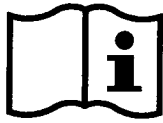


# Product information

Information about other products is available at: [www.demeditec.com](http://www.demeditec.com)

de  
medi  
tec

EN ISO 9001  
certified company



## User's Manual

# 5 $\alpha$ -Androstane-3 $\alpha$ , 17 $\beta$ -diol- Glucuronide Direct ELISA

Enzyme Immunoassay for the quantitative determination of 5 $\alpha$   
Androstane-3 $\alpha$ , 17 $\beta$ -diol-Glucuronide (3 $\alpha$  Diol G) in human serum

IVD



REF DE4192



96

**Please use only the valid version of the package insert provided with the kit.  
 Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Arbeitsanleitung.  
 Si prega di usare la versione valida dell'inserto del pacco a disposizione con il kit.  
 Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.**

**Table of Contents / Inhaltsverzeichnis / Tabella die Contenuti / Tabla de Contenidos**

1	INTENDED USE .....	3
2	PRINCIPLE OF THE TEST .....	3
3	CLINICAL APPLICATIONS .....	3
4	PROCEDURAL CAUTIONS AND WARNINGS .....	4
5	LIMITATIONS .....	4
6	SAFETY CAUTIONS AND WARNINGS .....	4
7	SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE .....	5
8	REAGENTS AND EQUIPMENT NEEDED BUT NOT PROVIDED .....	5
9	REAGENTS PROVIDED .....	5
10	ASSAY PROCEDURE .....	7
11	CALCULATIONS .....	7
12	PERFORMANCE CHARACTERISTICS .....	8
13	EXPECTED NORMAL VALUES .....	9
1	VERWENDUNGSZWECK .....	10
2	TESTPRINZIP .....	10
3	KLINISCHE ANWENDUNG .....	10
4	VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE .....	11
5	GRENZEN DES TESTS .....	11
6	SICHERHEITSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE .....	12
7	PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG .....	12
8	ERFORDERLICHE MATERIALIEN UND GERÄTE (NICHT IM KIT ENTHALTEN) .....	12
9	ENTHALTENE REAGENZIEN .....	12
10	TESTDURCHFÜHRUNG .....	14
11	BERECHNUNG .....	14
12	TESTCHARAKTERISTIKA .....	15
13	ZU ERWARTENDE NORMALWERTE .....	15
1	USO PREVISTO .....	16
2	PRINCIPIO DE LA PRUEBA .....	16
3	APLICACIONES CLÍNICAS .....	16
4	PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS PARA EL PROCEDIMIENTO .....	17
5	LIMITACIONES .....	17
6	PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS DE SEGURIDAD .....	18
7	OBTENCIÓN DE MUESTRAS Y ALMACENAMIENTO .....	18
8	REACTIVOS Y EQUIPAMIENTO NECESARIO PERO NO INCLUIDO .....	18
9	REACTIVOS INCLUIDOS .....	18
10	PROCEDIMIENTO DE ENSAYO .....	20
11	CÁLCULOS .....	20
12	CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO .....	21
13	VALORES NORMALES ESPERADOS .....	22
14	REFERENCES / LITERATURE / LITERATUR / REFERENCIAS .....	23
	SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS .....	24

## 1 INTENDED USE

For the direct quantitative determination of 3 $\alpha$  Diol G by enzyme immunoassay in human serum. For in vitro diagnostic use only.

## 2 PRINCIPLE OF THE TEST

The principle of the following enzyme immunoassay test follows the typical competitive binding scenario. Competition occurs between an unlabeled antigen (present in standards, controls and patient samples) and an enzyme-labelled antigen (conjugate) for a limited number of antibody binding sites on the microwell plate. The washing and decanting procedures remove unbound materials. After the washing step, the enzyme substrate is added. The enzymatic reaction is terminated by addition of the stopping solution. The absorbance is measured on a microtiter plate reader. The intensity of the colour formed is inversely proportional to the concentration of 3 $\alpha$  Diol G in the sample. A set of standards is used to plot a standard curve from which the amount of 3 $\alpha$  Diol G in patient samples and controls can be directly read.

## 3 CLINICAL APPLICATIONS

5 $\alpha$ -Androstane-3 $\alpha$ , 17 $\beta$ -diol glucuronide is a C19 steroid and is either abbreviated as 3 $\alpha$  Diol G, 5 $\alpha$  Diol G or simply,  $\alpha$  Diol G. It is produced mainly as a metabolite of testosterone and dihydrotestosterone (DHT). It is largely produced in target peripheral tissues such as the skin, especially around hair follicles. The stimulation by large amounts of 3 $\alpha$  Diol G leads to excessive hair formation, notably where hair is not normally present in women. In recent years the interest in the measurement of this steroid has increased among clinical investigators studying women suffering from idiopathic hirsutism. Among the steroids known to be precursors for 3 $\alpha$  Diol G are dehydroepiandrosterone (DHEA), dehydroepiandrosterone sulphate (DHEAS), dihydrotestosterone (DHT), androstenedione and testosterone. Only 3 $\alpha$  Diol G has been shown to increase with hirsutism and decrease with treatment. This correlation has also been demonstrated in patients with polycystic ovarian syndrome (PCO). 3 $\alpha$  Diol G determinations have therefore proved to be a useful indicator in a variety of ways including monitoring the progress of treatment of idiopathic hirsutism and women with PCO. Furthermore, diabetic patients (both men and women) under cyclosporine A therapy have shown increased 3 $\alpha$  Diol G levels, a side effect resulting in the appearance of hair in previously hairless areas.

#### 4 PROCEDURAL CAUTIONS AND WARNINGS

1. Users should have a thorough understanding of this protocol for the successful use of this kit. Reliable performance will only be attained by strict and careful adherence to the instructions provided.
2. Control materials or serum pools should be included in every run at a high and low level for assessing the reliability of results.
3. When the use of water is specified for dilution or reconstitution, use deionized or distilled water.
4. In order to reduce exposure to potentially harmful substances, gloves should be worn when handling kit reagents and human specimens.
5. All kit reagents and specimens should be brought to room temperature and mixed gently but thoroughly before use. Avoid repeated freezing and thawing of reagents and specimens.
6. A calibrator curve must be established for every run.
7. The controls should be included in every run and fall within established confidence limits.
8. Improper procedural techniques, imprecise pipetting, incomplete washing as well as improper reagent storage may be indicated when assay values for the controls do not reflect established ranges.
9. When reading the microplate, the presence of bubbles in the microwells will affect the optical densities (ODs). Carefully remove any bubbles before performing the reading step.
10. The substrate solution (TMB) is sensitive to light and should remain colourless if properly stored. Instability or contamination may be indicated by the development of a blue colour, in which case it should not be used.
11. The assay buffer is sensitive to light and should be stored in the original dark bottle away from direct sunlight.
12. When dispensing the substrate and stopping solution, do not use pipettes in which these liquids will come into contact with any metal parts.
13. To prevent contamination of reagents, use a new disposable pipette tip for dispensing each reagent, sample, standard and control.
14. Do not mix various lot numbers of kit components within a test and do not use any component beyond the expiration date printed on the label.
15. Kit reagents must be regarded as hazardous waste and disposed of according to national regulations.

#### 5 LIMITATIONS

1. All the reagents within the kit are calibrated for the direct determination of 3 $\alpha$  Diol G in human serum. The kit is not calibrated for the determination of 3 $\alpha$  Diol G in saliva, plasma or other specimens of human or animal origin.
2. Do not use grossly hemolyzed, grossly lipemic, icteric or improperly stored serum.
3. Any samples or control sera containing azide or thimerosal are not compatible with this kit, as they may lead to false results.
4. Only calibrator A may be used to dilute any high serum samples. The use of any other reagent may lead to false results.
5. The results obtained with this kit should never be used as the sole basis for a clinical diagnosis. For example, the occurrence of heterophilic antibodies in patients regularly exposed to animals or animal products has the potential of causing interferences in immunological tests. Consequently, the clinical diagnosis should include all aspects of a patient's background including the frequency of exposure to animals/products if false results are suspected.

#### 6 SAFETY CAUTIONS AND WARNINGS

##### *POTENTIAL BIOHAZARDOUS MATERIAL*

Human serum that may be used in the preparation of the standards and controls has been tested and found to be non-reactive for Hepatitis B surface antigen and has also been tested for the presence of antibodies to HCV and Human Immunodeficiency Virus (HIV) and found to be negative. However no test method can offer complete assurance that HIV, HCV and Hepatitis B virus or any infectious agents are absent. The reagents should be considered a potential biohazard and handled with the same precautions as applied to any blood specimen.

##### *CHEMICAL HAZARDS*

Avoid contact with reagents containing TMB, hydrogen peroxide and acidic solution. If contacted with any of these reagents, wash with plenty of water. TMB is a suspected carcinogen.

## 7 SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

Approximately 0.2 mL of serum is required per duplicate determination.

Collect 4-5 mL of blood into an appropriately labelled tube and allow it to clot. Centrifuge and carefully remove the serum layer.

Store at 4 °C for up to 24 hours or at -10 °C or lower if the analyses are to be done at a later date.

Consider all human specimens as possible biohazardous materials and take appropriate precautions when handling.

### 7.1 SPECIMEN PRETREATMENT

This assay is a direct system; no specimen pretreatment is necessary.

## 8 REAGENTS AND EQUIPMENT NEEDED BUT NOT PROVIDED

1. Precision pipettes to dispense 50, 100, 150 and 300  $\mu$ L
2. Disposable pipette tips
3. Distilled or deionized water
4. Plate shaker
5. Microwell plate reader with a filter set at 450nm and an upper OD limit of 3.0 or greater\* (see assay procedure step 10).

## 9 REAGENTS PROVIDED

### 1. Rabbit Anti-3 $\alpha$ Diol G Antibody Coated Microwell Plate-Break Apart Wells - Ready To Use.

Contents: One 96 well (12x8) polyclonal antibody-coated microwell plate in a resealable pouch with desiccant.

Storage: Refrigerate at 2 °C - 8 °C

Stability: 12 months or as indicated on label.

### 2. 3 $\alpha$ Diol G-Horseradish Peroxidase (HRP) Conjugate Concentrate – **X50**

Contents: 3 $\alpha$  Diol G-HRP conjugate in a protein-based buffer with a non-mercury preservative.

Volume: 300  $\mu$ L/vial

Storage: Refrigerate at 2 °C - 8 °C

Stability: 12 months or as indicated on label.

Preparation: Dilute 1:50 in assay buffer before use (e.g. 40  $\mu$ L of HRP in 2 mL of assay buffer).

If the whole plate is to be used dilute 240  $\mu$ L of HRP in 12 mL of assay buffer.

Discard any that is left over.

### 3. 3 $\alpha$ Diol G Calibrators - Ready To Use.

Contents: Six vials containing 3 $\alpha$  Diol G in a protein-based buffer with a non-mercury preservative.

Prepared by spiking buffer with a defined quantity of 3 $\alpha$  Diol G.

\*Listed below are approximate concentrations, please refer to QC data sheet for exact concentrations.

Calibrator	Concentration	Volume/Vial
Calibrator A	0 ng/mL	2.0 mL
Calibrator B	0.25 ng/mL	0.6 mL
Calibrator C	1 ng/mL	0.6 mL
Calibrator D	3 ng/mL	0.6 mL
Calibrator E	10 ng/mL	0.6 mL
Calibrator F	50 ng/mL	0.6 mL

Storage: Refrigerate at 2 °C - 8 °C

Stability: 12 months in unopened vials or as indicated on label.

Once opened, the standards should be used within 14 days or aliquoted and stored frozen. Avoid multiple freezing and thawing cycles.

**4. Controls** Ready To Use.

Contents: Two vials containing 3 $\alpha$  Diol G in a protein-based buffer with a non-mercury preservative. Prepared by spiking buffer with defined quantities of 3 $\alpha$  Diol G. Refer to QC data sheet for expected values and acceptable range.

Volume: 0.6 mL/vial

Storage: Refrigerate at 2 °C - 8 °C

Stability: 12 months in unopened vial or as indicated on label.  
Once opened, the controls should be used within 14 days or aliquoted and stored frozen. Avoid multiple freezing and thawing cycles.

**5. Wash Buffer Concentrate - X10**

Contents: One bottle containing buffer with a non-ionic detergent and a non-mercury preservative.

Volume: 50 mL/bottle

Storage: Refrigerate at 2 °C - 8 °C

Stability: 12 months or as indicated on label.

Preparation: Dilute 1:10 in distilled or deionized water before use.  
If the whole plate is to be used dilute 50 mL of the wash buffer concentrate in 450 mL of water.

**6. Assay Buffer** - Ready To Use\*.

Contents: One bottle containing a protein-based buffer with a non-mercury preservative.

Volume: 15 mL/bottle

Storage: Refrigerate at 2 °C - 8 °C

Stability: 12 months or as indicated on label.

*\*Warm to completely dissolve before use.*

**7. TMB Substrate** - Ready To Use.

Contents: One bottle containing tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide in a non-DMF or DMSO containing buffer.

Volume: 16 mL/bottle

Storage: Refrigerate at 2 °C - 8 °C

Stability: 12 months or as indicated on label.

**8. Stopping Solution** - Ready To Use.

Contents: One vial containing 2 N acidic solution.

Volume: 6 mL/vial

Storage: Refrigerate at 2 °C - 8 °C

Stability: 12 months or as indicated on label.

## 10 ASSAY PROCEDURE

### Specimen Pretreatment: *None.*

All reagents must reach room temperature before use. Calibrators, controls and specimen samples should be assayed in duplicate. Once the procedure has been started, all steps should be completed without interruption.

1. Prepare working solutions of the 3 $\alpha$  Diol G-HRP conjugate and wash buffer.
2. Remove the required number of microwell strips. Reseal the bag and return any unused strips to the refrigerator.
3. Pipette 50  $\mu$ L of each calibrator, control and specimen sample into correspondingly labelled wells in duplicate.
4. Pipette 100  $\mu$ L of the conjugate working solution into each well (We recommend using a multichannel pipette).
5. Incubate on a plate shaker (approximately 200 rpm) for 30 minutes at room temperature.
6. Wash the wells 3 times with 300  $\mu$ L of diluted wash buffer per well and tap the plate firmly against absorbent paper to ensure that it is dry (The use of a washer is recommended).
7. Pipette 150  $\mu$ L of TMB substrate into each well at timed intervals.
8. Incubate on a plate shaker for 10-15 minutes at room temperature (or until calibrator A attains dark blue colour for desired OD).
9. Pipette 50  $\mu$ L of stopping solution into each well at the same timed intervals as in step 7.
10. Read the plate on a microwell plate reader at 450 nm within 20 minutes after addition of the stopping solution.

\* If the OD exceeds the upper limit of detection or if a 450 nm filter is unavailable, a 405 or 415 nm filter may be substituted. The optical densities will be lower, however, this will not affect the results of patient/control samples.

## 11 CALCULATIONS

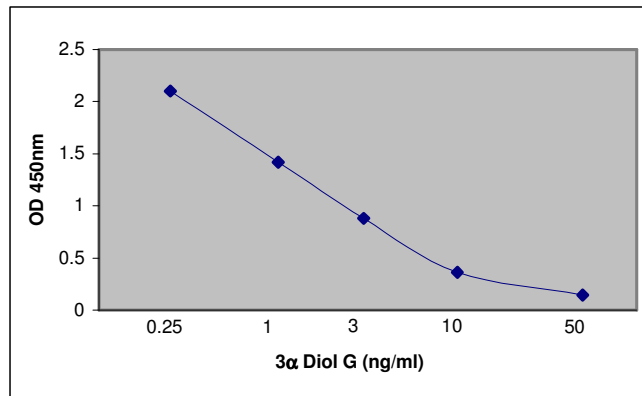
1. Calculate the mean optical density of each calibrator duplicate.
2. Draw a calibrator curve on semi-log paper with the mean optical densities on the Y-axis and the calibrator concentrations on the X-axis. If immunoassay software is being used, a 4-parameter or 5-parameter curve is recommended.
3. Calculate the mean optical density of each unknown duplicate.
4. Read the values of the unknowns directly off the calibrator curve.
5. If a sample reads more than 50 ng/mL then dilute it with calibrator A at a dilution of no more than 1:8. The result obtained should be multiplied by the dilution factor.

### 11.1 TYPICAL TABULATED DATA

Calibrator	OD 1	OD 2	Mean OD	Value (ng/mL)
A	2.480	2.474	2.477	0
B	2.102	2.106	2.104	0.25
C	1.428	1.413	1.421	1
D	0.877	0.883	0.880	3
E	0.360	0.368	0.364	10
F	0.147	0.143	0.145	50
Unknown	0.598	0.596	0.597	5.4

## 11.2 TYPICAL CALIBRATOR CURVE

Sample curve only. **Do not** use to calculate results.



## 12 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### 12.1 SENSITIVITY

The lower detection limit is calculated from the standard curve by determining the resulting concentration of the mean OD of Calibrator A (based on 10 replicate analyses) minus 2 SD. Therefore, the sensitivity of the 3 $\alpha$  Diol G ELISA kit is **0.1 ng/mL**.

### 12.2 SPECIFICITY (CROSS REACTIVITY)

The following compounds were tested for cross-reactivity with the 3 $\alpha$  Diol G ELISA kit with 3 $\alpha$  Diol G cross-reacting at 100%.

Steroid	%Cross Reactivity
3 $\alpha$ Diol G	100
Testosterone	0.2
Progesterone	0.16
Androstenedione	0.14
Cortisol	0.05

The following steroids were tested but cross-reacted at less than 0.01%:

Corticosterone, Dehydroepiandrosterone, Dihydrotestosterone, Epiandrosterone, 17 $\beta$ -Estradiol and Estrone.

### 12.3 INTRA-ASSAY PRECISION

Three samples were assayed ten times each on the same calibrator curve. The results (in ng/mL) are tabulated below:

Sample	Mean	SD	CV%
1	0.87	0.07	7.8
2	6.86	0.49	7.2
3	21.26	1.29	6.0



**12.4 INTER-ASSAY PRECISION**

Three samples were assayed ten times over a period of four weeks. The results (in ng/mL) are tabulated below:

Sample	Mean	SD	CV%
1	0.98	0.10	10.4
2	7.05	0.46	6.5
3	20.92	2.26	10.8

**12.5 RECOVERY**

Spiked samples were prepared by adding defined amounts of 3 $\alpha$  Diol G to three patient serum samples. The results (in ng/mL) are tabulated below:

Sample	Obs. Result	Exp. Result	Recovery%
1 Unspiked	0.67	-	-
+0.5	1.07	1.17	91.4
+5.0	4.99	5.67	88.0
+15.0	12.66	15.67	80.8
2 Unspiked	1.83	-	-
+0.5	2.07	2.33	88.8
+5.0	6.18	6.83	90.5
+15.0	17.64	16.83	104.8
3 Unspiked	12.76	-	-
+0.5	15.32	13.26	115.5
+5.0	19.22	17.76	108.2
+15.0	22.68	27.76	81.7

**12.6 LINEARITY**

Three patient serum samples were diluted with calibrator A. The results (in ng/mL) are tabulated below:

Sample	Obs. Result	Exp. Result	Recovery %
1	6.24	-	-
1:2	2.83	3.12	90.7
1:4	1.55	1.56	99.4
1:8	0.74	0.78	94.9
2	13.55	-	-
1:2	6.00	6.77	88.6
1:4	2.71	3.39	80.0
1:8	1.70	1.64	103.6
3	17.05	-	-
1:2	6.93	8.53	81.2
1:4	4.09	4.26	96.0
1:8	2.34	2.13	109.8

**13 EXPECTED NORMAL VALUES**

As for all clinical assays each laboratory should collect data and establish their own range of expected normal values.

Group	Range (ng/mL)
Males	1.53-14.82
Premenopausal	0.22-4.64
Postmenopausal	0.61-3.71
Puberty (Female)	0.51-4.03

## 1 VERWENDUNGSZWECK

Zur direkten quantitativen Bestimmung von 3 $\alpha$ -Diol-G durch enzymatischen Immunoassay in Humanserum. Nur für In-vitro-Diagnostik.

## 2 TESTPRINZIP

Das Testprinzip des vorliegenden enzymatischen Immunoassays funktioniert nach dem typischen Schema der kompetitiven Bindung. Unmarkierte Antigene (in den Standards, Kontrollen und Patientenproben) konkurrieren mit einem durch ein Enzym markiertes Antigen (Konjugat) um eine begrenzte Zahl von Antikörper-Bindungsstellen auf der Mikrotiterplatte. Durch das Wasch- und Dekantierverfahren wird ungebundenes Material entfernt. Nach dem Waschschrift wird das Enzymsubstrat hinzugefügt. Die enzymatische Reaktion wird durch Zugabe der Stopplösung beendet. Anschließend wird die Absorption mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät gemessen. Die Intensität der gebildeten Färbung ist umgekehrt proportional zur Konzentration von 3 $\alpha$ -Diol-G in der Probe. Eine Standardreihe dient zur Aufzeichnung einer Eichkurve, aus der die Konzentration von 3 $\alpha$ -Diol-G in Patientenproben direkt abgelesen werden kann.

## 3 KLINISCHE ANWENDUNG

5 $\alpha$ -Androstan-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -Diol-Glucuronid ist ein C19-Steroid und wird entweder als 3 $\alpha$ -Diol-G, 5 $\alpha$ -Diol-G oder einfach mit  $\alpha$ -Diol-G abgekürzt. Es entsteht hauptsächlich als Metabolit von Testosteron und Dihydrotestosteron (DHT). Zum größten Teil wird es in peripheren Zielgeweben wie der Haut, besonders um die Haarfollikel herum, produziert. Eine Stimulation mit größeren Mengen von 3 $\alpha$ -Diol-G führt zu einer exzessiven Haarbildung – dies wird besonders an den Stellen deutlich, an denen Frauen normalerweise keine Haare haben.

In den letzten Jahren wuchs bei klinischen Forschern, die an idiopathischem Hirsutismus leidende Patientinnen untersuchten, das Interesse an der Messung dieses Steroids.

Als Vorläufer für das 3 $\alpha$ -Diol-G gelten unter anderem Dehydroepiandrosteron (DHEA), Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEAS), Dihydrotestosteron (DHT), Androstendion und Testosteron. Nur für 3 $\alpha$ -Diol-G wurde eine Zunahme bei Hirsutismus und eine Abnahme bei Behandlung festgestellt. Diese Korrelation wurde auch bei Patientinnen mit polyzystischem Ovarialsyndrom (PCO) gezeigt. Die Bestimmung von 3 $\alpha$ -Diol-G hat sich deshalb bei einer Reihe von Untersuchungen als nützlicher Indikator erwiesen, wie bei der Überwachung des Behandlungsfortschritts bei idiopathischem Hirsutismus und von Patientinnen mit PCO.

Darüber hinaus hat sich gezeigt, dass sowohl männliche als auch weibliche Diabetiker unter Cyclosporin-A-Therapie als Nebenwirkung einen erhöhten 3 $\alpha$ -Diol-G-Spiegel haben, der zur Bildung von Haaren auf vorher unbehaarten Stellen führt.

#### 4 VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

1. Für eine erfolgreiche Anwendung des Testkits sollte die Arbeitsanleitung vor Gebrauch vollständig und sorgfältig gelesen werden und verstanden worden sein. Der Test liefert nur dann zuverlässige Ergebnisse, wenn die Anweisungen genau und sorgfältig eingehalten werden.
2. Kontrollmaterial oder vereinigte Serumproben (gepooltes Serum) mit hohem und niedrigem Spiegel sollten in jedem Lauf mit getestet werden, um die Zuverlässigkeit der Ergebnisse zu überprüfen.
3. Wenn Reagenzien mit Wasser verdünnt oder gelöst werden sollen, entionisiertes oder destilliertes Wasser verwenden.
4. Beim Hantieren mit Kit-Reagenzien und menschlichen Proben Handschuhe tragen, um Kontakt mit potentiell gefährlichen Substanzen zu vermeiden.
5. Alle Kit-Reagenzien und Proben vor Gebrauch Raumtemperatur annehmen lassen sowie vorsichtig und dennoch gründlich mischen. Wiederholtes Auftauen und Wieder-Einfrieren der Reagenzien und Proben vermeiden.
6. Für jeden Testdurchlauf muss eine Eichkurve erstellt werden.
7. Die Kontrollen sollten in jedem Testdurchlauf mitgeführt werden und sich innerhalb der festgelegten Konfidenzgrenzen befinden.
8. Wenn die Testwerte für die Kontrollen außerhalb des zuvor festgelegten Wertebereichs liegen, kann das auf unvorschriftsmäßige Testdurchführung, ungenaues Pipettieren, unvollständiges Waschen oder unsachgemäße Lagerung der Reagenzien hinweisen.
9. Beim Ablesen der Mikrotiterplatten dürfen keine Bläschen in den Mikrovertiefungen vorhanden sein, denn diese verfälschen die Werte der optischen Dichte (OD). Sorgfältig alle Bläschen vor dem Ablesen entfernen.
10. Die Substratlösung (TMB) ist lichtempfindlich und sollte bei sachgemäßer Lagerung farblos bleiben. Wenn die Substratlösung eine Blaufärbung angenommen hat, kann das auf Verderb oder Kontamination hinweisen, und die Substratlösung sollte in diesem Fall nicht mehr verwendet werden.
11. Der Testpuffer ist lichtempfindlich und sollte in der dunklen Originalflasche vor direktem Sonnenlicht geschützt gelagert werden.
12. Beim Pipettieren der Substrat- und der Stopplösung keine Pipetten verwenden, bei denen diese Lösungen mit Metallteilen in Berührung kommen könnten.
13. Für jedes Reagenz, jede Probe, jeden Standard und jede Kontrolle eine neue Pipettenspitze verwenden, um Kontaminationen der Reagenzien zu vermeiden.
14. Kit-Bestandteile mit verschiedenen Chargen-Bezeichnungen nicht innerhalb eines Tests mischen und die Komponenten nach Ablauf des auf dem Etikett angegebenen Verfalldatums nicht mehr verwenden.
15. Die Kit-Reagenzien müssen als Sondermüll gehandhabt werden und sind entsprechend den nationalen Bestimmungen zu entsorgen.

#### 5 GRENZEN DES TESTS

1. Alle Reagenzien des Testkits sind auf die direkte Bestimmung von 3 $\alpha$ -Diol-G in Humanserum kalibriert. Das Kit ist nicht für die Bestimmung von 3 $\alpha$ -Diol-G in Speichel, Plasma oder in anderen menschlichen oder tierischen Proben kalibriert.
2. Keine stark hämolysierten, stark lipämischen, ikterischen oder nicht ordnungsgemäß gelagerten Proben verwenden.
3. Proben oder Kontrollseren, die Azid oder Thiomersal enthalten, können mit diesem Kit nicht getestet werden, da sie zu falschen Ergebnissen führen können.
4. Für die Verdünnung von hochkonzentrierten Serumproben darf nur Kalibrator A verwendet werden. Wird ein anderes Reagenz verwendet, kann das zu falschen Ergebnissen führen.
5. Die mit diesem Testkit erzielten Ergebnisse sollten niemals als alleinige Grundlage für eine klinische Diagnose dienen. Zum Beispiel können heterophile Antikörper bei Patienten, die regelmäßig Tieren oder tierischen Produkten ausgesetzt sind, immunologische Tests möglicherweise stören. Deshalb sollte die klinische Diagnose alle Aspekte der Vorgeschichte des Patienten mit einschließen, wie auch die Häufigkeit des Kontakts mit Tieren oder tierischen Produkten, falls falsche Ergebnisse vermutet werden.

## 6 SICHERHEITSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

### POTENTIELL BIOLOGISCH GEFÄHRLICHES MATERIAL

Das für die Herstellung von Kontrollen und Standards verwendete Humanserum wurde negativ sowohl auf Hepatitis-B-Oberflächen-Antigen als auch auf Antikörper gegen HCV und Humanes Immundefizienz-Virus (HIV) getestet. Jedoch kann das Vorhandensein von HIV, HCV und Hepatitis-B-Virus oder anderer infektiöser Krankheitserreger durch keine Testmethode mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden. Die Reagenzien müssen als potentielle biologische Gefahrenquelle angesehen und mit den gleichen Vorsichtsmaßnahmen wie jede Blutprobe behandelt werden.

### CHEMISCHE GEFAHRENQUELLEN

Kontakt mit Reagenzien, die TMB, Wasserstoffperoxid und / oder saure Lösung enthalten, vermeiden. Nach Kontakt mit einem dieser Reagenzien mit viel Wasser abwaschen. TMB steht im Verdacht, krebserregend zu sein.

## 7 PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG

Ungefähr 0,2 mL Serum werden für eine Doppelbestimmung benötigt.

4 - 5 mL Blut in ein entsprechend beschriftetes Röhrchen abnehmen und gerinnen lassen. Zentrifugieren und dann die Serumschicht vorsichtig abnehmen.

Proben bei 4 °C bis zu 24 Stunden oder bei maximal -10 °C lagern, wenn die Analysen erst zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt werden sollen.

Alle menschlichen Proben müssen als potentiell biologisch gefährliche Materialien angesehen und mit entsprechenden Vorsichtsmaßnahmen behandelt werden.

### 7.1 VORBEHANDLUNG DER PROBEN

Dieser Test verwendet ein direktes System; es ist keine Vorbehandlung der Proben notwendig.

## 8 ERFORDERLICHE MATERIALIEN UND GERÄTE (NICHT IM KIT ENTHALTEN)

1. Präzisionspipetten für die Volumina 50, 100, 150 und 300  $\mu$ L
2. Einweg-Pipettenspitzen
3. Destilliertes oder entionisiertes Wasser
4. Mikrotiterplatten-Schüttler
5. Mikrotiterplatten-Lesegerät mit einem 450 nm-Filter und einer oberen OD-Grenze von mindestens 3,0 (siehe Testdurchführung Schritt 10).

## 9 ENTHALTENE REAGENZIEN

**1. Rabbit Anti-3 $\alpha$  Diol G Antibody Coated Microwell Plate - Break Apart Wells** (Mit Kaninchen-Anti-3 $\alpha$ -Diol-G-Antikörpern beschichtete Mikrotiterplatte zum Auseinanderbrechen) - gebrauchsfertig.

Inhalt: Eine mit polyklonalen Antikörpern beschichtete Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen (12x8) in einem wiederverschließbaren Beutel mit Trockenmittel.

Lagerung: Bei 2 °C - 8 °C lagern.

Haltbarkeit: 12 Monate oder wie auf dem Etikett angegeben.

**2. 3 $\alpha$  Diol G-Horseradish Peroxidase (HRP) Conjugate Concentrate** (3 $\alpha$ -Diol-G-Meerrettichperoxidase- (HRP-) Konjugatkonzentrat) – **X50**

Inhalt: 3 $\alpha$ -Diol-G-HRP-Konjugat in proteinbasiertem Puffer mit quecksilberfreiem Konservierungsmittel.

Volumen: 300  $\mu$ L/Fläschchen

Lagerung: Bei 2 °C - 8 °C lagern.

Haltbarkeit: 12 Monate oder wie auf dem Etikett angegeben.

Vorbereitung: Vor der Verwendung 1:50 in Assay Buffer verdünnen (z. B. 40  $\mu$ L HRP in 2 mL Assay Buffer. Soll die ganze Mikrotiterplatte verwendet werden, 240  $\mu$ L HRP in 12 mL Assay Buffer verdünnen. Eventuelle Reste verwerfen.

**3. 3 $\alpha$  Diol G Calibrators (3 $\alpha$ -Diol-G-Kalibratoren)** - gebrauchsfertig.

Inhalt: Sechs Fläschchen mit 3 $\alpha$ -Diol-G in proteinbasiertem Puffer mit quecksilberfreiem Konservierungsmittel. Hergestellt durch Dotierung des Puffers mit einer definierten Menge an 3 $\alpha$ -Diol-G.

\*Unten sind die ungefähren Konzentrationen aufgelistet, die genauen Konzentrationen sind auf den Fläschchenetiketten angegeben.

Kalibrator	Konzentration	Volumen/Fläschchen
Kalibrator A	0 ng/mL	2,0 mL
Kalibrator B	0,25 ng/mL	0,6 mL
Kalibrator C	1 ng/mL	0,6 mL
Kalibrator D	3 ng/mL	0,6 mL
Kalibrator E	10 ng/mL	0,6 mL
Kalibrator F	50 ng/mL	0,6 mL

Lagerung: Bei 2 °C - 8 °C lagern.

Haltbarkeit: Ungeöffnet 12 Monate haltbar oder wie auf dem Etikett angegeben. Nach dem Öffnen Standards innerhalb von 14 Tagen verbrauchen oder in Aliquots aufgeteilt eingefroren lagern. Wiederholtes Auftauen und Wieder-Einfrieren vermeiden.

**4. Controls (Kontrollen)** - gebrauchsfertig.

Inhalt: Zwei Fläschchen mit 3 $\alpha$ -Diol-G in proteinbasiertem Puffer mit quecksilberfreiem Konservierungsmittel. Hergestellt durch Dotierung des Puffers mit einer definierten Menge an 3 $\alpha$ -Diol-G. Auf dem Fläschchenetiketten sind die erwarteten Werte und die akzeptable Wertebereiche angegeben.

Volumen: 0,6 mL/Fläschchen

Lagerung: Bei 2 °C - 8 °C lagern.

Haltbarkeit: Ungeöffnet 12 Monate haltbar oder wie auf dem Etikett angegeben. Nach dem Öffnen Kontrollen innerhalb von 14 Tagen verbrauchen oder in Aliquots aufgeteilt eingefroren lagern. Wiederholtes Auftauen und Wieder-Einfrieren vermeiden.

**5. Wash Buffer Concentrate (Waschpufferkonzentrat) - X10**

Inhalt: Eine Flasche mit Puffer mit nichtionischem Detergens und mit quecksilberfreiem Konservierungsmittel.

Volumen: 50 mL/Flasche

Lagerung: Bei 2 °C - 8 °C lagern.

Haltbarkeit: 12 Monate oder wie auf dem Etikett angegeben.

Vorbereitung: Vor Gebrauch 1:10 in destilliertem oder entionisiertem Wasser verdünnen. Soll die ganze Mikrotiterplatte verwendet werden, 50 mL Waschpufferkonzentrat in 450 mL Wasser verdünnen.

**6. Assay Buffer (Testpuffer)** - gebrauchsfertig\*.

Inhalt: Eine Flasche mit proteinbasiertem Puffer mit quecksilberfreiem Konservierungsmittel.

Volumen: 15 mL/Flasche

Lagerung: Bei 2 °C - 8 °C lagern.

Haltbarkeit: 12 Monate oder wie auf dem Etikett angegeben.

\*Vor Gebrauch zur vollständigen Lösung erwärmen.

**7. TMB Substrate (TMB-Substrat)** - gebrauchsfertig.

Inhalt: Eine Flasche mit Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid in Puffer ohne DMF oder DMSO.

Volumen: 16 mL/Flasche

Lagerung: Bei 2 °C - 8 °C lagern.

Haltbarkeit: 12 Monate oder wie auf dem Etikett angegeben.

**8. Stopping Solution (Stopplösung)** - gebrauchsfertig.

Inhalt: Ein Fläschchen mit 2 N saure Lösung.

Volumen: 6 mL/Fläschchen

Lagerung: Bei 2 °C - 8 °C lagern.

Haltbarkeit: 12 Monate oder wie auf dem Etikett angegeben.

## 10 TESTDURCHFÜHRUNG

### Vorbehandlung der Proben: Keine.

Alle Reagenzien müssen vor Gebrauch Raumtemperatur annehmen. Kalibratoren, Kontrollen und Proben sollten als Doppelbestimmung getestet werden. Nach Beginn des Tests sollten alle Schritte ohne Unterbrechung durchgeführt werden.

1. Arbeitslösungen des 3 $\alpha$ -Diol-G-HRP-Konjugats und des Waschpuffers herstellen.
2. Benötigte Anzahl an Mikrotiter-Streifen entnehmen. Beutel wieder verschließen und nicht verwendete Streifen zurück in den Kühlschrank legen.
3. 50  $\mu$ L von jedem Kalibrator, jeder Kontrolle und jeder Probe in doppelter Ausführung in entsprechend markierte Vertiefungen pipettieren.
4. 100  $\mu$ L Konjugat-Arbeitslösung in jede Vertiefung pipettieren (Wir empfehlen die Verwendung einer Mehrkanal-Pipette).
5. Auf einem Mikrotiterplatten-Schüttler (ca. 200 rpm) 30 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubieren.
6. Jede Vertiefung 3-mal mit 300  $\mu$ L verdünntem Waschpuffer waschen und die Mikrotiterplatte dann auf ein saugfähiges Papiertuch schlagen, um Waschpuffer-Rückstände zu entfernen. (Die Verwendung eines Wascherätes wird empfohlen).
7. In festgelegten Zeitabständen 150  $\mu$ L TMB-Substrat in jede Vertiefung pipettieren.
8. Auf einem Mikrotiterplatten-Schüttler für 10 - 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren (oder bis Kalibrator A dunkelblau wird und somit die gewünschte OD erreicht hat).
9. In jede Vertiefung 50  $\mu$ L Stopplösung in denselben Zeitabständen wie in Schritt 7 pipettieren.
10. Die Mikrotiterplatte mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät bei 450 nm innerhalb von 20 Minuten nach Zugabe der Stopplösung ablesen.

\* Falls die OD die obere Detektionsgrenze überschreitet oder kein 450 nm-Filter verfügbar ist, kann stattdessen ein 405 nm- oder 415 nm-Filter verwendet werden. Die OD-Werte sind dann niedriger, dies beeinträchtigt jedoch nicht die Ergebnisse für die Patientenproben und Kontrollen.

## 11 BERECHNUNG

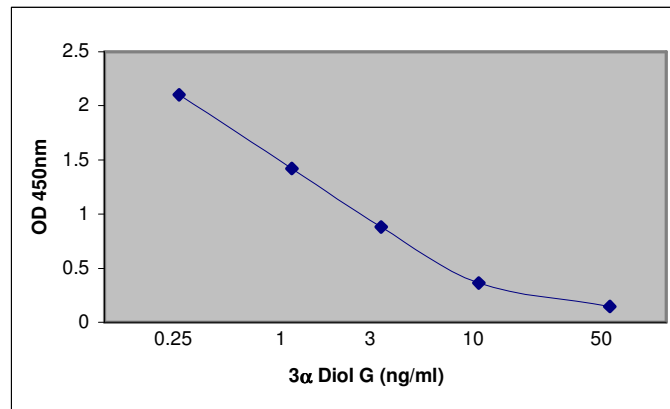
1. Für die doppelt bestimmten Kalibratoren jeweils die mittlere optische Dichte berechnen.
2. Auf halblogarithmischem Papier eine Eichkurve aufzeichnen, dabei die Kalibratorkonzentrationen auf der X-Achse und die mittleren optischen Dichten auf der Y-Achse auftragen. Bei Verwendung von Immunoassay-Computerprogrammen wird eine 4-Parameter- oder 5-Parameter-Kurve empfohlen.
3. Für die doppelt bestimmten unbekanntenen Proben jeweils die mittlere optische Dichte berechnen.
4. Die Werte für die unbekanntenen Proben direkt aus der Eichkurve ablesen.
5. Wenn der Wert einer Probe mehr als 50 ng/mL ergibt, die Probe mit Kalibrator A höchstens 1:8 verdünnen. Das dann abgelesene Ergebnis muss mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert werden.

### 11.1 TYPISCHE WERTE-TABELLE

Kalibrator	OD 1	OD 2	Mittelwert OD	Wert (ng/mL)
A	2,480	2,474	2,477	0
B	2,102	2,106	2,104	0,25
C	1,428	1,413	1,421	1
D	0,877	0,883	0,880	3
E	0,360	0,368	0,364	10
F	0,147	0,143	0,145	50
Unbekannt	0,598	0,596	0,597	5,4

## 11.2 TYPISCHE KALIBRATIONS-KURVE

Diese Kurve dient nur als Beispiel. **Nicht** zur Berechnung der Ergebnisse verwenden.



## 12 TESTCHARAKTERISTIKA

### 12.1 SENSITIVITÄT

Die untere Detektionsgrenze wird aus der Standardkurve durch Bestimmung der resultierenden Konzentration aus der mittleren OD von Kalibrator A (basierend auf 10 Wiederholungen der Analyse) minus 2 SD berechnet. Die Sensitivität des 3 $\alpha$ -Diol-G-ELISA-Testkits beträgt demnach **0,1 ng/mL**.

Weitere Daten entnehmen Sie bitte der englischen Anleitung.

## 13 ZU ERWARTENDE NORMALWERTE

Wie bei allen klinischen Tests sollte jedes Labor Daten sammeln und daraus seinen eigenen Wertebereich für die zu erwartenden Normalwerte bestimmen.

Gruppe	Wertebereich (ng/mL)
Männer	1,53 - 14,82
Frauen vor der Menopause	0,22 - 4,64
Frauen nach der Menopause	0,61 - 3,71
Junge Frauen in der Pubertät	0,51 - 4,03

## 1 USO PREVISTO

Determinación cuantitativa directa de 3 $\alpha$  Diol G mediante inmunoensayo enzimático en suero humano. Solamente para diagnóstico *in vitro*.

## 2 PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El principio de la siguiente prueba de inmunoensayo enzimático sigue el típico escenario de enlace competitivo. La competencia ocurre entre un antígeno no marcado (presente en patrones, controles y muestras del paciente) y un antígeno marcado con una enzima (conjugado) por un número limitado de lugares de unión de anticuerpos en la placa de pocillos. Los materiales no unidos se eliminan mediante los procedimientos de lavado y decantado. Tras el procedimiento de lavado, se añade el sustrato enzimático. La reacción enzimática se detiene mediante la adición de la solución de parada. La absorción se mide mediante un lector de placas de microtitulación. La intensidad del color formado es inversamente proporcional a la concentración de 3 $\alpha$  Diol G presente en la muestra. Se utiliza un conjunto de patrones para dibujar una gráfica donde se puede leer directamente la cantidad de 3 $\alpha$  Diol G presente en las muestras del paciente y en los controles.

## 3 APLICACIONES CLÍNICAS

El glucurónico de 5 $\alpha$ -androstano-3 $\alpha$ , 17 $\beta$ -diol es un esteroide de 19 carbonos y se puede representar abreviadamente como 3 $\alpha$  Diol G o simplemente como  $\alpha$  Diol G. Se produce principalmente como un metabolito de la testosterona y la dihidrotestosterona (DHT). Se produce en grandes cantidades en tejidos periféricos diana tales como la piel, especialmente alrededor de los folículos capilares. La estimulación mediante grandes cantidades de 3 $\alpha$  Diol G origina una formación excesiva de vello, lo que es especialmente notable en mujeres puesto que en este sexo no es normal su presencia.

Durante los últimos años ha aumentado el interés en la medición de este esteroide entre los investigadores clínicos que estudian a mujeres con problemas de hirsutismo idiopático.

Entre los esteroides precursores del 3 $\alpha$  Diol G conocidos se encuentran la dehidroepiandrosterona (DHEA), el sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEAS), la dihidrotestosterona (DHT), la androstanediona y la testosterona. Solo el 3 $\alpha$  Diol G ha demostrado aumentar significativamente en casos de hirsutismo y disminuir al aplicar tratamiento. Esta correlación también ha sido demostrada en pacientes con síndrome de ovarios poliquísticos (SOP). Por tanto, el 3 $\alpha$  Diol G ha demostrado ser un indicador útil en varios procedimientos, entre los que se incluyen la monitorización del progreso del tratamiento del hirsutismo idiopático y de mujeres con SOP.

Además, los pacientes diabéticos (hombres y mujeres) bajo tratamiento con ciclosporina A han mostrado un aumento de los niveles de 3 $\alpha$  Diol G; un efecto colateral que tiene como consecuencia la aparición de vello en lugares donde antes no lo había.



#### 4 PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS PARA EL PROCEDIMIENTO

1. Los usuarios deben poseer conocimientos avanzados acerca de este protocolo para poder utilizar este kit de forma adecuada. Solo se podrá obtener un rendimiento fiable si se siguen estricta y cuidadosamente las instrucciones suministradas.
2. Los materiales de control o conjunto de sueros deberían incluirse en cada prueba en niveles altos y bajos para comprobar la fiabilidad de los resultados.
3. Cuando se especifique el uso de agua para la dilución o reconstitución, utilice agua desionizada o destilada.
4. Para minimizar la exposición a sustancias potencialmente nocivas se deberán utilizar guantes al manipular los reactivos del kit y las muestras humanas.
5. Todos los reactivos del kit y muestras deberían estar a temperatura ambiente y mezclarse suave pero concienzudamente antes de utilizarse. Evitar la congelación y descongelación repetida de los reactivos y muestras.
6. Se debe establecer una curva calibradora para cada prueba.
7. Se deberían incluir los controles en cada prueba y deberían estar dentro del intervalo de confianza establecido.
8. Si los valores de los ensayos para los controles no reflejan los rangos establecidos podrá deberse a técnicas de procedimiento incorrectas, pipeteo impreciso, lavado incompleto y almacenamiento incorrecto de los reactivos.
9. La presencia de burbujas en los micropocillos podría afectar las densidades ópticas a la hora de leer las microplacas. Elimine cuidadosamente todas las burbujas antes de proceder con la lectura.
10. La solución de sustrato (TMB) es sensible a la luz y debería permanecer incolora siempre y cuando se almacene de forma correcta. Si se volviera de color azul podría deberse a inestabilidad o contaminación. En este caso, la solución no debería ser utilizada.
11. El tampón del ensayo es sensible a la luz y debería almacenarse en su botella oscura original, lejos de la luz directa del sol.
12. No utilice pipetas en las que el líquido pueda entrar en contacto con partes metálicas al dispensar el sustrato y la solución de parada.
13. Para prevenir la contaminación de los reactivos, utilice una punta de pipeta desechable nueva para dispensar cada uno de los reactivos, muestras, patrones o controles.
14. No mezcle componentes de kits con diferente numeración de lote para una prueba y no utilice ningún componente después de la fecha de caducidad impresa en la etiqueta.
15. Los reactivos del kit deben ser tratados como residuos peligrosos y desechados según las normativas locales.

#### 5 LIMITACIONES

1. Todos los reactivos del kit han sido calibrados para la determinación directa de 3 $\alpha$  Diol G en suero humano. El kit no ha sido calibrado para la determinación de 3 $\alpha$  Diol G en saliva, plasma u otras muestras de origen humano o animal.
2. No utilice sueros altamente ictericós, hemolizados y lipémicos, o que hayan sido almacenados inadecuadamente.
3. Este kit no es compatible con muestras o controles de sueros que contengan azida o timerosal, ya que pueden provocar resultados falsos.
4. Utilice solamente calibrador A para diluir muestras de suero concentradas. La utilización de cualquier otro reactivo puede provocar resultados falsos.
5. No se deberían realizar diagnósticos clínicos tomando como única base los resultados obtenidos mediante este kit. Por ejemplo, la presencia de anticuerpos heterófilos en pacientes habitualmente expuestos a animales o a productos de origen animal puede ocasionar interferencias en tests inmunológicos. Por consiguiente, el diagnóstico clínico debería incluir todos los aspectos del historial médico del paciente, incluyendo la frecuencia de exposición a animales o productos de origen animal en caso de que se sospeche que los resultados obtenidos son falsos.

## 6 PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS DE SEGURIDAD

### MATERIAL DE RIESGO BIOLÓGICO POTENCIAL

El suero humano que pudiera haberse utilizado en la preparación de los patrones y controles ha sido testado y se ha determinado que no es reactivo para el antígeno de superficie de la hepatitis B. También se ha comprobado que no hay presencia de anticuerpos para el VHC ni para el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). No obstante, ningún método de prueba puede asegurar totalmente la ausencia de los virus del VIH, VHC y de la hepatitis B o de cualquier otro agente infeccioso. Los reactivos deberían ser considerados como peligros biológicos potenciales y deberían manipularse tomando las mismas precauciones que generalmente se aplican a cualquier muestra de sangre.

### RIESGOS QUÍMICOS

Evite el contacto con reactivos que contengan TMB, peróxido de hidrógeno y ácido solución. En caso de que haya establecido contacto con alguno de estos reactivos, lávese con agua abundante. Se sospecha que el TMB puede ser carcinógeno.

## 7 OBTENCIÓN DE MUESTRAS Y ALMACENAMIENTO

Se necesita aproximadamente 0,2 mL de suero para cada determinación por duplicado.

Recoja 4-5 mL de sangre en un tubo adecuadamente etiquetado y deje que se coagule. Centrifugue la muestra y retire con cuidado la capa de suero.

Almacene la muestra a 4 °C y utilícela dentro de las siguientes 24 horas, o a -10 °C o menos en caso de que el análisis se realice en una fecha posterior.

Considere todas las muestras humanas como material de riesgo biológico potencial y tome las debidas precauciones al manipularlas.

### 7.1 PRETRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Este ensayo es un sistema directo, por lo que no se necesita pretratar las muestras.

## 8 REACTIVOS Y EQUIPAMIENTO NECESARIO PERO NO INCLUIDO

1. Pipetas de precisión para dispensar 50, 100, 150 y 300 µL
2. Puntas de pipeta desechables
3. Agua destilada o desionizada
4. Agitador de placas
5. Lector de placas de micropocillos con un filtro establecido en 450 nm y un límite superior de DO de 3,0 o mayor\* (ver paso 10 del procedimiento de ensayo).

## 9 REACTIVOS INCLUIDOS

### 1. Placa Recubierta con Anticuerpos de Conejo anti-3α Diol G de Micropocillos Separables - Lista para Utilizar.

Contenido: Una placa de 96 micropocillos (12x8) recubierta de anticuerpos policlonales en una bolsa resellable con desecante.

Almacenamiento: Refrigerar a 2 °C - 8 °C

Estabilidad: 12 meses o tal y como se indica en la etiqueta.

### 2. Conjugado Concentrado de Peroxidasa de Rábano (HRP) y 3α Diol G - X50

Contenido: Conjugado de 3α Diol G y peroxidasa de rábano (HRP) en un tampón de base proteica con un conservante sin mercurio.

Volumen: 300 µL/vial

Almacenamiento: Refrigerar a 2 °C - 8 °C

Estabilidad: 12 meses o tal y como se indica en la etiqueta.

Preparación: Diluya en proporción 1:50 en el tampón de ensayo antes de utilizar (por ejemplo, 40 µL de HRP en 2 mL de tampón de ensayo). Si se va a utilizar toda la placa, diluya 240 µL de HRP en 12 mL de tampón de ensayo. Deseche la cantidad de producto sobrante.

**3. Calibradores 3α Diol G** - Listos para Utilizar.

Contenido: Seis viales con 3α Diol G en un tampón de base proteica con un conservante sin mercurio. Preparados por tampón enriquecido con una cantidad definida de 3α Diol G

\*A continuación se indican las concentraciones aproximadas. Consulte las etiquetas de los viales para obtener las concentraciones exactas.

Calibrador	Concentración	Volumen/Vial
Calibrador A	0 ng/mL	2,0 mL
Calibrador B	0,25 ng/mL	0,6 mL
Calibrador C	1 ng/mL	0,6 mL
Calibrador D	3 ng/mL	0,6 mL
Calibrador E	10 ng/mL	0,6 mL
Calibrador F	50 ng/mL	0,6 mL

Almacenamiento: Refrigerar a 2 °C - 8 °C

Estabilidad: 12 meses en viales no abiertos o tal y como se indica en la etiqueta. Una vez abiertos, los patrones deberían utilizarse dentro de los siguientes 14 días o separarlas en partes alícuotas y congelarlos. Evite realizar múltiples ciclos de congelado y descongelado.

**4. Controles** - Listos para Utilizar.

Contenido: Dos viales con 3α Diol G en un tampón de base proteica con un conservante sin mercurio. Preparados por tampón enriquecido con una cantidad definida de 3α Diol G. Consulte las etiquetas de los viales para averiguar el rango aceptable.

Volumen: 0,6 mL/vial

Almacenamiento: Refrigerar a 2 °C - 8 °C

Estabilidad: 12 meses en viales no abiertos o tal y como se indica en la etiqueta. Una vez abiertos, los controles deberían utilizarse dentro de los siguientes 14 días o separarlas en partes alícuotas y congelarlos. Evite realizar múltiples ciclos de congelado y descongelado.

**5. Concentrado de Tampón de Lavado - X10**

Contenido: Una botella de tampón con un detergente no iónico y un conservante sin mercurio.

Volumen: 50 mL/botella

Almacenamiento: Refrigerar a 2 °C - 8 °C

Estabilidad: 12 meses o tal y como se indica en la etiqueta.

Preparación: Diluya en proporción 1:10 en agua destilada o desionizada antes de utilizar. Si se va a utilizar toda la placa, diluya 50 mL de concentrado de tampón de lavado en 450 mL de agua.

**6. Tampón de Ensayo** - Listo para Utilizar\*.

Contenido: Una botella de tampón de base proteica con un conservante sin mercurio.

Volumen: 15 mL/botella

Almacenamiento: Refrigerar a 2 °C - 8 °C

Estabilidad: 12 meses o tal y como se indica en la etiqueta.

\*Calentar para disolverlo por completo antes de utilizar.

**7. Sustrato TMB** - Listo para Utilizar.

Contenido: Una botella de tetrametilbencidina y peróxido de hidrógeno en un tampón sin DMF o DMSO.

Volumen: 16 mL/botella

Almacenamiento: Refrigerar a 2 °C - 8 °C

Estabilidad: 12 meses o tal y como se indica en la etiqueta.

**8. Solución de Parada** - Lista para Utilizar.

Contenido: Un vial con ácido solución 2 N.

Volumen: 6 mL/vial

Almacenamiento: Refrigerar a 2 °C - 8 °C

Estabilidad: 12 meses o tal y como se indica en la etiqueta.

## 10 PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

### Pretratamiento de las Muestras: *Ninguno.*

Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente antes de utilizarse. Los calibradores, controles y muestras deberían analizarse por duplicado. Una vez que el procedimiento haya comenzado, se deberán completar todos los pasos sin interrupción.

1. Prepare las soluciones de trabajo de conjugado 3 $\alpha$  Diol G-HRP y de tampón de lavado.
2. Retire la cantidad de tiras de micropocillos que necesite. Reselle la bolsa y devuelva las tiras no utilizadas al refrigerador.
3. Pipetee 50  $\mu$ L de cada calibrador, control y muestra y deposítelos en sus correspondientes pocillos etiquetados por duplicado.
4. Pipetee 100  $\mu$ L de la solución de trabajo de conjugado en cada pocillo (se recomienda utilizar una pipeta multicanal).
5. Incube los pocillos en un agitador de placas (a aproximadamente 200 rpm) durante 30 minutos a temperatura ambiente.
6. Lave los pocillos 3 veces con 300  $\mu$ L de tampón de lavado diluido para cada uno y de unos golpecitos firmes a la placa contra un trozo de papel absorbente para asegurarse de que está seca. (Se recomienda utilizar una lavadora).
7. Pipetee 150  $\mu$ L de sustrato TMB y deposítelos en cada pocillo a intervalos regulares.
8. Incube los pocillos en un agitador de placas durante 10-15 minutos a temperatura ambiente (o hasta que el calibrador A se vuelva azul oscuro para la DO elegida).
9. Pipetee 50  $\mu$ L de solución de parada y deposítelos en cada uno de los pocillos a los mismos intervalos regulares que en el paso 7.
10. Observe la placa en un lector de placas de micropocillos a 450 nm durante los 20 minutos posteriores a la adición de la solución de parada.

\* Si la DO excede el límite superior de detección o si no se encuentra disponible un filtro de 450 nm, se puede utilizar un filtro de 405 o de 415 nm. Las densidades ópticas serán menores, pero esto no afectará a los resultados de las muestras del paciente o de control.

## 11 CÁLCULOS

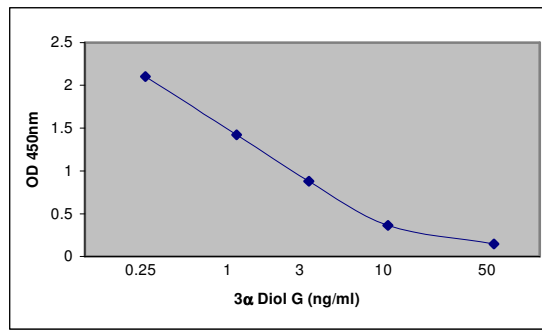
1. Calcule la densidad óptica media de cada uno de los duplicados del calibrador.
2. Dibuje la curva del calibrador en papel semilogarítmico con las densidades ópticas medias en el eje Y y las concentraciones del calibrador en el eje X. En caso de utilizar programa informático de inmunoensayo, se recomienda elaborar una curva de 4 o 5 parámetros.
3. Calcule la densidad óptica media de cada uno de los duplicados del elemento desconocido.
4. Observe los valores de los elementos desconocidos directamente en la curva del calibrador.
5. Si una muestra presenta un valor mayor a 50 ng/mL, dilúyala en calibrador A en una proporción no superior a 1:8. Debería multiplicar el resultado obtenido por el factor de dilución.

### 11.1 TABLA DE DATOS TÍPICA

Calibrador	DO 1	DO 2	DO media	Valor (ng/mL)
A	2,480	2,474	2,477	0
B	2,102	2,106	2,104	0,25
C	1,428	1,413	1,421	1
D	0,877	0,883	0,880	3
E	0,360	0,368	0,364	10
F	0,147	0,143	0,145	50
Elemento desconocido	0,598	0,596	0,597	5,4

## 11.2 CURVA DE CALIBRADOR TÍPICA

Solo curva de muestra. **No** la utilice para calcular resultados.



## 12 CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

### 12.1 SENSIBILIDAD

El límite inferior de detección se calcula a partir de la curva estándar mediante la determinación de la concentración resultante de la DO media del calibrador A (basada en 10 análisis repetidos) menos 2 DS. Por tanto, la sensibilidad del Kit ELISA directo 3 $\alpha$  Diol G es de **0,1 ng/mL**.

### 12.2 ESPECIFICIDAD (REACTIVIDAD CRUZADA)

Los siguientes compuestos han sido testados para determinar su reactividad cruzada con el Kit ELISA directo 3 $\alpha$  Diol G con un reactivo cruzado de 3 $\alpha$  Diol G al 100%.

Esteroides	% Reactividad Cruzada
3 $\alpha$ Diol G	100
Testosterona	0,2
Progesterona	0,16
Androstanediona	0,14
Cortisol	0,05

Los siguientes esteroides han sido testados pero han mostrado reactividad cruzada a menos de 0,01%: Corticosterona, dehidroepiandrosterona, dihidrotestosterona, epiandrosterona, 17 $\beta$ -estradiol y estrona.

### 12.3 PRECISIÓN INTRAENSAYO

Se han probado tres muestras diez veces cada una en la misma curva de calibrador. Los resultados (en ng/mL) se muestran en la siguiente tabla:

Muestra	Media	DS	% CV
1	0,87	0,07	7,8
2	6,86	0,49	7,2
3	21,26	1,29	6,0

### 12.4 PRECISIÓN INTERENSAYO

Se han probado tres muestras diez veces cada una durante un período de cuatro semanas. Los resultados (en ng/mL) se muestran en la siguiente tabla:

Muestra	Media	DS	% CV
1	0,98	0,10	10,4
2	7,05	0,46	6,5
3	20,92	2,26	10,8

**12.5 RECUPERACIÓN**

Las muestras enriquecidas han sido preparadas mediante la adición de cantidades definidas de 3 $\alpha$  Diol G a tres muestras de suero de paciente. Los resultados (en ng/mL) se muestran en la siguiente tabla:

Muestra	Resultados Observados	Resultados Esperados	% Recuperación
1	0,67	-	-
+0,5	1,07	1,17	91,4
+5,0	4,99	5,67	88,0
+15,0	12,66	15,67	80,8
2	1,83	-	-
+0,5	2,07	2,33	88,8
+5,0	6,18	6,83	90,5
+15,0	17,64	16,83	104,8
3	12,76	-	-
+0,5	15,32	13,26	115,5
+5,0	19,22	17,76	108,2
+15,0	22,68	27,76	81,7

**12.6 LINEALIDAD**

Se han diluido tres muestras de suero de paciente en calibrador A. Los resultados (en ng/mL) se muestran en la siguiente tabla:

Muestra	Resultados Observados	Resultados Esperados	% Recuperación
1	6,24	-	-
1:2	2,83	3,12	90,7
1:4	1,55	1,56	99,4
1:8	0,74	0,78	94,9
2	13,55	-	-
1:2	6,00	6,77	88,6
1:4	2,71	3,39	80,0
1:8	1,70	1,64	103,6
3	17,05	-	-
1:2	6,93	8,53	81,2
1:4	4,09	4,26	96,0
1:8	2,34	2,13	109,8

**13 VALORES NORMALES ESPERADOS**











Como en todos los ensayos clínicos, cada laboratorio debería recabar información y establecer su propio rango de valores normales esperados.

Grupo	Rango (ng/mL)
Hombres	1,53 - 14,82
Mujeres premenopáusicas	0,22 - 4,64
Mujeres postmenopáusicas	0,61 - 3,71
Pubertad (mujer)	0,51 - 4,03

#### 14 REFERENCES / LITERATURE / LITERATUR / REFERENCIAS

1. Gunther, H.J. and Wilson, J.D., Formation of 5 $\alpha$ - Androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol by normal and hypertrophic human prostate. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 44/1:107-115, 1977.
2. Deslypere, J.P., et al., Plasma 5 $\alpha$ -Androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol and urinary 5 $\alpha$ -Androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol glucuronide, parameters of peripheral androgen action: A comparative study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 54/2:386-391, 1982.
3. Moghissi, E., et al., Origin of plasma androstanediol glucuronide in men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 59/3:417-421, 1984.
4. Scanlon, M.J. et al., Serum androstanediol glucuronide concentrations in normal and hirsute women and patients with thyroid dysfunction. *Clin. Endocrinol.* 29:529-538, 1988.
5. Reiner, B.J., et al., Serum 3 $\alpha$ -Androstanediol glucuronide measurements in sexually mature women with congenital adrenal hyperplasia during therapy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 69:105-109, 1989.
6. Vexiau, P., et al., Increase in plasma 5 $\alpha$ -Androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol glucuronide as a marker of peripheral androgen action in hirsutism: A side-effect induced by cyclosporine A. *J. Steroid Biochem.* 35/1:133-137, 1990.
7. Pang, S., et al., 3 $\alpha$ -Androstanediol glucuronide in virilizing congenital adrenal hyperplasia: A useful serum metabolic marker of integrated adrenal androgen secretion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 73/1:166-174, 1991.
8. Riddick, L., et al., 3 $\alpha$ -Androstanediol glucuronide in premature and normal pubarche. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 72:46-50, 1991.
9. Check, J.H., et al, Falsely elevated steroidal assay levels related to heterophile antibodies against various animal species. *Gynecol Obstet Invest* 40:139-140, 1995.

## SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Français	Español	Italiano
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las instrucciones de uso	Consultare le istruzioni per l'uso
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conformité aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostic in vitro	Para uso Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Numéro de catalogue	Número de catálogo	Numero di Catalogo
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	Numéro de lot	Número de lote	Numero di lotto
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
Distributed by	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore
Content	Content	Inhalt	Conditionnement	Contenido	Contenuto
Volume/No.	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantité	Volumen/Número	Volume/Quantità