl** (duplicate measurement) of serum or plasma in **glass** tubes.
2. Add **600 µl** of KMnO4.
3. Vortex about **2 x 10 seconds**.
4. Incubate for **15 minutes** at room temperature (18-25°C).
5. Add **3 ml** of a mixture of Hexane / Ethanol (98:2 vol/vol).
6. Cap the tubes and shake thoroughly **3 x 30 seconds (do not use a vortex!)**.
7. Centrifuge at **1800 g for 5 minutes** at room temperature.
8. For each sample, prepare and identify 2 glass tubes.
9. Transfer **1 ml** of the upper organic layer into **each duplicate tube** and evaporate to dryness, preferentially under a stream of air or nitrogen..
10. Add **200 µl** of buffer into each tube. Vortex **30 seconds**. Incubate for **20 minutes** at room temperature. Vortex again for **30 seconds**.
11. The samples are now ready for the RIA determination.

C. RIA test

1. Prepare and identify tubes (in duplicate) for: Total counts, non-specific binding (NSB), calibrators and controls. Use the same model of tubes than those containing the extracted samples (X.B.8.)
2. Add **100 µl** of each calibrator (including 100 µl of buffer as calibrator 0) and **100 µl** of each control into their respective tubes.
3. Add **100 µl** of buffer into each calibrator or control tube. (Add 300 µl of buffer into NSB tubes)
4. Add **100 µl** of antiserum to each tube (calibrators, controls, samples). Do not add antiserum in Total counts and NSB tubes.
5. Add **100 µl** of 125I Tracer to all tubes.
6. Mix well, cover with a film and incubate for **30 minutes at 37°C** in a water bath.
7. Add **1 ml** PEG reagent to all tubes except Total counts. **The PEG reagent must be mixed thoroughly before use with a magnetic stirrer.**
8. Incubate at room temperature for 20 minutes.
9. Centrifuge at **1800 g, at 4-12°C, for at least 20 minutes.**
10. Aspirate or decant the supernatant by inverting the tubes. Blot the tubes to remove any remaining liquid.
11. Count the tubes for one minute in a gamma counter.

XI. CALCULATION OF RESULTS

1. Calculate the mean cpm 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 :

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

3. Using a 3 cycle semi-logarithmic or logit-log graph paper, plot the (B/B₀(%)) values for each calibrator point as a function of the DHT 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 DHT concentrations of the samples from the reference curve.
6. For each assay, the percentage of total tracer bound in the absence of unlabelled DHT (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.

DHT-RIA	cpm	B/Bo (%)
Total count	72265	
NSB	2391	3.3
Calibrator		
0.0 pg/ml	30453	100.0
25.0 pg/ml	26395	86.7
50.0 pg/ml	23457	77.0
100.0 pg/ml	19476	63.9
200.0 pg/ml	14909	49.0
500.0 pg/ml	9639	31.7
1000.0 pg/ml	7180	23.6
2500.0 pg/ml	4568	15.0

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 20 pg/ml.

B. Specificity

Compound	Cross-Reactivity (%)
DHT	100.000
Testosterone (after oxydation)	0.100
Estriol	0.030
Estradiol	0.005
Progesterone	0.004

C. Precision

INTRA-ASSAY				INTER-ASSAY			
Serum	N	Mean (pg/ml)	CV (%)	Serum	N	Mean (pg/ml)	CV (%)
A	10	159.3	6.0	A	12	60.5	18.6
B	10	411.6	4.8	B	12	201.4	12.3
C	10	700.1	4.8	C	12	653.9	8.7

D. Accuracy

DILUTION TEST			
Serum	Dilution	Theoretical Concent. (pg/ml)	Measured Concent. (pg/ml)
1	1/1	-	737.0
	1/2	369.0	373.4
	1/4	184.0	192.5
	1/8	92.0	88.0
	1/16	46.0	52.1

Samples were diluted with the buffer.

RECOVERY TEST			
Added DHT (pg/ml)	Theoretical conc (pg/ml)	Recovered DHT (pg/ml)	Recovered (%)
0.0	-	311.1	-
50.0	180.5	185.1	102.5
100.0	205.5	210.5	102.4
200.0	255.6	260.4	101.9
500.0	405.6	429.5	105.9
1000.0	655.6	672.8	102.6

XIV. INTERNAL QUALITY CONTROL

- If the results obtained for Control 1 and/or Control 2 are not within the range specified on the vial label, the results cannot be used unless a satisfactory explanation for the discrepancy has been given.
- If desirable, each laboratory can make its own pools of control samples, which should be kept frozen in aliquots. Do not freeze-thaw more than twice.
- 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.

Males			
	Number of subjects	Median pg/ml	Range 5 to 95 percentiles pg/ml
<12 years	30	23.4	12.4 - 48.6
12-18 years	30	212.1	50.3 - 542.4
18-39 years	71	356.3	208.2 - 559.2
>39 years	29	331.4	185.1 - 547.6
Females			
	Number of subjects	Median pg/ml	Range 5 to 95 percentiles pg/ml
Follicular phase	41	97.2	40.8 - 168.3
Luteal phase	14	123	80.3 - 177
>60 years	28	45.8	16.2 - 106.2

XVI. PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

For in vitro diagnostic use only.

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

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

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

Any radioactive spills must be cleaned immediately in accordance with the radiosafety 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.

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.

Ethanol: the calibrator contains ethanol, which is highly flammable.

KMnO₄: this component is hazardous in case of skin or eye contact (irritant), of ingestion, of inhalation. In case of skin contact, flush immediately with water. In case of eye contact, check immediately for and remove any contact lenses, and flush eyes with plenty of water. Get medical attention immediately.

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

XVII. BIBLIOGRAPHY

1. Miller WL: Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocrin Rev* 9:295-318, 1988.
2. Pang S, Riddick L: Hirsutism. IN Lifshitz F: *Pediatric Endocrinology, A Clinical Guide, second edition*. Marcel Dekker, New York, 1990, pp. 259-291.
3. Wilson JD: Syndromes of androgen resistance. *Biol Reprod* 46:168-173, 1992.
4. Yalow R, Berson S: Introduction and general considerations. IN: Odell WD, Doughday WH (eds): *Principles of Competitive Protein Binding Assays*. J. B. Lippincott Co., Philadelphia, 1971, pp. 1-19.
5. Burtis CA, Ashwood ER: *Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 2nd edition*. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1994, p.1821.

XVIII. SUMMARY OF THE PROTOCOL

	Total count	NSB	Calibrator (0-7)	Controls	Samples (extracted)
Calibrator	-	-	100 μ l	-	-
Controls	-	-	-	100 μ l	-
Sample (extracted)	-	-	-	-	200 μ l
Buffer	-	300 μ l	100 μ l	100 μ l	-
Antiserum	-	-	100 μ l		
¹²⁵ I Tracer	100 μ l				
30 min at 37°C (water bath)					
PEG	-	1 ml			
Mix and incubate 20 min at room temperature					
Centrifuge at least 20 min (1800 g; 4 – 12 °C)					
Aspirate or decant; count for 1 minute in a gamma counter					

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

Lire l'intégralité du protocole avant utilisation.

DHT-RIA

I. BUT DU DOSAGE

Dosage radioimmunologique pour la mesure quantitative *in vitro* de la 5 α -dihydrotestostérone (DHT) humaine dans le sérum et le plasma.

II. INFORMATIONS GÉNÉRALES

- A. **Dénomination commerciale :** DIAsource DHT-RIA - Kit
- B. **Numéro de catalogue :** KIPI9900 : 100 tests
- C. **Fabriqué par :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
2, Rue du Bosquet, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgique.

Pour une assistance technique ou des informations sur une commande, contactez :

Tél. : +32 (0) 10 84.99.11

Fax : +32 (0) 10 84.99.91

III. INFORMATIONS CLINIQUES

A. *Activités biologiques de la 5 α -dihydrotestostérone*

La 5 α -dihydrotestostérone (DHT, 17 β -hydroxy-5 α -androstane-3-one), l'androgène le plus puissant existant à l'état naturel, est produite à partir de la testostérone par l'action de la cholesténone 5 α -réductase [1]. La concentration de la 5 α -réductase est à son comble dans certains tissus périphériques, notamment la peau des parties génitales et les follicules pileux ; on trouve la substance à l'intérieur des cellules, en apparente association avec la membrane nucléaire. La DHT exerce son action biologique en se liant au récepteur de l'androgène à l'intérieur des cellules ; ce complexe est ensuite transféré vers le noyau où se produit la liaison avec l'ADN, avec des effets consécutifs sur la transcription de l'ADN [2]. La plus grande partie de la DHT résiduelle est métabolisée à l'intérieur de la cellule pour produire le 3 α -androstanédiol et le 3 α -androstanédiol glucuronide. Seule une petite partie de la DHT s'échappe vers la circulation périphérique, où on la trouve à l'état de complexe formé avec la globuline liant les hormones sexuelles [3].

B. *Applications cliniques de la mesure du taux de 5 α -dihydrotestostérone*

La testostérone provoque la virilisation des canaux de Wolff pendant la vie fœtale, tandis que la DHT est responsable du développement des organes génitaux externes et de la prostate chez l'homme, et est principalement responsable des modifications physiques qui surviennent pendant la maturation sexuelle de l'homme. Une anomalie génétique autosomale récessive de la 5 α -réductase, parfois appelée pseudohermaphrodisme masculin ou hypospadias périnéoscrotal pseudovaginal, entraîne une mauvaise différenciation des tissus périphériques dépendants de la DHT. Les nourrissons masculins atteints de ce trouble peuvent avoir des organes génitaux ambigus et sont souvent élevés comme des filles, même si une virilisation importante peut se produire plus tard, possiblement du fait de l'augmentation naturelle des taux de testostérone [2]. La mesure des concentrations de DHT peut être compliquée par la réactivité croisée vis-à-vis de la testostérone. Le dosage radioimmunologique à double anticorps de la DHT utilise une procédure d'oxydation/extraction de l'échantillon en vue de supprimer la plus grande partie de la testostérone, associée à un dosage immunologique de la DHT.

IV. PRINCIPES DE LA PROCÉDURE

La procédure s'appuie sur le principe de base du dosage radioimmunologique où il existe une compétition entre l'antigène radioactif et l'antigène non radioactif pour un nombre donné de sites de liaison de l'anticorps. La quantité de l'analyte marqué au ¹²⁵I liée à l'anticorps est inversement proportionnelle à la concentration de l'analyte présent non marqué. La séparation de l'antigène libre de l'antigène lié est obtenue en utilisant un système à double anticorps.

V. RÉACTIFS FOURNIS

Réactifs	100 tests	Code couleur	Reconstitution
ANTISÉRUM Sérum de lapin anti-DHT lyophilisé avec de l'azoture de sodium (<0,1 %)	1 flacon Lyophilisé	Bleu	Reconstituer avec 10,2 ml de tampon
Ag ¹²⁵ I TRACEUR : DHT marqué au ¹²⁵ I dans un tampon à base de protéines avec de l'azoture de sodium (<0,1 %)	1 flacon 10,5 ml 185 kBq	Rouge	Prêt à l'emploi
PEG Gamma-globuline anti-lapin de mouton dans un tampon contenant du polyéthylène glycol et de l'azoture de sodium (<0,1 %)	1 flacon 105 ml	Vert	Prêt à l'emploi Avant utilisation, bien mélanger à l'aide d'un agitateur magnétique
KMnO₄ Solution de permanganate de potassium	1 flacon 50 ml	Noir	Prêt à l'emploi
BUF Tampon : solution physiologique tamponnée au phosphate 0,1 M avec de l'azoture de sodium (<0,1 %)	1 flacon 100 ml	Noir	Prêt à l'emploi
CAL. Calibrateur : solution-mère éthanolique contenant 100 ng/ml de DHT.	1 flacon	Jaune	Préparation de la courbe de calibration : se reporter au point VII B.
CONTROL N Contrôles : DHT dans un tampon contenant de l'azoture de sodium (<0,1 %)	2 flacons Lyophilisé	Argent	Reconstituer avec 2 ml d'eau Les concentrations exactes sont indiquées sur les étiquettes

VI. MATÉRIEL NON FOURNI

Le matériel suivant est requis, mais n'est pas fourni dans le kit :

- Eau distillée
- Pipettes pour mesurer 100 µl, 200 µl, 500 µl et 1 ml (l'utilisation de pipettes précises avec des embouts en plastique jetables est recommandée)
- Agitateur-mélangeur vortex
- Agitateur magnétique
- Bain-marie à 37 °C
- 12 tubes de verre de 75 mm.
- Système d'aspiration (facultatif)
- Centrifugeuse réfrigérée, accélération de 1800 g.
- Hexane de qualité HPLC
- Éthanol de qualité HPLC
- Il est possible d'utiliser tout compteur gamma capable de doser le ¹²⁵I (rendement minimal 70 %).

VII. PRÉPARATION DU RÉACTIF

- A. **Contrôles** : Reconstituer les contrôles avec 2 ml d'eau distillée. Attendre 15 minutes que la reconstitution soit terminée ; mélanger doucement pour éviter la formation de mousse. **Il n'est pas nécessaire d'extraire ou d'oxyder les contrôles.**
- B. **Préparation de la courbe de calibration** :

Préparer les dilutions suivantes pour obtenir la courbe :

Calibrateur	Conc. (pg/ml)	Calibrateur (ml)	Tampon (ml)
C7	2 500	Calibrateur mère : 0,1	3,9
C6	1 000	Calibrateur mère : 0,1	9,9
C5	500	C6 : 1,0	1,0
C4	200	C6 : 0,2	0,8
C3	100	C6 : 0,1	0,9
C2	50	C6 : 0,1	1,9
C1	25	C2 : 0,5	0,5

Le tampon fait office de Calibrateur « 0 ». Conserver les Calibrateurs entre 2 et 8 °C pendant 12 semaines maximum.

- C. **Antisérum** : Reconstituer le flacon avec 10,2 ml de tampon.

VIII. STOCKAGE ET EXPIRATION DES RÉACTIFS

- Avant ouverture ou reconstitution, tous les composants du kit sont stables jusqu'à leur date d'expiration (mentionnée sur la notice) s'ils sont conservés entre 2 et 8 °C.
- Après reconstitution, les contrôles restent stables pendant 12 semaines entre 2 et 8 °C. Pour une conservation plus longue, il convient de créer des aliquots et de les conserver à -20 °C pendant 3 mois.
- Les calibrateurs fraîchement préparés restent stables pendant 12 semaines maximum entre 2 et 8 °C.
- Après sa première utilisation, le traceur est stable jusqu'à la date d'expiration s'il est conservé entre 2 et 8 °C dans le flacon d'origine bien fermé.
- L'altération de l'apparence physique des réactifs peut indiquer une instabilité ou une détérioration.

IX. PRÉPARATION ET STABILITE DES ÉCHANTILLONS

- Les échantillons de sérum ou de plasma doivent être conservés à 2-8 °C.
- Si le test n'est pas effectué dans les 24 heures, il est recommandé de les conserver à -20 °C.
- Éviter des cycles de congélation et décongélation successifs.

X. PROCÉDURE

A. Remarques relatives à la manipulation

Ne pas utiliser le kit ou ses composants au-delà de la date d'expiration. Ne pas mélanger de matériaux de lots de kits différents. Amener tous les réactifs à température ambiante avant de les utiliser. Mélanger soigneusement tous les réactifs et les échantillons en les agitant doucement ou avec des mouvements de tourbillon. **Le réactif PEG doit être mélangé à température ambiante à l'aide d'un agitateur magnétique pendant 10 minutes au moins avant utilisation.** Utiliser un embout de pipette jetable propre pour l'ajout de chaque réactif et échantillon différent afin d'éviter toute contamination croisée. Des pipettes de grande précision ou un équipement de pipetage automatisé améliorent la précision. Respecter les durées d'incubation. Préparer une courbe de calibration pour chaque nouvelle série d'expériences ; ne pas utiliser les données de tests précédents.

B. Extraction des échantillons :

Ne pas utiliser cette procédure pour les calibrateurs ou les contrôles !

- Prélever **300 µl** (mesure en double) de sérum ou de plasma dans des tubes en verre.
- Ajouter **600 µl** de KMnO₄.

- Agiter au vortex **2 fois pendant 10 secondes environ**.
- Incuber pendant **15 minutes** à température ambiante (18 à 25 °C).
- Ajouter **3 ml** d'un mélange hexane/éthanol (98/2 vol./vol.).
- Boucher les tubes et agiter vigoureusement **3 fois pendant 30 secondes (ne pas utiliser de vortex !)**.
- Centrifuger à **1800 g** pendant **5 minutes** à température ambiante.
- Pour chaque échantillon, préparer et étiqueter 2 tubes en verre.
- Transférer **1 ml** de la couche organique supérieure vers **chacun des deux tubes** et laisser évaporer à sec, de préférence sous un flux d'air ou d'azote.
- Ajouter **200 µl** de tampon dans chaque tube. Agiter au vortex pendant **30 secondes**. Incuber pendant **20 minutes** à température ambiante. Agiter au vortex encore une fois pendant **30 secondes**.
- Les échantillons sont à présent prêts pour la détermination par RIA.

C. Test RIA

- Préparer et identifier les tubes (en double) pour : L'Activité totale, la liaison non spécifique (LNS), les calibrateurs et les contrôles. Utiliser le même type de tube que ceux qui contiennent les échantillons extraits (X.B.8.)
- Ajouter **100 µl** de chaque calibrateur (y compris 100 µl de tampon en tant que calibrateur 0) et **100 µl** de chaque contrôle dans leurs tubes respectifs.
- Ajouter **100 µl** de tampon dans chaque tube de calibrateur ou de contrôle. (Ajouter 300 µl de tampon dans les tubes de LNS)
- Ajouter **100 µl** d'antisérum dans chaque tube (calibrateurs, contrôles, échantillons). Ne pas ajouter d'antisérum dans les tubes de l'activité totale et LNS.
- Ajouter **100 µl** de traceur ¹²⁵I dans tous les tubes.
- Bien mélanger, couvrir avec un film et incuber pendant **30 minutes à 37 °C** au bain-marie.
- Ajouter **1 ml** de réactif PEG dans tous les tubes sauf celui de l'Activité totale. **Le réactif PEG doit être vigoureusement mélangé à l'aide d'un agitateur magnétique avant utilisation.**
- Incuber à température ambiante pendant 20 minutes.
- Centrifuger à **1800 g, entre 4 et 12 °C, pendant 20 minutes au moins.**
- Aspirer ou décanter le surnageant en renversant les tubes. Éponger les tubes pour éliminer tout liquide restant.
- Soumettre les tubes au dosage pendant une minute dans un compteur gamma.

XI. CALCUL DES RÉSULTATS

- Calculer les CPM moyens des déterminations en double.
- Calculer la radioactivité liée sous forme de pourcentage des liaisons déterminées au calibrateur zéro (0) en utilisant la formule suivante :

$$B/B0 (\%) = \frac{\text{cpm (Calibrato r or sample)} - \text{cpm NSB}}{\text{cpm (Zero Calibrator)} - \text{cpm NSB}} \times 100$$

- Sur un papier graphique semi-logarithmique ou Logit-Log à 3 cycles, placer les valeurs de (B/B0 (%)) pour chaque calibrateur en fonction de la concentration de DHT de chaque calibrateur ; rejeter les valeurs aberrantes évidentes.
- On peut aussi utiliser des méthodes assistées par ordinateur pour construire la courbe de calibration. Si on utilise un traitement automatique des résultats, il est recommandé d'utiliser la fonction « 4 paramètres » du lissage de courbes.
- Déterminer les concentrations en DHT des échantillons à partir de la courbe de référence, par interpolation des valeurs (B/B0 (%)) des échantillons.
- Pour chaque dosage, le pourcentage de traceur total lié en absence de DHT non marqué (B0/T) doit être vérifié.

XII. DONNÉES TYPES

Les données suivantes sont uniquement fournies à titre d'exemple et ne doivent jamais être utilisées à la place de la véritable courbe de calibration.

DHT-RIA	cpm	B/B0 (%)
Activité Totale	72 265	
LNS	2 391	3,3
Calibrateur		
0,0 pg/ml	30453	100,0
25,0 pg/ml	26395	86,7
50,0 pg/ml	23457	77,0
100,0 pg/ml	19476	63,9
200,0 pg/ml	14909	49,0
500,0 pg/ml	9639	31,7
1 000,0 pg/ml	7180	23,6
2 500,0 pg/ml	4568	15,0

XIII. PERFORMANCES ET LIMITATIONS

A. Limite de détection

Vingt calibrateurs 0 ont été évalués avec un groupe d'autres calibrateurs. La limite de détection, définie comme une concentration apparente à deux écarts-types en dessous du décompte moyen à la liaison zéro, était de 20 pg/ml.

B. Spécificité

Composé	Réactivité croisée (%)
DHT	100,000
Testostérone (après oxydation)	0,100
Œstriol	0,030
Œstradiol	0,005
Progestérone	0,004

C. Précision

INTRA-ESSAI

INTER-ESSAI

Sérum	N	Moyenne (pg/ml)	CV (%)	Sérum	N	Moyenne (pg/ml)	CV (%)
A	10	159,3	6,0	A	12	60,5	18,6
B	10	411,6	4,8	B	12	201,4	12,3
C	10	700,1	4,8	C	12	653,9	8,7

D. Exactitude

TEST DE DILUTION

Sérum	Dilution	Conc. théorique (pg/ml)	Conc. mesurée (pg/ml)
1	1/1	-	737,0
	1/2	369,0	373,4
	1/4	184,0	192,5
	1/8	92,0	88,0
	1/16	46,0	52,1

Les échantillons ont été dilués avec le tampon.

TEST DE RÉCUPÉRATION

DHT ajoutée (pg/ml)	Conc. théorique (pg/ml)	Récupération DHT (pg/ml)	Récupération (%)
0,0	-	311,1	-
50,0	180,5	185,1	102,5
100,0	205,5	210,5	102,4
200,0	255,6	260,4	101,9
500,0	405,6	429,5	105,9
1 000,0	655,6	672,8	102,6

XIV. CONTRÔLE QUALITÉ INTERNE

- Si les résultats obtenus pour le Contrôle 1 et/ou pour le Contrôle 2 ne se trouvent pas dans la plage spécifiée sur l'étiquette du flacon, ils ne peuvent pas être utilisés à moins de pouvoir expliquer l'incohérence d'une manière satisfaisante.
Au besoin, chaque laboratoire peut créer ses propres échantillons de contrôle, qui doivent être conservés au congélateur sous forme d'aliquotes. Ne pas congeler/décongeler plus de deux fois.
- Les critères d'acceptation pour la différence entre les résultats en double des échantillons doivent reposer sur les bonnes pratiques de laboratoire.

XV. INTERVALLES DE RÉFÉRENCE

Les valeurs sont données uniquement à titre indicatif ; chaque laboratoire doit établir son intervalle de valeurs normales.

Hommes			
	Nombre de sujets	Mediane pg/ml	Plage de 5 à 95 percentiles pg/ml
<12 ans	30	23,4	12,4 - 48,6
12-18 ans	30	212,1	50,3 - 542,4
18-39 ans	71	356,3	208,2 - 559,2
>39 ans	29	331,4	185,1 - 547,6

Femmes			
	Nombre de sujets	Mediane pg/ml	Plage de 5 à 95 percentiles pg/ml
Phase folliculaire	41	97,2	40,8 - 168,3
Phase lutéale	14	123	80,3 - 177
>60 ans	28	45,8	16,2 - 106,2

XVI. PRÉCAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

Sécurité

Pour utilisation en diagnostic *in vitro* uniquement.

Ce kit contient du ¹²⁵I (demi-vie : 60 jours), émettant des rayons X (28 keV) et γ (35,5 keV) ionisants.

Ce produit radioactif peut être uniquement transféré à des personnes habilitées qui sont les seules à pouvoir l'utiliser. L'achat, le stockage, l'utilisation et l'échange de produits radioactifs sont soumis à la loi du pays de l'utilisateur final. En aucun cas, le produit ne peut être administré à l'être humain ou à des animaux.

Toute manipulation de produits radioactifs doit être effectuée dans une zone désignée, à l'écart des zones de passages réguliers. Un registre de la réception et du stockage de matériaux radioactifs doit être conservé dans le laboratoire. L'équipement et la verrerie de laboratoire susceptible d'avoir été contaminés par des substances radioactives doivent être isolés afin d'éviter une contamination croisée de différents radio-isotopes.

Toute fuite radioactive doit être immédiatement nettoyée conformément aux procédures relatives à la radio-sécurité. Les déchets radioactifs doivent être éliminés conformément aux réglementations locales et aux directives des autorités ayant compétence sur le laboratoire. Le respect des règles élémentaire de sûreté radiologique permet une protection adéquate.

Tous les produits et dérivés d'origine animale ont été prélevés sur des animaux sains. Les composants bovins proviennent de pays dans lesquels aucun cas d'ESB n'a été recensé. Néanmoins, les composants contenant des substances d'origine animale doivent être considérés comme potentiellement infectieux.

Éviter tout contact de la peau avec les réactifs (azoture de sodium en tant que conservateur). L'azoture présent dans ce kit peut réagir avec le plomb et le cuivre dans les canalisations et former ainsi des azotures métalliques fortement explosifs. Pendant l'étape de lavage, rincer les canalisations avec une grande quantité d'eau pour éviter toute accumulation d'azoture.

Éthanol : le calibrateur contient de l'éthanol, qui est très inflammable.

KMnO₄ : ce composant présente un danger en cas de contact avec la peau ou avec les yeux (irritant), en cas d'ingestion et d'inhalation. En cas de contact avec la peau, rincer immédiatement à l'eau. En cas de contact avec les yeux, vérifier immédiatement si la victime porte des lentilles et les retirer si c'est le cas, puis rincer les yeux abondamment à l'eau. Consulter immédiatement un médecin.

Ne pas fumer, boire, manger ni utiliser de produits cosmétiques dans la zone de travail. Ne pas pipeter avec la bouche. Utiliser des vêtements de protection et des gants jetables.

XVII. BIBLIOGRAPHIE

1. Miller WL: Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocrin Rev* 9:295-318, 1988.
2. Pang S, Riddick L: Hirsutism. in Lifshitz F: *Pediatric Endocrinology, A Clinical Guide, second edition*. Marcel Dekker, New York, 1990, pp. 259-291.
3. Wilson JD: Syndromes of androgen resistance. *Biol Reprod* 46:168-173, 1992.
4. Yalow R, Berson S: Introduction and general considerations. in: Odell WD, Doughday WH (éd.): *Principles of Competitive Protein Binding Assays*. J. B. Lippincott Co., Philadelphia, 1971, pp. 1-19.
5. Burtis CA, Ashwood ER: *Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 2nd edition*. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1994, p.1821.

XVIII. RÉSUMÉ DU PROTOCOLE

	Activité Totale	LNS	Calibrateurs (0-7)	Contrôles	Échantillons (extraits)
Calibrateurs	-	-	100 µl	-	-
Contrôles	-	-	-	100 µl	-
Échantillons (extraits)	-	-	-	-	200 µl
Tampon	-	300 µl	100 µl	100 µl	-
Antisérum	-	-	100 µl		
Traceur ¹²⁵ I	100 µl				
30 min à 37 °C (bain-marie)					
PEG	-	1 ml			
Mélanger et incuber pendant 20 min à température ambiante					
Centrifuger pendant 20 min au moins (1800 g, entre 4 et 12 °C)					
Aspirer ou décanter ; doser pendant 1 minute dans un compteur gamma					

Lea todo el protocolo antes de usar.

DHT-RIA

I. INDICACIONES

Radioinmunoensayo para la determinación cuantitativa *in vitro* de 5- α -dihidrotestosterona (DHT) humana en suero y plasma.

II. INFORMACIÓN GENERAL

- A. **Nombre comercial:** Kit DIAsource DHT-RIA
- B. **Número de catálogo:** KIPi9900: 100 pruebas
- C. **Fabricado por:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Bélgica.

Para recibir asistencia técnica o información sobre pedidos contacte con:

Tel: +32 (0) 10 84.99.11

Fax: +32 (0) 10 84.99.91

III. ANTECEDENTES CLÍNICOS

A. *Actividades biológicas de la 5 α -dihidrotestosterona*

La 5 α -dihidrotestosterona (DHT; 17 β -hidroxi-5 α -androstano-3-ona), el andrógeno natural más potente, se produce a partir de la testosterona mediante la acción de la colestero-5 α -reductasa [1]. Las concentraciones de 5 α -reductasa son más elevadas en ciertos tejidos periféricos, incluida la piel de los genitales y los folículos pilosos, localizándose intracelularmente en relación aparente con la membrana nuclear. La DHT ejerce su acción biológica por unión intracelular al receptor androgénico; este complejo se transfiere a continuación al núcleo donde tiene lugar la unión al ADN con los efectos derivados en la transcripción del ADN [2]. La mayor parte de la DHT residual se metaboliza intracelularmente a 3 α -androstano-20 α -diol y 3 α -androstano-20 α -diol glucuronido. Solo una pequeña proporción de DHT pasa a la circulación periférica, donde está presente fundamentalmente complejada a la globulina de unión a hormonas sexuales [3].

B. *Aplicaciones clínicas de la determinación del nivel de 5 α -dihidrotestosterona*

La testosterona produce la virilización de los conductos de Wolff durante la vida fetal, mientras que la DHT es responsable del desarrollo de los genitales externos y la próstata masculinos, y responsable fundamentalmente de los cambios físicos que se producen durante la maduración sexual masculina. Una deficiencia genética autosómica recesiva de la 5 α -reductasa, denominada a veces pseudohermafroditismo masculino o hipospadias perineoescrotal pseudovaginal, da lugar a una diferenciación inadecuada de los tejidos periféricos dependientes de la DHT. Los niños con este trastorno tienen genitales ambiguos y se les cría a menudo como niñas, aunque puede producirse una considerable virilización más adelante en la vida debido supuestamente al aumento natural de los niveles de testosterona [2].

La determinación de las concentraciones de DHT puede complicarse por la reactividad cruzada de anticuerpos con la testosterona. El radioinmunoensayo de doble anticuerpo para la DHT utiliza un procedimiento de oxidación/extracción de la muestra para eliminar la mayor parte de la testosterona, en combinación con un inmunoensayo específico para la DHT.

IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

El procedimiento respeta el principio básico del radioinmunoensayo en el que compiten el antígeno radiactivo y el no radiactivo por un número determinado de sitios de unión al anticuerpo. La cantidad de analito marcado (con I-125) unido al anticuerpo es inversamente proporcional a la concentración de analito no marcado presente. La separación de antígeno libre y unido se logra utilizando un sistema de doble anticuerpo.

V. REACTIVOS PROPORCIONADOS

Reactivos	100 pruebas	Código de color	Reconstitución
ANTISERUM Suero de conejo anti-DHT liofilizado con azida sódica (< 0,1 %)	1 vial Liofilizado	Azul	Reconstituir con 10,2 ml de tampón
Ag 125I TRAZADOR: DHT marcada con 125I en un tampón de base proteica con azida sódica (< 0,1 %)	1 vial 10,5 ml 185 kBq	Rojo	Listo para usar
PEG Gammaglobulina anticonejo de oveja en un tampón con polietilenglicol y azida sódica (< 0,1 %)	1 vial 105 ml	Verde	Listo para usar Mezclar bien con un agitador magnético antes de usar
KMnO4 Solución de permanganato potásico	1 vial 50 ml	Negro	Listo para usar
RIF Tampón: tampón fosfato salino 0,1 M con azida sódica (< 0,1 %)	1 vial 100 ml	Negro	Listo para usar
CAL Calibrador: solución madre etanólica, con 100 ng/ml de DHT.	1 vial	Amarillo	Preparación de la curva estándar: consultar apartado VII B.
CONTROL N Controles: DHT en un tampón con azida sódica (< 0,1 %)	2 viales Liofilizado	Plata	Reconstituir con 2 ml de agua Las concentraciones exactas se indican en las etiquetas

VI. SUMINISTROS NO PROPORCIONADOS

El material siguiente es necesario, pero no se proporciona en el kit:

1. Agua destilada
2. Pipetas para dispensación de: 100 µl, 200 µl, 500 µl y 1 ml (se recomienda usar pipetas de precisión con puntas de plástico desechables)
3. Agitador vórtex
4. Agitador magnético
5. Baño maría a 37 °C
6. Tubos de vidrio de 12 x 75 mm
7. Sistema de aspiración (opcional)
8. Centrífuga refrigerada con capacidad para 1800 g.
9. Hexano de calidad HPLC
10. Etanol de calidad HPLC
11. Puede utilizarse cualquier contador gamma con capacidad para medir 125I (eficiencia mínima del 70 %)

VII. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

- A. **Controles:** reconstituya los controles con 2 ml de agua destilada. Deje 15 minutos para la reconstitución; mezcle suavemente para evitar que se forme espuma. **No es necesario extraer ni oxidar los controles.**

B. Preparación de la curva estándar:

Prepare las diluciones siguientes para obtener la curva:

Calibrador	Conc (pg/ml)	Calibrador (ml)	Tampón (ml)
C7	2500	Cal patrón: 0,1	3,9
C6	1000	Cal patrón: 0,1	9,9
C5	500	C6: 1,0	1,0
C4	200	C6: 0,2	0,8
C3	100	C6: 0,1	0,9
C2	50	C6: 0,1	1,9
C1	25	C2: 0,5	0,5

El tampón sirve como calibrador "0". Conserve los calibradores a 2-8 °C durante 12 semanas como máximo.

- C. **Antisuero:** reconstituya el vial con 10,2 ml de tampón.

VIII. CONSERVACIÓN Y FECHA DE CADUCIDAD DE LOS REACTIVOS

- Antes de abrir o de la reconstitución, todos los componentes del kit son estables hasta la fecha de caducidad, indicada en la etiqueta, si se conservan entre 2 y 8 °C.
- Tras la reconstitución, los controles se mantienen estables durante 12 semanas a 2-8 °C. Para períodos de tiempo más largos, deben tomarse partes alícuotas y conservarse a -20 °C durante 3 meses.
- Los calibradores recién preparados se mantienen estables durante un máximo de 12 semanas a 2-8 °C.
- Después del primer uso, el trazador se mantiene estable hasta la fecha de caducidad si se conserva en el vial original bien cerrado entre 2 y 8 °C.
- Las alteraciones del aspecto físico de los reactivos del kit pueden indicar inestabilidad o deterioro.

IX. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

- Las muestras de suero o plasma deben conservarse a 28 °C.
- Si la prueba no se realiza antes de 48 horas, se recomienda conservar a 20 °C.
- Evite la congelación y descongelación reiteradas.

X. PROCEDIMIENTO

A. Notas sobre la manipulación

No utilice el kit o sus componentes pasada la fecha de caducidad. No mezcle materiales de distintos lotes de kit. Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente antes de usar. Mezcle bien todos los reactivos y muestras agitándolos o revolviéndolos suavemente.

El reactivo PEG debe mezclarse a temperatura ambiente con un agitador magnético al menos 10 minutos antes de usar.

Use una punta de pipeta desechable limpia para añadir cada reactivo y muestra diferente para evitar la contaminación cruzada. Las pipetas de alta precisión o un equipo de pipeteo automatizado mejorarán la precisión. Respete los tiempos de incubación.

Prepare una curva de calibración para cada análisis, no utilice datos de análisis anteriores.

B. Extracción de las muestras:

¡No aplique este procedimiento a los calibradores ni a los controles!

1. Obtenga **300 µl** (medición por duplicado) de suero o plasma en tubos de vidrio.
2. Añada **600 µl** de KMnO4.
3. Agite con el vórtex unos **2 x 10 segundos**.
4. Incube durante **15 minutos** a temperatura ambiente (18-25 °C).
5. Añada **3 ml** de una mezcla de hexano / etanol (98:2 vol/vol).
6. Tape los tubos y agite bien **3 x 30 segundos (no use el vórtex)**.
7. Centrifugue a **1800 g** durante **5 minutos** a temperatura ambiente.
8. Prepare e identifique 2 tubos de vidrio para cada muestra.

- Transfiera **1 ml** de la capa orgánica superior a **cada tubo duplicado** y evapore hasta que se seque, preferentemente bajo una corriente de aire o nitrógeno.
- Añada **200 µl** de tampón a cada tubo. Agite con el vórtex **30 segundos**. Incube durante **20 minutos** a temperatura ambiente. Agite de nuevo con el vórtex durante otros **30 segundos**.
- Las muestras ya están listas para la determinación por RIA.

C. Prueba de RIA

- Prepare e identifique tubos (por duplicado) para: recuentos totales, unión no específica (NSB), calibradores y controles. Use el mismo modelo de tubos que los que contienen las muestras extraídas (X.B.8.)
- Añada **100 µl** de cada calibrador (incluidos 100 µl de tampón como calibrador 0) y **100 µl** de cada control a los tubos correspondientes.
- Añada **100 µl** de tampón al tubo de cada calibrador o control. (Añada 300 µl de tampón a los tubos de NSB)
- Añada **100 µl** de antisuero a cada tubo (calibradores, controles, muestras). No añada antisuero a los tubos de recuentos totales ni de NSB.
- Añada **100 µl** del trazador 125I a todos los tubos.
- Mezcle bien, cubra con film e incube durante **30 minutos a 37 °C** en un baño maría.
- Añada **1 ml** del reactivo PEG a todos los tubos excepto al de recuentos totales. **El reactivo PEG debe mezclarse por completo antes de usar con un agitador magnético.**
- Incuba a temperatura ambiente durante 20 minutos.
- Centrifugue a **1800 g, a 4-12 °C, durante al menos 20 minutos.**
- Aspire o decante el sobrenadante invirtiendo los tubos. Seque los tubos para quitar el líquido remanente.
- Mida los tubos durante un minuto en un contador gamma.

XI. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

- Calcule la media de cpm de las determinaciones por duplicado.
- Calcule la radiactividad unida como un porcentaje de la unión determinado en el punto del calibrador cero (0) según la fórmula siguiente:

$$B/B_0 (\%) = \frac{\text{cpm (Calibrador } r \text{ or sample) - cpm NSB}}{\text{cpm (Zero Calibrator) - cpm NSB}} \times 100$$

- Represente los valores (B/B₀(%)) del punto de cada calibrador usando papel gráfico semilogarítmico o logitlog de 3 ciclos en función de la concentración de DHT del punto de cada calibrador, rechace los valores atípicos obvios.
- Se pueden usar también métodos informáticos para generar la curva de calibración. Si se emplea un procesamiento automático de los resultados, se recomienda un ajuste de la curva mediante función logística de 4 parámetros.
- Determine las concentraciones de DHT de las muestras en la curva de referencia mediante interpolación de los valores (B/B₀(%)) de las muestras.
- Debe comprobarse, para cada ensayo, el porcentaje de trazador total unido en ausencia de DHT sin marcar (B₀/T).

XII. DATOS TÍPICOS

Los datos siguientes son solo a efectos ilustrativos y no deben utilizarse nunca en lugar de la curva de calibración generada en tiempo real.

DHT-RIA		cpm	B/B ₀ (%)
Recuento total		72265	
NSB		2391	3,3
Calibrador	0,0 pg/ml	30453	100,0
	25,0 pg/ml	26395	86,7
	50,0 pg/ml	23457	77,0
	100,0 pg/ml	19476	63,9
	200,0 pg/ml	14909	49,0
	500,0 pg/ml	9639	31,7
	1000,0 pg/ml	7180	23,6
	2500,0 pg/ml	4568	15,0

XIII. EFICACIA Y LIMITACIONES

A. Límite de detección

Se analizaron veinte calibradores cero junto con un conjunto de otros calibradores.

El límite de detección, definido como la concentración aparente dos desviaciones estándar por debajo del promedio de recuentos en la unión cero, fue de 20 pg/ml.

B. Especificidad

Compuesto	Reactividad cruzada (%)
DHT	100,000
Testosterona (tras oxidación)	0,100
Estríol	0,030
Estradiol	0,005
Progesterona	0,004

C. Precisión

INTRAENSAYO				INTERENSAYO			
Suero	N	Media (pg/ml)	CV (%)	Suero	N	Media (pg/ml)	CV (%)
A	10	159,3	6,0	A	12	60,5	18,6
B	10	411,6	4,8	B	12	201,4	12,3
C	10	700,1	4,8	C	12	653,9	8,7

D. Exactitud

PRUEBA DE DILUCIÓN

Suero	Dilución	Concent. teórica (pg/ml)	Concent. medida (pg/ml)
1	1/1	-	737,0
	1/2	369,0	373,4
	1/4	184,0	192,5
	1/8	92,0	88,0
	1/16	46,0	52,1

Las muestras se diluyeron con el tampón.

PRUEBA DE RECUPERACIÓN

DHT añadida (pg/ml)	Conc. teórica (pg/ml)	DHT recuperada (pg/ml)	DHT (%)
0,0	-	311,1	-
50,0	180,5	185,1	102,5
100,0	205,5	210,5	102,4
200,0	255,6	260,4	101,9
500,0	405,6	429,5	105,9
1000,0	655,6	672,8	102,6

XIV. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

- Si los resultados obtenidos para el control 1 o el control 2 no se encuentran dentro del intervalo especificado en la etiqueta del vial, no se pueden utilizar dichos resultados, salvo que se proporcione una explicación satisfactoria sobre la discrepancia.
- Cada laboratorio puede, si lo desea, realizar sus propias mezclas de muestras control, que deberían conservarse congeladas en alícuotas. No congele y descongele más de dos veces.
- Los criterios de aceptación de la diferencia entre los resultados duplicados de las muestras deben basarse en las buenas prácticas de laboratorio.

XV. INTERVALOS DE REFERENCIA

Estos valores se proporcionan solo como guía; cada laboratorio debería establecer su propio intervalo de valores normales.

Hombres			
	Número de sujetos	Media pg/ml	Rango de 5 a 95 percentiles pg/ml
<12 años	30	23,4	12,4 - 48,6
12-18 años	30	212,1	50,3 - 542,4
18-39 años	71	356,3	208,2 - 559,2
>39 años	29	331,4	185,1 - 547,6
Mujeres			
	Número de sujetos	Media pg/ml	Rango de 5 a 95 percentiles pg/ml
Fase folicular	41	97,2	40,8 - 168,3
Fase lútea	14	123	80,3 - 177
>60 años	28	45,8	16,2 - 106,2

XVI. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Seguridad

Solo para uso diagnóstico in vitro.

Este kit contiene ^{125}I (semivida: 60 días), que emite radiaciones ionizantes X (28 keV) y γ (35,5 keV).

Este producto radiactivo se puede transferir a y ser utilizado únicamente por personas autorizadas. La adquisición, almacenamiento, uso e intercambio de productos radiactivos están sujetos a la legislación del país del usuario final. Bajo ninguna circunstancia debe administrarse el producto a seres humanos ni animales.

Toda manipulación de productos radiactivos debe llevarse a cabo en una zona designada para tal fin, alejada de zonas de paso. En el laboratorio debe custodiarse un libro de registro sobre la recepción y almacenamiento de materiales radiactivos. Los equipos y el material de vidrio de laboratorio, que podrían estar contaminados con sustancias radiactivas, deberían separarse para prevenir la contaminación cruzada de radioisótopos diferentes.

Los vertidos radiactivos deben limpiarse inmediatamente de conformidad con los procedimientos de seguridad radiológica. Los residuos radiactivos deben desecharse siguiendo la normativa y las recomendaciones locales de las autoridades con jurisdicción del laboratorio. El cumplimiento de las normas básicas sobre seguridad radiológica proporciona la protección adecuada.

Todos los productos y derivados de animales se han obtenido de animales sanos. Los componentes bovinos son originarios de países en los que no se ha notificado EEB. Sin embargo, los componentes que contengan sustancias animales deben tratarse como potencialmente infecciosos.

Evite el contacto con la piel de los reactivos (azida sódica como conservante). La azida de este kit puede reaccionar con el plomo y el cobre de las tuberías y formar de este modo azidas metálicas muy explosivas. Durante el paso de lavado, lave el desagüe con agua abundante para prevenir la acumulación de azidas.

Etanol: el calibrador contiene etanol, que es muy inflamable.

KMnO₄: este componente es peligroso en caso de contacto con la piel o los ojos (irritante), de ingestión o de inhalación. En caso de contacto con la piel, lávese inmediatamente con agua. En caso de contacto con los ojos, compruebe y retire inmediatamente las lentes de contacto, si lleva, y lávese los ojos con abundante agua. Consulte a un médico inmediatamente.

No fume, beba, coma ni use cosméticos en la zona de trabajo. No pipete con la boca. Lleve ropa protectora y guantes desechables.

XVII. BIBLIOGRAFÍA

1. Miller WL: Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocrin Rev* 9:295-318, 1988.
2. Pang S, Riddick L: Hirsutism. IN Lifshitz F: *Pediatric Endocrinology, A Clinical Guide, second edition*. Marcel Dekker, New York, 1990, pp. 259-291.
3. Wilson JD: Syndromes of androgen resistance. *Biol Reprod* 46:168-173, 1992.
4. Yalow R, Berson S: Introduction and general considerations. IN: Odell WD, Doughday WH (eds): *Principles of Competitive Protein Binding Assays*. J. B. Lippincott Co., Philadelphia, 1971, pp. 1-19.
5. Burtis CA, Ashwood ER: *Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 2nd edition*. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1994, p.1821.

XVIII. RESUMEN DEL PROTOCOLO

	Recuento total	NSB	Calibrador (0-7)	Controles	Muestras (extraídas)
Calibrador	-	-	100 µl	-	-
Controles	-	-	-	100 µl	-
Muestra (extraída)	-	-	-	-	200 µl
Tampón	-	300 µl	100 µl	100 µl	-
Antisuero	-	-	100 µl		
Trazador ^{125}I	100 µl				
30 min a 37 °C (baño maría)					
PEG	-	1 ml			
Mezclar e incubar 20 min a temperatura ambiente					
Centrifugar al menos 20 min (1800 g; 4 °C)					
Aspirar o decantar; medir durante 1 minuto en un contador gamma					

Leia todo o protocolo antes de utilizar.

DHT-RIA

I. INTENÇÃO DE USO

Radioimunoensaio para a medição quantitativa in vitro de 5- α -dihidrotestosterona (DHT) humana, no soro e plasma.

II. INFORMAÇÃO GERAL

- A. **Nome do proprietário :** DIAsource DHT-RIA - Kit
- B. **Nº de catálogo :** KIP19900 : 100 testes
- C. **Produzido por :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Para assistência técnica ou encomendas contacte :

Tel: +32 (0) 10 84.99.11

Fax: +32 (0) 10 84.99.91

III. FUNDAMENTAÇÃO CLÍNICA

A. Actividades biológicas de 5 α -Dihidrotestosterona

5 α -Dihidrotestosterona (DHT; 17 β -Hidroxi-5 α -androstan-3-one), é o androgenio mais potente que ocorre naturalmente, é produzido a partir da testosterona através da ação de colesteno 5 α -redutase [1]. As concentrações de 5 α -redutase são mais altas em certos tecidos periféricos, incluindo a pele genital e folículos pilosos, e está localizada intracelularmente em aparente associação com a membrana nuclear. DHT exerce a sua ação biológica intracelular por ligação ao receptor de androgenio, o complexo é então transferido para o núcleo, onde ocorre a ligação - DNA com os consequentes efeitos sobre a transcrição de DNA [2]. A maior parte da DHT residual sofre metabolismo intracelular de 3 α -androstanoediol e 3 α -androstanoediol glucuronide. Apenas uma pequena percentagem DHT cai na circulação periférica, onde está presente o complexo primário do hormônio sexual ligado a globulina [3].

B. Aplicações clínicas de medição do nível de 5 α -dihidrotestosterona

A testosterona provoca virilização dos ductos de Wolf durante a vida fetal, enquanto DHT é responsável pelo desenvolvimento dos órgãos genitais externos masculinos e na próstata é a principal responsável pelas alterações físicas que ocorrem durante a maturação sexual masculina. Uma deficiência genética autossômica recessiva, ou 5 alpha-redutase, às vezes chamado de pseudo-hermafroditismo masculino ou hipospádia perineoscrotal pseudovaginal, leva à diferenciação inadequada de tecidos periféricos DHT-dependentes. Crianças do sexo masculino com este transtorno têm genitália ambígua e são criados como mulheres. Muitas vezes, apesar de virilização significativa pode ocorrer mais tarde na vida, presumivelmente devido ao aumento de níveis naturais de testosterona [2].

Medição da concentração de DHT pode ser complicada pela reatividade cruzada do anticorpo a testosterona. O DHT Anticorpo radioimunoensaio duplo utiliza uma oxidação e / ou extração, procedimento para remover a maior parte da testosterona, juntamente com um imunoensaio específico para DHT.

IV. PRINCÍPIOS DO MÉTODO

O processo segue o princípio básico de radioimunoensaio, onde há uma competição entre o antígeno radioativo e não radioativo para um determinado número de locais de ligação de anticorpo. A quantidade de analito (I^{125})-marcado ligado ao anticorpo é inversamente proporcional à concentração de analito não marcado presente. A separação do antígeno livre e ligado é conseguido através de um sistema de duplo anticorpo.

V. REAGENTES FORNECIDOS

Reagentes	100 Testes	Código de cor	Reconstituição
ANTISERUM Soro anti-DHT coelho liofilizado com azida sódica (<0.1%)	1 viales Liofilizados	Azul	Reconstituir com 10,2 ml de tampão
Ag ^{125}I MARCADOR: DHT ^{125}I marcado em um tampão á base de proteína com azida sódica (<0.1%)	1 vial 10,5 ml 185 kBq	Vermelho	Pronto a utilizar
PEG Anti-coelho gamaglobulina produzida em carneiro num tampão contendo polietileno glicol e azida sódica (<0.1%)	1 vial 105 ml	Verde	Pronto a utilizar Misture bem, com o uso de um agitador magnético antes da utilização
KMnO4 Solução de permanganato de potássio	1 vial 50 ml	Preto	Pronto a utilizar
BUF Tampão fosfato 0,1 M solução salina tamponada com azida sódica (<0.1%)	1 vial 100 ml	Preto	Pronto a utilizar
CAL Calibrador : Solução etanólica, contendo 100 ng/ml de DHT.	1 vial	Amarelo	Preparação da curva padrão: referem-se a VII B.
CONTROL N Controles : DHT em tampão contendo azida sódica (<0.1%)	2 viales Liofilizados	Prateado	Reconstituir com 2 ml de água. As concentrações exatas são indicadas nos rótulos

VI. MATERIAL NÃO FORNECIDO

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

1. Água destilada
2. Pipetas automáticas de: 100 µl, 200 µl, 500 µl e 1 ml (recomenda-se o uso de pipetas adequadas com pontas descartáveis)
3. Misturador vortex
4. Agitador magnético
5. Banho -maria a 37°C
6. Tubos de vidro 12 x 75 mm
7. Sistema de aspiração (opcional)
8. Centrífuga refrigerada com capacidade de 1800 g.
9. Hexano HPLC
10. Etanol HPLC
11. Qualquer contador gama com capacidade para medir ^{125}I pode ser utilizado (alcance mínimo 70%).

VII. PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

- A. Controles:** Reconstitua os controles com 2 ml de água destilada. Permita 15 minutos para a reconstituição, misture delicadamente para evitar a formação de espuma. **Os controles não necessitam ser extraídos ou oxidado.**

B. Preparação da curva padrão :

Prepare as seguintes diluições para obter a curva:

Calibrador	Conc (pg/ml)	Calibrador (ml)	Tampão (ml)
C7	2500	Stock cal: 0,1	3,9
C6	1000	Stock cal: 0,1	9,9
C5	500	C6: 1,0	1,0
C4	200	C6: 0,2	0,8
C3	100	C6: 0,1	0,9
C2	50	C6: 0,1	1,9
C1	25	C2: 0,5	0,5

O tampão serve como calibrador "0". Armazenar os calibradores de 2-8°C por até 12 semanas.

- C. Antisero:** reconstituir o frasco com 10,2 ml de tampão.

VIII. CONSERVAÇÃO E PRAZO DE VALIDADE DOS REAGENTES

- Antes de serem abertos ou reconstituídos todos os componentes do kit são estáveis até ao final do prazo de validade, indicado no rótulo, desde que mantidos entre 2-8°C.
- Após a reconstituição, os controles são estáveis por durante 12 semanas de 2 a 8°C. Para períodos mais longos de armazenamento, devem ser feitas alíquotas e mantidas a -20°C durante 3 meses.
- Calibradores recentemente preparados são estáveis por até 12 semanas a 2-8°C.
- Após a 1ª utilização, o marcador é estável até ao final do prazo de validade, desde que mantido no recipiente original bem fechado, entre 2 a 8°C
- As alterações na aparência física dos reagentes do kit podem indicar instabilidade ou degradação.

IX. RECOLHA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

- As amostras de soro ou plasma devem ser mantidas entre 2-8°C.
- Se o teste não for executada dentro de 48 horas, o armazenamento a -20°C é recomendado.
- Evitar o congelamento e descongelamento sucessivos.

X. PROCEDIMENTO

A. Notas de manipulação

Não utilize o kit ou os seus componentes após a expiração do prazo de validade.
Não misture componentes de lotes diferentes.
Antes de utilizar todos os reagentes devem estar à temp. ambiente.
Misture completamente os reagentes e as amostras com agitação ou rotação suaves.
O reagente PEG deve ser misturado a temperatura ambiente com a utilização de um agitador magnético, pelo menos, 10 minutos antes de usar.

Para evitar contaminações cruzadas, use uma pipeta com ponta descartável para a adição de cada reagente e amostra. As pipetas de precisão elevada ou a pipetagem automática vão aumentar a precisão.
Respeite os tempos de incubação.
Prepare uma curva padrão para cada análise e não utilize dados de análises anteriores.

B. Extração das amostras:

Não realizar este procedimento nos calibradores e nos controles!

1. Pegue **300 µl** (medição em duplicada), de soro ou plasma em tubos de vidro.
2. Adicionar **600 µl** de KMnO4.
3. Vortexizar cerca de **2 x 10 segundos**.
4. Incubar durante **15 minutos** à temperatura ambiente (18-25°C).
5. Adicionar **3 ml** de uma mistura de hexano / etanol (98:2 v/v).
6. Tampar os tubos e agitar **3 x 30 segundos (não use um vórtex!)**.
7. Centrífugar a **1800 g** durante **5 minutos** à temperatura ambiente.
8. Para cada amostra, preparar e identificar dois tubos de vidro.
9. Transferir **1 ml** da camada orgânica superior para **cada tubo em duplicada** e deixar evaporar até secar, preferencialmente sob uma corrente de ar ou de nitrogênio.

10. Adicionar **200 µl** de tampão para cada tubo. Vortexizar **30 segundos**. Incubar durante **20 minutos** à temperatura ambiente. Vortexizar de novo durante **30 segundos**.
11. As amostras estão prontas para a determinação RIA.

C. RIA teste

- Preparar e identificar tubos (em duplicada) para: Contagem total, não específicos de ligação (NSB), calibradores e controles. Use o mesmo modelo ou tubos que aqueles que contêm as amostras extraídas (X.B.8.)
- Adicionar **100 µl** de cada calibrador (incluindo 100 µl de tampão no calibrador 0) e **100 µl** de cada controle nos seus respectivos tubos.
- Adicionar **100 µl** de tampão para cada tubo de calibrador ou de controle. (Adicionar 300 µl de tampão em tubos NSB)
- Adicionar **100 µl** de antisoro para cada tubo (calibradores, controles, amostras). Não adicione antisoro em contagens totais e tubos NSB.
- Adicionar **100 µl** de marcador I¹²⁵ em todos os tubos.
- Misture bem, cubra com uma folha filme, e incube durante **30 minutos a 37°C** em banho maria.
- Adicionar **1 ml** de reagente PEG a todos os tubos exceto a contagens totais. **O reagente PEG deve ser cuidadosamente misturado antes da utilização com um agitador magnético.**
- Incubar à temperatura ambiente durante 20 minutos.
- Centrifugar a **1800 g, a 4-12°C, durante pelo menos 20 minutos**.
- Aspirar ou decantar o sobrenadante por inversão dos tubos. Seque os para remover qualquer líquido restante.
- Contagem dos tubos durante um minuto num contador gama.

XI. CÁLCULO DOS RESULTADOS

- Calcule a cpm média das determinações em duplicada.
- Calcular a radioatividade ligada, como uma percentagem da ligação determinada no ponto de calibração zero (0) De acordo com a seguinte fórmula :

$$B/B_0 (\%) = \frac{\text{cpm (Calibrador y amostra)} - \text{cpm NSB}}{\text{cpm (Zero Calibrador)} - \text{cpm NSB}} \times 100$$

- Utilizando 3 ciclo semi-logarítmicos ou papel quadriculado, plote (B/B₀(%)) os valores para cada ponto do calibrador como uma função da concentração de DHT de cada ponto de calibrador, rejeitar os valores discrepante óbvias.
- Métodos feitos por computador também podem ser usados para construir a curva de calibração Se o processamento dos resultados for automático, é recomendado um ajustamento de curvas de função logística de 4 parâmetros
- Por interpolação de valores da amostra (B/B₀(%)), determine as concentrações de DHT das amostras a partir da curva de referência.
- Para cada ensaio, a percentagem do marcador total ligada na ausência de DHT não marcado (B₀/T) deve ser verificada.

XII. DADOS TÍPICOS

Os dados seguintes servem apenas como exemplo e nunca devem ser utilizados em vez da curva de calibração executada em tempo real.

DHT-RIA	cpm	B/B ₀ (%)
Contagem Total	72265	
NSB	2391	3,3
Calibrador		
0,0 pg/ml	30453	100,0
25,0 pg/ml	26395	86,7
50,0 pg/ml	23457	77,0
100,0 pg/ml	19476	63,9
200,0 pg/ml	14909	49,0
500,0 pg/ml	9639	31,7
100,0 pg/ml	7180	23,6
2500,0 pg/ml	4568	15,0

XIII. DESEMPENHO E LIMITAÇÕES

A. Limite da detecção

Vinte calibradores zero foram analisados com um conjunto de outros calibradores..

O limite de detecção, definido como a aparente concentração de dois desvios padrão abaixo das contagens média, na ligação zero, foi de 20 pg/ml.

B. Especificidade

Componente	Reação-cruzada (%)
DHT	100,000
Testosterona (após oxidação)	0,100
Estriol	0,030
Estradiol	0,005
Progesterona	0,004

C. Precisão

INTRA-ENSAIO

INTER-ENSAIO

Soro	N	Média (pg/ml)	CV (%)	Soro	N	Média (pg/ml)	CV (%)
A	10	159,3	6,0	A	12	60,5	18,6
B	10	411,6	4,8	B	12	201,4	12,3
C	10	700,1	4,8	C	12	653,9	8,7

D. Exactidão

TESTE DE DILUIÇÃO

Soro	Diluição	Conc. teórico. (pg/ml)	Conc. medida (pg/ml)
1	1/1	-	737,0
	1/2	369,0	373,4
	1/4	184,0	192,5
	1/8	92,0	88,0
	1/16	46,0	52,1

Amostras foram diluídas com tampão.

TESTE DE RECUPERAÇÃO

Adicionado DHT pg/ml	Conc. teórico. (pg/ml)	Recuperado DHT (pg/ml)	Recuperação (%)
0,0	-	311,1	-
50,0	180,5	185,1	102,5
100,0	205,5	210,5	102,4
200,0	255,6	260,4	101,9
500,0	405,6	429,5	105,9
1000,0	655,6	672,8	102,6

XIV. CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO

- Se os resultados obtidos para o Controlo 1 e/ou 2 não se situarem dentro do intervalo especificado no rótulo do recipiente, os resultados não podem ser usados, sem que haja uma explicação satisfatória para a discrepância verificada.
- Se tal for desejável, cada laboratório pode fazer os seus pools de amostras de controlo, que devem ser mantidas na forma de alíquotas congeladas. Não congelar e descongelar mais do que duas vezes.
- Os critérios de aceitação para a diferença entre os resultados duplos das amostras devem basear-se nas Boas Práticas Laboratoriais

XV. INTERVALOS DE REFERÊNCIA

Estes valores são dados apenas a título de referência. Cada laboratório deverá estabelecer o seu próprio intervalo normal de valores.

Machos			
	Número de assuntos	Mediana pg/ml	Escala de 5 a 95 percentis pg/ml
<12 anos	30	23,4	12,4 - 48,6
12-18 anos	30	212,1	50,3 - 542,4
18-39 anos	71	356,3	208,2 - 559,2
>39 anos	29	331,4	185,1 - 547,6
Mulheres			
	Número de assuntos	Mediana pg/ml	Escala de 5 a 95 percentis pg/ml
Fase folicular	41	97,2	40,8 - 168,3
Fase lútea	14	123	80,3 - 177
>60 anos	28	45,8	16,2 - 106,2

XVI. AVISOS E PRECAUÇÕES

Segurança

Para utilização em diagnóstico *in vitro*.

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

Este produto radioactivo pode ser transferido para e utilizado apenas por pessoas autorizadas; a aquisição, conservação, uso e troca de produtos radioactivos está sujeita a legislação nacional. Em caso algum este produto poderá ser administrado a seres humanos ou a animais.

Toda a manipulação de material radioactivo deve ser executado em área própria longe de locais de passagem. Deve ser mantido no laboratório um livro de notas (log book) para a recepção e conservação dos materiais radioactivos. O equipamento de laboratório contaminado e as substâncias perigosas devem ser eliminadas e separadas para evitar contaminação por diferentes isótopos.

Quaisquer derrames de material radioactivo devem ser imediatamente limpos de acordo com os procedimentos de rádio-segurança. O lixo radioactivo deve ser descartado de acordo com a legislação local e com as directrizes vigentes. A adesão às regras básicas de segurança com material radioactivo confere a protecção adequada.

Todos os produtos animais e derivados foram recolhidos a partir de animais saudáveis. Os componentes bovinos são oriundos de países onde não foram notificados casos de BSE. No entanto os componentes com substâncias animais devem ser tratados como potencialmente infecciosos.

Evitar contacto com a pele, olhos e mucosas (azida sódica como conservante). A azida sódica pode reagir com as canalizações de chumbo ou cobre formando azidas metálicas altamente explosivas. Portanto, deixar fluir água em abundância nos tubos durante a eliminação de líquidos para prevenir a acumulação de azidas.

Etanol: o calibrador contém etanol, que é altamente inflamável.

KMnO₄: este componente é perigoso em caso de contacto com a pele ou olhos (irritante), de ingestão, de inalação. Em caso de contacto com a pele, lave imediatamente com água. Em caso de contacto com os olhos, remova as lentes de contacto, e lave os olhos com água em abundância. Procure imediatamente um médico.

Não fume, beba, coma ou aplique cosméticos na área de trabalho. Não pipete pela boca. Use vestuário de protecção e luvas descartáveis.

XVII. BIBLIOGRAFIA

1. Miller WL: Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocrin Rev* 9:295-318, 1988.
2. Pang S, Riddick L: Hirsutism. IN Lifshitz F: *Pediatric Endocrinology, A Clinical Guide, second edition*. Marcel Dekker, New York, 1990, pp. 259-291.
3. Wilson JD: Syndromes of androgen resistance. *Biol Reprod* 46:168-173, 1992.
4. Yalow R, Berson S: Introduction and general considerations. IN: Odell WD, Doughday WH (eds): *Principles of Competitive Protein Binding Assays*. J. B. Lippincott Co., Philadelphia, 1971, pp. 1-19.
5. Burtis CA, Ashwood ER: *Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 2nd edition*. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1994, p.1821.

XVIII. RESUMO DO PROTOCOLO

	CONTAGENS TOTALS	NSB	Calibrador (0-7)	Controlos	Amostras (extraídas)
Calibrador	-	-	100 µl	-	-
Controlos	-	-	-	100 µl	-
Amostras (extraídas)	-	-	-	-	200 µl
Tampão	-	300 µl	100 µl	100 µl	-
Antisoro	-	-	100 µl		
125I Marcador	100 µl				
30 min a 37°C (banho maria)					
PEG	-	1 ml			
Mix e incube 20 min a temp amb.					
Centrifuge pelo menos 20 min (1800 g; 4 - 12 °C)					
Aspire (ou decante); Conte durante 60 segundos no contador gama					