

CE

DHT-RIA

KIPI9900

LOT : 120418/2



en

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 : KIPI9900 : 100 tests
- C. Manufactured by : DIAsource ImmunoAssays S.A.

III. CLINICAL BACKGROUND

A Biological activities of 5 α -Dihydrotestosterone

5 α -Dihydrotestosterone (DHT; 17 β -Hydroxy-5 α -androstan-3-one), the most potent naturally-occurring androgen, is produced from testosterone through the action of cholestenone 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 -androstanediol and 3 α -androstanediol 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 oxydation / 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 10.2 ml Lyophilized	Blue	Reconstitute with 10.2 ml of buffer
Ag 125I TRACER: ^{125}I 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
BUF 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 μ l, 200 μ l, 500 μ l 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 conical propylene tubes
7. 12 x 75 mm glass tubes.
8. Aspiration system (optional)
9. Refrigerated centrifuge capable of 1800 g.
10. Hexane HPLC grade
11. Ethanol HPLC grade
12. Any gamma counter capable of measuring ^{125}I 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 μ l (duplicate measurement) of serum or plasma in **glass** tubes.
2. Add 600 μ l 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 polypropylene or 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 μ l** 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 μ l** of each calibrator (including 100 μ l of buffer as calibrator 0) and **100 μ l** of each control into their respective tubes.
3. Add **100 μ l** of buffer into each calibrator or control tube. (Add 300 μ l of buffer into NSB tubes)
4. Add **100 μ l** 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		
Calibrator		
0.0 pg/ml	2391	3.3
25.0 pg/ml	30453	100.0
50.0 pg/ml	26395	86.7
100.0 pg/ml	23457	77.0
200.0 pg/ml	19476	63.9
500.0 pg/ml	14909	49.0
1000.0 pg/ml	9639	31.7
2500.0 pg/ml	7180	23.6
	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.

	Concentration range (pg/ml)
Normal males Pre puberty Males	< 50 250 - 800
Normal Females Follicular phase Luteal phase Menopausal	50 - 200 100 - 300 < 100

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 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.

XVIII. SUMMARY OF THE PROTOCOL

	Total count	NSB	Calibrator (0-7)	Controls	Samples (extracted)
Calibrator	-	-	100 μl	-	-
Controls	-	-	-	100 μl	-
Sample (extracted)	-	-	-	-	200 μl
Buffer	-	300 μl	100 μl	100 μl	-
Antiserum	-	-	100 μl		
125I Tracer			100 μl		
			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		

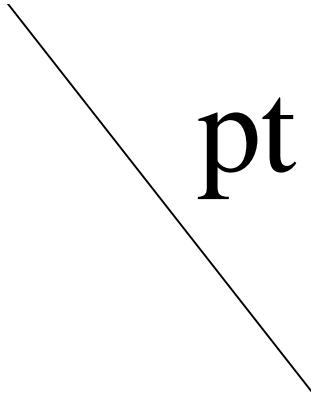
DIAsource Catalogue Nr : KIP1990	P.I. Number : 1701100/en	Revision nr : 120418/1
-------------------------------------	-----------------------------	---------------------------

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.

€

pt



IV. PRINCIPIOS 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 10,2 ml Liofilizados	Azul	Reconstituir com 10,2 ml de tampão
Ag ^{125}I MARCADOR: DHT ^{125}I marcado em um tampão á base ade proteína com azida sódica (<0.1%)	1 vial 10,5 ml 185 kBq	Vermelho	Pronto a utilizar
PEG Anti-coelho gammaglobulina 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 potassio	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 Controlos : 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:

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

VII. PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

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

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. Antisoro:** 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 controlos são estáveis por durante 12 semanas de 2 a 8°C. Para períodos mais longos de armazenamento, devem ser feitas aliquotas 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 controlos!

- Pegue **300 μl** (medição em duplicada), de soro ou plasma em tubos de vidro.
- Adicionar **600 μl** de KMnO4.
- Vortexizar cerca de **2 x 10 segundos**.
- Incubar durante **15 minutos** à temperatura ambiente (18-25°C).
- Adicionar **3 ml** de uma mistura de hexano / etanol (98:2 v/v).
- Tampar os tubos e agitar **3 x 30 segundos (não use um vórtex!)**.
- Centrifugar a **1800 g** durante **5 minutos** à temperatura ambiente.
- Para cada amostra, preparar e identificar dois tubos de polipropileno ou de vidro.
- 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 nitrogénio.
- Adicionar **200 μl** de tampão para cada tubo. Vortexizar **30 segundos**. Incubar durante **20 minutos** à temperatura ambiente. Vortexizar de novo durante **30 segundos**.
- 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 soro para cada tubo (calibradores, controles, amostras). Não adicione soro em contagens totais e tubos NSB.
- Adicionar **100 µl** de marcador I^{125} 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: :

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

- 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
	25,0 pg/ml	26395
	50,0 pg/ml	23457
	100,0 pg/ml	19476
	200,0 pg/ml	14909
	500,0 pg/ml	9639
	100,0 pg/ml	7180
	2500,0 pg/ml	4568

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

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.

	Alcance de concentração (pg/ml)
Homens normais Pré-puberdade Homens	< 50 250 - 800
Mulheres normais Fase folicular Fase lutea Menopausa	50 - 200 100 - 300 < 100

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 acordos 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 contato com a pele ou olhos (irritante), de ingestão, de inalação. Em caso de contato com a pele, lave imediatamente com água. Em caso de contato com os olhos, remova as lentes de contato, e lave os olhos com água em abundância. Procure imediatamente um medico.

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

XVII. BIBLIOGRAFIA

- Miller WL: Molecular biology of steroid hormone synthesis. Endocrin Rev 9:295-318, 1988.
- Pang S, Riddick L: Hirsutism. IN Lifshitz F: *Pediatric Endocrinology, A Clinical Guide, second edition*. Marcel Dekker, New York, 1990, pp. 259-291.
- Wilson JD: Syndromes of androgen resistance. Biol Reprod 46:168-173, 1992.
- 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.
- Burtis CA, Ashwood ER: *Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 2nd edition*. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1994, p.1821.

XVIII. RESUMO DO PROTOCOLO

	CONTAG ENS 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									
^{125}I 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												

Nº de catalogo DIAsource: KIP1990	Nº de P.I.: 1701100/pt	Nº de revisão: 120418/1
--------------------------------------	---------------------------	----------------------------

			<u>Used symbols</u>	
			Consult instructions for use	
			Storage temperature	
			Use by	
			Batch code	
			Catalogue number	
			Control	
			In vitro diagnostic medical device	
			Manufacturer	
			Contains sufficient for <n> tests	
	WASH	SOLN	CONC	Wash solution concentrated
	CAL	0		Zero calibrator
	CAL	N		Calibrator #
	CONTROL	N		Control #
	Ag	125I		Tracer
	Ab	125I		Tracer
	Ag	125I	CONC	Tracer concentrated
	Ab	125I	CONC	Tracer concentrated
			Tubes	
	INC	BUF		Incubation buffer
			ACETONITRILE	Acetonitrile
			SERUM	Serum
	DIL	SPE		Specimen diluent
	DIL	BUF		Dilution buffer
			ANTISERUM	Antiserum
			IMMUNOABSORBENT	Immunoabsorbent
	DIL	CAL		Calibrator diluent
	REC	SOLN		Reconstitution solution
			PEG	Polyethylene glycol
	EXTR	SOLN		Extraction solution
	ELU	SOLN		Elution solution
			GEL	Bond Elut Silica cartridges
	PRE	SOLN		Pre-treatment solution
	NEUTR	SOLN		Neutralization solution
	TRACEUR	BUF		Tracer buffer
			MULT	Microtiterplate
	Ab	HRP		HRP Conjugate
	Ag	HRP		HRP Conjugate
	Ab	HRP	CONC	HRP Conjugate concentrate
	Ag	HRP	CONC	HRP Conjugate concentrate
	CONJ	BUF		Conjugate buffer
	CHROM	TMB	CONC	Chromogenic TMB concentrate
	CHROM	TMB		Chromogenic TMB solution
	SUB	BUF		Substrate buffer
	STOP	SOLN		Stop solution
	INC	SER		Incubation serum
			BUF	Buffer
	Ab	AP		AP Conjugate
	SUB	PNPP		Substrate PNPP
	BIOT	CONJ	CONC	Biotin conjugate concentrate
	AVID	HRP	CONC	Avidine HRP concentrate
	ASS	BUF		Assay buffer
	Ab	BIOT		Biotin conjugate
	Ab			Specific Antibody
	SAV	HRP	CONC	Streptavidin HRP concentrate
	NSB			Non-specific binding
	2nd Ab			2nd Antibody
	ACID	BUF		Acidification Buffer
	DIST			Distributor
	TRAY			Incubation trays
			PMSF	PMSF solution
				Protect from light
			STRIP	Dot Strip
			SUB	Substrate
			EXTR SOLN CONC	Extraction Buffer Concentrate
	CART			Cartridge
	SAV	HRP		Streptavidin HRP
	WASH	SOLN		Wash buffer

Símbolos utilizados	
	Consulte instruções de utilização
	Temperatura de conservação
	Utilizar antes de
LOT	Código de lote
REF	Número de catálogo
CONTROL	Controlo
IVD	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro
	Fabricante
	Conteúdo suficiente para <n> testes
	Solução de lavagem concentrada
	Calibrador zero
	Calibrador #
	Controlo #
	Marcador
	Marcador
	Marcador concentrada
	Marcador concentrada
	Tubos
	Tampão de incubação
	Acetonitrilo
	Soro
	Diluidor de espécimes
	Tampão de diluição
	Anti-soro
	Imunoabsorvente
	Diluente do calibrador
	Solução de Reconstituição
	Polietileno-glicol
	Solução de Extracção
	Solução de Eluição
	Cartuchos de silica Bond Elut
	Solução de pré-tratamento
	Solução de neutralização
	Tampão Marcador
	Placa de micro titulação
	HRP Conjugação
	HRP Conjugação
	HRP Conjugação concentrada
	HRP Conjugação concentrada
	Conjugue o tampão
	Cromogénica TMB concentrada
	Solução Cromogénica TMB
	Tampão de substrato
	Solução de Paragam
	Soro de incubação
	Tampão
	AP Conjugação
	Substrato PNPP
	Concentrado conjugado de biotina
	Concentrado HRP de avidina
	Tampão de ensaio
	Conjugado de biotina
	Anticorpo específico
	Esteptavidina HRP concentrado
	Ligações não específicas
	Anticorpo secundário
	Tampão de acidificação
	Distribuidor
	Bandeja de incubação
	Solução PMSF
	Proteger da luz
	Tira "Dot"
	Substrato
	Tampão de extração concentrado
	Cartucho
	Esteptavidina HRP
	Tampão de lavagem