

CE



DATA SHEET

DHT-RIA

KIPI9900



Gentaur Molecular Products
Voortstraat 49
1910 Kampenhout, BELGIUM

Tel 0032 16 58 90 45 | Fax 0032 16 50 90 45
www.gentaur-worldwide.com
info@gentaur.com

LOT : 120418/2

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.

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 10.2 ml 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
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:

- Distilled water
- Pipettes for delivery of: 100 µl, 200 µl, 500 µl and 1 ml (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
- Vortex mixer
- Magnetic stirrer
- Water bath at 37°C
- 12 x 75 mm conical propylene tubes
- 12 x 75 mm glass tubes.
- Aspiration system (optional)
- Refrigerated centrifuge capable of 1800 g.
- Hexane HPLC grade
- Ethanol HPLC grade
- 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 !

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

C. RIA test

- 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.)
- Add **100 µl** of each calibrator (including 100 µl of buffer as calibrator 0) and **100 µl** of each control into their respective tubes.
- Add **100 µl** of buffer into each calibrator or control tube. (Add 300 µl of buffer into NSB tubes)
- 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/B ₀ (%)
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.

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

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 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 : KIP19900	P.I. Number : 1701100/en	Revision nr : 120418/1
--------------------------------------	-----------------------------	---------------------------

CE

pt



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 sodica (<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 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 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:

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 polipropileno conicos 12 x 75 mm
7. Tubos de vidro 12 x 75 mm
8. Sistema de aspiração (opcional)
9. Centrifuga refrigerada com capacidade de 1800 g.
10. Hexano HPLC
11. Etanol HPLC
12. 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 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 controlos 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 controlos!

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. Centrifugar a **1800 g** durante **5 minutos** à temperatura ambiente.
8. Para cada amostra, preparar e identificar dois tubos de polipropileno ou 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 nitrogénio.
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

1. 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.)
2. Adicionar **100 µl** de cada calibrador (incluindo 100 µl de tampão no calibrador 0) e **100 µl** de cada controle nos seus respectivos tubos.
3. Adicionar **100 µl** de tampão para cada tubo de calibrador ou de controle. (Adicionar 300 µl de tampão em tubos NSB)
4. Adicionar **100 µl** de soro para cada tubo (calibradores, controles, amostras). Não adicione soro em contagens totais e tubos NSB.
5. Adicionar **100 µl** de marcador I¹²⁵ em todos os tubos.
6. Misture bem, cubra com uma folha filme, e incube durante **30 minutos a 37°C** em banho maria.
7. 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.**
8. Incubar à temperatura ambiente durante 20 minutos.
9. Centrifugar a **1800 g, a 4-12°C, durante pelo menos 20 minutos.**
10. Aspirar ou decantar o sobrenadante por inversão dos tubos. Seque os para remover qualquer líquido restante.
11. Contagem dos tubos durante um minuto num contador gama.

XI. CÁLCULO DOS RESULTADOS

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

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

3. 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.
4. 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
5. Por interpolação de valores da amostra (B/B₀(%)), determine as concentrações de DHT das amostras a partir da curva de referência.
6. 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.

	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 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 TOTAIS	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					

Nº de catalogo DIAsource: KIPI9900	Nº de P.I.: 1701100/pt	Nº de revisão: 120418/1
---------------------------------------	---------------------------	----------------------------

	Used symbols
	Consult instructions for use
	Storage temperature
	Use by
LOT	Batch code
REF	Catalogue number
CONTROL	Control
I V D	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
IMMUNOADSORBENT	Immunoabsorbent
DIL CAL	Calibrator diluent
REC SOLN	Reconstitution solution
PEG	Polyethylene glycol
EXTR SOLN	Extraction solution
ELU SOLN	Elution solution
GEL	Bond Elut Silica cartridges
PRE SOLN	Pre-treatment solution
NEUTR SOLN	Neutralization solution
TRACEUR BUF	Tracer buffer
U L I	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
WASH SOLN CONC	Solução de lavagem concentrada
CAL 0	Calibrador zero
CAL N	Calibrador #
CONTROL N	Controlo #
Ag 125I	Marcador
Ab 125I	Marcador
Ag 125I CONC	Marcador concentrada
Ab 125I CONC	Marcador concentrada
	Tubos
INC BUF	Tampão de incubação
ACETONITRILE	Acetonitrilo
SERUM	Soro
DIL SPE	Diluidor de espécimes
DIL BUF	Tampão de diluição
ANTISERUM	Anti-soro
IMMUNOADSORBENT	Imunoadsorvente
DIL CAL	Dilute do calibrador
REC SOLN	Solução de Reconstituição
PEG	Poliétileno-glicol
EXTR SOLN	Solução de Extração
ELU SOLN	Solução de Eluição
GEL	Cartuchos de sílica Bond Elut
PRE SOLN	Solução de pré-tratamento
NEUTR SOLN	Solução de neutralização
TRACEUR BUF	Tampão Marcador
ULI	Placa de micro titulação
Ab HRP	HRP Conjugação
Ag HRP	HRP Conjugação
Ab HRP CONC	HRP Conjugação concentrada
Ag HRP CONC	HRP Conjugação concentrada
CONJ BUF	Conjuge o tampão
CHROM TMB CONC	Cromogénica TMB concentrada
CHROM TMB	Solução Cromogénica TMB
SUB BUF	Tampão de substrato
STOP SOLN	Solução de Paragem
INC SER	Soro de incubação
BUF	Tampão
Ab AP	AP Conjugação
SUB PNPP	Substrato PNPP
BIOT CONJ CONC	Concentrado conjugado de biotina
AVID HRP CONC	Concentrado HRP de avidina
ASS BUF	Tampão de ensaio
Ab BIOT	Conjugado de biotina
Ab	Anticorpo específico
SAV HRP CONC	Estreptavidina HRP concentrado
NSB	Ligações não específicas
2nd Ab	Anticorpo secundário
ACID BUF	Tampão de acidificação
DIST	Distribuidor
TRAY	Bandeja de incubação
PMSF	Solução PMSF
	Proteger da luz
STRIP	Tira " Dot"
SUB	Substrato
EXTR SOLN CONC	Tampão de extração concentrado
CART	Cartucho
SAV HRP	Estreptavidina HRP
WASH SOLN	Tampão de lavagem