



# ACTIVE® Dihydrotestosterone RIA

**REF** DSL9600i

## TABLE OF CONTENTS

English . . . . .	2	Polski . . . . .	30
Français . . . . .	5	Čeština . . . . .	34
Deutsch . . . . .	9	Slovenčina . . . . .	37
Italiano . . . . .	13	Türkçe . . . . .	40
Español . . . . .	16	Русский . . . . .	43
Português (Portugal) . . . . .	20	APPENDIX . . . . .	47
Ελληνικά . . . . .	23		
Magyar . . . . .	27		

---

# ACTIVE® Dihydrotestosterone RIA

**REF** DSL9600i

## RADIOIMMUNOASSAY FOR THE IN VITRO QUANTITATIVE MEASUREMENT OF DIHYDROTESTOSTERONE (DHT) IN HUMAN SERUM OR PLASMA For *in vitro* diagnostic use.

### PRINCIPLE

The radioimmunoassay of dihydrotestosterone (5 $\alpha$ -Dihydrotestosterone; DHT; 17 $\beta$ -Hydroxy-5 $\alpha$ -androstane-3-one) is a competitive assay. The procedure follows the basic principle of radioimmunoassay where there is a competition between a radioactive and a non-radioactive antigen for a fixed number of antibody binding sites. The amount of [125I]-labeled dihydrotestosterone bound to the antibody is inversely proportional to the concentration of unlabeled DHT present. The separation of the free and bound antigen is achieved by decanting or aspirating the antibody-coated tubes. A standard curve is constructed and unknown DHT values are obtained from the curve by interpolation.

For Summary and Explanation of the Test see APPENDIX.

### WARNING AND PRECAUTIONS

#### General remarks:

- For *in vitro* diagnostic use.
- The vials with calibrators and controls should be opened as shortly as possible to avoid evaporation.
- Do not mix the reagents from kits of different lots.
- Do not use any component beyond the expiration date shown on its label.
- A standard curve must be established with each assay.
- It is recommended to perform the assay in duplicate.
- Calibrators and controls should be mixed before use by inverting or swirling gently rather than vortexing.

#### Basic rules of radiation safety

The purchase, possession, utilization, and transfer of radioactive material are subject to the regulations of the country of use. Adherence to the basic rules of radiation safety should provide adequate protection:

- No eating, drinking, smoking or application of cosmetics should be carried out in the presence of radioactive materials.
- No pipeting by mouth.
- Avoid all contact with radioactive materials by using gloves and lab coat.
- All manipulation of radioactive substances should be done in an appropriate location, away from corridors and other busy areas.
- Radioactive materials should be stored in the container provided in a designated area.
- A record of receipt and storage of all radioactive products should be kept up to date.
- Laboratory equipment and glassware which are subject to contamination should be segregated to prevent cross-contamination of different radioisotopes.
- Each case of radioactive contamination or loss of radioactive material should be resolved according to established procedures.
- Radioactive waste should be handled according to the rules established in the country of use.

#### Sodium azide

Some reagents contain sodium azide as preservative. Sodium azide may react with lead, copper or brass to form explosive metal azides. Dispose of the reagents by flushing with large amounts of water through the plumbing system.

#### Materials of human origin

Patient samples and blood-derived products may be routinely processed with minimum risk using the procedure described. However, handle these products as potentially infectious according to universal precautions and good clinical laboratory practices, regardless of their origin, treatment, or prior certification. Use an appropriate disinfectant for decontamination.

PI-DSL9600I-02

Store and dispose of these materials and their containers in accordance with local regulations and guidelines.

### GHS HAZARD CLASSIFICATION

Oxidation Solution



H411 Toxic to aquatic life with long lasting effects.  
P273 Avoid release to the environment.  
P391 Collect spillage.  
Potassium Permanganate 1 - 5%

Sample Buffer

DANGER



H226 Flammable liquid and vapour.  
H314 Causes severe skin burns and eye damage.  
P210 Keep away from heat, hot surfaces, and sparks. No smoking.  
P280 Wear protective gloves, protective clothing and eye/face protection.  
P301+P330+P331 IF SWALLOWED: rinse mouth. Do NOT induce vomiting.  
P303+P361+P353 IF ON SKIN (or hair): Rinse skin with water.  
P305+P351+P338 IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.  
P310 Immediately call a POISON CENTER or doctor/physician.  
Ethyl Alcohol 10 - 20%  
Sodium Hydroxide 20 - 30%

**SDS**

Safety Data Sheet is available at [techdocs.beckmancoulter.com](http://techdocs.beckmancoulter.com)

### SPECIMEN COLLECTION, PROCESSING, STORAGE AND DILUTION

- Serum and plasma-EDTA are the recommended sample types.
- Allow serum samples to clot completely before centrifugation.
- Store separated serum or plasma at 2-8 °C for up to 24 hours. For longer storage keep frozen at <-20 °C, up to 1 year. It is recommended to prepare aliquots to avoid repeated freezing and thawing. Thawing of sample should be performed at room temperature.
- Samples MUST be extracted prior to assay. See Procedure.
- Any sample reading greater than the highest calibrator should be diluted appropriately with the 0 pg/mL calibrator and reassayed.
- Serum and EDTA plasma values for 19 samples (serum values ranging from 53.75 to 341.5 pg/mL) were compared using the Active Dihydrotestosterone RIA kit DSL9600(i). Results are as follows:

[EDTA-plasma] = 0.9592[serum] + 31.583 R = 0.9783

### MATERIALS PROVIDED

All reagents in the kit are stable until the expiration date indicated on the kit label, when stored at 2-8 °C. Expiry dates printed on vial labels apply to the

long-term storage of components by the manufacturer only, prior to assembly of the kit. Do not take into account.

Storage conditions for opened reagents are indicated in appropriate paragraphs.

**Anti-dihydrotestosterone antibody coated tubes: 2 x 50 tubes** (ready-to-use)

Plastic tubes with polyclonal rabbit anti-DHT immunoglobulin immobilized to the inside wall of each tube.

**125I-labeled dihydrotestosterone tracer: one 55 mL vial** (lyophilized)

On the date of manufacture, the vial contains 185 kBq (<5 µCi) of 125I-labeled DHT in buffer with proteins (BSA) and sodium azide (<0.1 %). Reconstitute tracer with 55 mL of deionized water. After reconstitution, store at 2-8 °C for up to 14 days in order to achieve maximum binding (%B<sub>0</sub>/T) > 25%.

**Calibrators: one 50 mL vial labeled 0** (ready to use) **and seven vials labeled 1-7** (lyophilized).

The calibrator vials contain from 0 to approximately 2,500 pg/mL (0 to approximately 8,600 pmol/L) of dihydrotestosterone in buffer with proteins (BSA) and sodium azide (<0.1%). The exact concentration is indicated on each vial label. The calibrator values were established using a certified reference material (Cerilliant). Do NOT extract calibrators prior to assay.

**Controls: two vials labeled 1, 2** (lyophilized)

The vials contain dihydrotestosterone in human serum and sodium azide (<0.1%). The expected values are in a supplement found in the kit. Controls MUST be extracted prior to assay. (See Procedure).

**Oxidation Solution: two 25 mL bottles** (ready-to-use)

Bottles contain potassium permanganate solution (<5 %) in a buffer with sodium azide (<0.1 %).

**Sample buffer: one 5.5 mL vial** (ready-to-use)

The vial contains buffer with <23 % Ethyl Alcohol and <29 % Sodium Hydroxide.

## MATERIALS REQUIRED, BUT NOT PROVIDED

In addition to standard laboratory equipment, the following items are required:

- 12 x 75 mm or 13 x 100 mm or 16 x 150 mm **GLASS** tubes and safety caps.
- Test tube rack for 12 x 75 mm tubes.
- Deionized water.
- Precision micropipet (100 µL, 250 µL and 400 µL).
- Semi-automatic pipet (500 µL).
- Vortex type mixer.
- 5 mL graduated glass pipettes - **USED IN EXTRACTION.**
- Organic solvents: n-hexane and ethanol (HPLC grade).
- Centrifuge (1500 x g, preferably refrigerated).
- Nitrogen gas or a speed-vac assembly with heating (for extractions).
- Shaker capable of ≥ 180 rpm.
- A sponge rack or similar device for decantation.
- Aspiration system.
- Absorbent material for blotting tubes.
- Gamma counter set for 125 iodine.
- Semi-log (log-linear) graph paper or computer RIA data analysis program.

## RESULTS

Results are obtained from the standard curve by interpolation. The curve is used for the determination of dihydrotestosterone concentrations in samples measured at the same time as the calibrators.

### Standard curve

The results below were calculated using a log-linear curve fit ("spline" mode) with B/T (%) or B/B<sub>0</sub> (%) on vertical axis and the DHT concentration of the calibrators on the horizontal axis (pg/mL). Other data reduction methods may give slightly different results.

ED50 = 100.7 pg/mL

Total activity: 57,936 cpm				
Calibrators	DHT (pg/mL)	cpm (n=2)	B/T (%)	B/B <sub>0</sub> (%)
0	0	37.670	65.0	100
1	24.0	31.164	53.8	82.7
2	48.0	26.403	45.6	70.1
3	96.0	19.356	33.4	51.4
4	192	12.449	21.5	33.0
5	480	6.948	12.0	18.4
6	960	4.570	7.88	12.1
7	2.400	2.514	4.33	6.67

(Example of standard curve, do not use for calculation)

### Samples

For each sample locate the ratio B/T (%) or B/B<sub>0</sub> (%) on the vertical axis of the standard curve and read off the corresponding DHT concentration of the sample on the horizontal axis in pg/mL. To convert concentrations from pg/mL to pmol/L, multiply results by 3.44.

## EXPECTED VALUES

Each laboratory should establish its own reference ranges. An internal study of healthy adults gave the DHT concentrations shown in the table below and are provided for reference only.

	Age	n	Median (pg/mL)	2.5% Percentile (pg/mL)	97.5% Percentile (pg/mL)	Range (pg/mL)
Male	20 - 60	119	274.7	109.2	583.1	33.69 - 756.4
Female	20 - 60	122	82.81	33.28	196.5	17.67 - 245.8

(For more details, see APPENDIX)

## QUALITY CONTROL

Good laboratory practices require that control samples be used regularly to ensure the quality of the results obtained. These controls must be processed in exactly the same way as the patient samples, and it is recommended that their results be analyzed using appropriate statistical methods.

Failure to obtain the appropriate values for controls may indicate imprecise manipulations, improper sample handling, or deterioration of reagents. In case of packaging deterioration or if data obtained show some performance alteration, please contact your local distributor or use the following e-mail address: [imunochem@beckman.com](mailto:imunochem@beckman.com)

## PROCEDURE

### Preparation of reagents

Let all the reagents come to room temperature and mix them thoroughly by gentle inversion before use.

### Reconstitution of tracer

Reconstitute tracer with 55 mL of deionized water. Wait for 10 min following reconstitution and mix gently to avoid foaming before dispensing. Store at 2-8 °C for up to 14 days.

### Reconstitution of calibrators and control samples

Reconstitute calibrators 1-7 and controls 1-2 with the volume of deionized water indicated on the vial label. Wait for 10 min following reconstitution and mix gently to avoid foaming before dispensing. Store at <-20 °C until expiration date of kit.

### Extraction of samples

*Note: Extractions must be done using clean, preferably disposable, GLASS tubes and pipettes. Allow the Oxidation Solution and other extraction reagents to reach room temperature (18-25 °C) before use.*

*Samples and controls require extraction. Do NOT extract calibrators.*

- Number one tube for each sample or control.
- Add 400 µL of sample or control to a numbered glass tube and add 500 µL of Oxidation solution. Thoroughly vortex and incubate at room temperature (18-25 °C) for 15 minutes.
- Prepare the extraction mixture: 98% n-hexane and 2% ethanol.
- Using a glass pipette, extract the oxidized sample by adding 4.0 mL n-hexane-ethanol mixture (98% hexane: 2% ethanol). Vortex each sample immediately for 1 minute.

- Add 50 µL of DHT Sample Buffer, cap tubes and mix gently by inverting tubes 3-4 times.
- Centrifuge at 1500 X g for 15 minutes at 2-8 °C to separate the organic layer from the aqueous layer.
- Transfer 2.5 mL of the upper organic layer into appropriately labeled clean glass tubes and evaporate to dryness, using either nitrogen gas or a speed-vac assembly with heating.

Reconstitute the dried material with 250 µL of the DHT zero calibrator. Thoroughly vortex and keep at room temperature (18-25 °C) at least 1 hour.

**NOTE:**

- DO NOT EXTRACT KIT CALIBRATORS
- Use 12 x 75 mm or 13 x 100 mm glass tubes with safety caps. If safety caps are not available, 16 x 150 mm tubes can be used. After extraction, cover the 16 x 150 mm tubes with aluminum foil to avoid evaporation of organic solvent.
- Avoid using lipemic samples.

**Assay procedure**

Run Calibrators, Controls and patient samples in duplicate.

Step 1 Additions	Step 2 Incubation	Step 3 Counting
Extract samples and controls as directed in section Procedure.  To antibody coated tubes successively add:  100 µL of calibrator, control or sample and immediately add  500 µL of tracer.*  Vortex all tubes.	Cover and incubate 2 hours on a shaker (≥180 rpm) at room temperature (18-25°C).  Aspirate or decant all tubes, (except «total cpm» tubes), by simultaneous inversion with a sponge rack into a radioactive waste receptacle.	Add 3.0 mL deionized water to all tubes, except «total cpm» tubes.  Aspirate or decant all tubes, (except «total cpm» tubes), by simultaneous inversion with a sponge rack into a radioactive waste receptacle.  Strike the tubes sharply on absorbent material to facilitate complete drainage. Drain for >2 minutes. Blot the tubes.  Count bound cpm (B) and total cpm (T) for 1 minute.

\*Add 500 µL of tracer to 2 additional tubes to obtain total cpm.

**PERFORMANCE CHARACTERISTICS**

(For more details, see APPENDIX)

Representative data are provided for illustration only. Performance obtained in individual laboratories may vary.

**Sensitivity**

**Analytical sensitivity:** 9.14 pg/mL

**Functional sensitivity:** 19.63 pg/mL

**Specificity**

The antibody used in the immunoassay is highly specific for DHT. Extremely low cross reactivities were obtained with several related molecules (androstenedione, estradiol, testosterone etc).

**Precision**

**Intra-assay**

Samples were assayed 25 times in the same run. The coefficients of variation were ≤ 7.9 %.

**Inter-assay**

Samples were assayed in duplicate in 10 different series. The coefficients of variation were found below or equal to 7.1 %.

**Accuracy**

**Dilution test**

Five serum samples were serially diluted with zero calibrator. The recovery percentages ranged from 80.5 % to 114 %.

**Recovery test**

Five serum samples were spiked with known quantities of DHT. The recovery percentages ranged from 88.0 % to 107 %.

**Measurement range** (from analytical sensitivity to highest calibrator): 9.14 to approximately 2,500 pg/mL.

**LIMITATIONS**

- Failure to follow these instructions for use (IFU) may significantly affect results.
- Failure to blot the tubes adequately following decantation may result in poor replication and spurious results.
- Avoid repeated freezing and thawing of reagents or specimens.
- Do not use hemolytic, lipemic or icteric samples.
- If there is evidence of microbial contamination or excessive turbidity in a reagent, discard the vial.

# ACTIVE® Dihydrotestosterone RIA

**REF** DSL9600i

## TROUSSE RADIOIMMUNOLOGIQUE POUR LE IN VITRO DOSAGE QUANTITATIF DU DIHYDROTESTOSTERONE (DHT) DANS LE SERUM OU PLASMA HUMAIN Utilisation comme test de diagnostic *in vitro*.

### PRINCIPE

Le dosage radioimmunologique du dihydrotestosterone, (5 $\alpha$ -dihydrotestosterone ; DHT ; 17 $\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ -androstane-3-on) est un dosage par compétition. La procédure suit le principe de base de l'immunodosage selon lequel des antigènes radioactifs et non radioactifs entrent en compétition pour un nombre fixe de sites de liaison d'anticorps. La quantité de dihydrotestosterone marquée à [125] liée à l'anticorps est inversement proportionnelle à la concentration en dihydrotestosterone non marquée présente. La séparation d'antigènes libre et lié est effectuée par décantation ou aspiration des tubes enduits d'anticorps. Une courbe d'étalonnage est établie. Les valeurs inconnues sont déterminées par interpolation à l'aide de cette courbe.

**Pour Résumé et explication du test voir APPENDIX.**

### AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

#### Précautions générales

- Pour un usage diagnostique *in vitro*.
- Les flacons de calibreurs et contrôles devront être ouverts le moins longtemps possible pour empêcher l'évaporation.
- Ne pas mélanger des réactifs de lots différents.
- N'utilisez aucun des composants au-delà de la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
- Effectuer simultanément la courbe standard et le dosage des échantillons.
- Il est recommandé de réaliser les dosages en double.
- Avant leur emploi, standards et contrôles doivent être mélangés par inversion ou en les faisant tourbillonner doucement plutôt que par vortex.

#### Les règles de bases de la radio protection

L'achat, la possession, l'utilisation et l'échange de matières radioactives sont soumis aux réglementations en vigueur dans le pays de l'utilisateur. L'application des règles de base de protection contre les rayonnements ionisants assure une protection adéquate.

- Ne pas manger, ni boire, ni fumer, ni appliquer de cosmétiques dans les laboratoires où des produits radioactifs sont utilisés.
- Pipetage à la bouche interdit.
- Éviter le contact direct avec tout produit radioactif en utilisant des blouses et des gants de protection.
- Toute manipulation de matières radioactives se fera dans un local approprié, éloigné de tout passage.
- Les produits radioactifs seront stockés dans leur conditionnement d'origine dans un local approprié.
- Un cahier de réception et de stockage de produits radioactifs sera tenu à jour.
- Le matériel de laboratoire et la verrerie qui ont été contaminés doivent être éliminés au fur et à mesure afin d'éviter une contamination croisée de plusieurs isotopes.
- Chaque cas de contamination ou perte de substance radioactive devra être résolu selon les procédures établies.
- Toute mise aux déchets de matière radioactive se fera en accord avec les règlements en vigueur.

#### Azide de sodium

Certains réactifs contiennent de l'azide de sodium comme agent conservateur. L'azide de sodium peut réagir avec le plomb, le cuivre

et le lait et former des azides métalliques explosifs. Lors du rejet de telles solutions à l'évier, laisser couler un volume important d'eau dans les canalisations.

#### Les produits d'origine humaine

Les échantillons de patients et les produits dérivés du sang peuvent être traités en routine avec un risque minimum si la procédure décrite est respectée. Cependant, manipuler ces produits comme s'ils étaient potentiellement infectieux en suivant les précautions universelles et les bonnes pratiques de laboratoire, quels que soient leur origine, leur traitement ou leur certification antérieure. Utiliser un désinfectant approprié pour la décontamination. Conserver et éliminer ces produits et leurs récipients en suivant les règlements et les procédures locales.

### CLASSIFICATION DES RISQUES SGH

Oxidation Solution



H411

Toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.

P273

Éviter le rejet dans l'environnement.

P391

Recueillir le produit répandu.  
Permanganate de potassium 1 - 5%

Sample Buffer

DANGER



H226

Liquide et vapeurs inflammables.

H314

Provoque de graves brûlures de la peau et de graves lésions des yeux.

P210

Tenir à l'écart de la chaleur, des surfaces chaudes, et des étincelles. Ne pas fumer.

P280

Porter des gants de protection, des vêtements de protection et un équipement de protection des yeux/du visage.

P301+P330+P331

EN CAS D'INGESTION : rincer la bouche. Ne PAS faire vomir.

P303+P361+P353

EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU (ou les cheveux) : rincer la peau à l'eau.

P305+P351+P338

EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.

P310

EN CAS d'exposition : appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.

Alcool éthylique 10 - 20%  
Hydroxyde de sodium 20 - 30%



La fiche technique santé-sécurité est disponible à l'adresse [techdocs.beckmancoulter.com](http://techdocs.beckmancoulter.com)

## PRELEVEMENT, PREPARATION, CONSERVATION ET DILUTION DES ECHANTILLONS

- Recueillir le sang dans des tubes secs sans additif ou avec EDTA.
- Pour les sérums, laisser les échantillons coaguler complètement avant la centrifugation.
- Conserver les échantillons à 2-8 °C si le dosage est réalisé dans les 24 heures. Sinon, il est préférable de les conserver congelés (<-20 °C) jusqu'à 1 an et de préférence aliquotés, afin d'éviter les congélations et décongélations successives. La décongélation de l'échantillon peut être réalisée à température ambiante.
- Les spécimens devraient être EXTRAITS avant leur emploi. Voir Procédure.
- Tout échantillon plus élevé que le plus haut calibrateur devra être dilué correctement avec du calibrateur zéro et redosé.
- Des valeurs sériques et de plasma EDTA de 19 spécimens (valeurs sériques allant de 53,75 à 341,5 pg/mL) ont été comparées au moyen du kit RIA DSL9600i. Les résultats sont comme suit :

[EDTA plasma] = 0,9592[serum] + 31,583 R = 0,9783

## ÉLÉMENTS FOURNIS

Tous les réactifs de la trousse conservés à 2-8°C sont stables, jusqu'à la date de péremption mentionnée sur la trousse. Les dates d'expiration imprimées sur les étiquettes des flacons concernent uniquement le stockage à long terme des réactifs par le fabricant, avant l'assemblage de la trousse. Ne pas en tenir compte.

Si nécessaire, les conditions de conservation des réactifs ouverts, sont indiquées dans le paragraphe correspondant.

### Tubes revêtus d'anticorps anti-DHT : 2 x 50 tubes (prêts à l'emploi)

Tubes en plastique, avec des immunoglobulines de lapin anti-DHT immobilisées sur la paroi interne de chaque tube.

### Traceur DHT marqué à l'iode 125 : 1 flacon de 55 mL (lyophilisé)

Le flacon contient 185 kBq (<5 µCi), en début de lot, de DHT marqué à l'iode 125 dans un tampon avec des protéines, de l'azide de sodium (<0,1%). Reconstituer le contenu de flacon avec 55 mL d'eau désionisée. Après reconstitution, stocker entre 2-8 °C jusqu'à 14 jours, pour atteindre le taux maximum (B<sub>0</sub>/T %) > 25%.

### Calibrateurs : 1 flacon de 50 mL marqué 0 (prêt à l'emploi) + 7 flacons marqués 1-7 (lyophilisés)

Les flacons de calibrateur contiennent entre 0 à environ 2500 pg/mL (0 à environ 8600 pmol/L) du dans le tampon avec des protéines, de l'azide de sodium (<0,1%). La concentration exacte est indiquée sur chaque flacon. Les valeurs de calibrateurs ont été attribuées selon le standard de référence certifié (Cerilliant). NE PAS EXTRAIRE les calibrateurs avant usage.

### Contrôles : 2 flacons, marqués 1, 2 (lyophilisés)

Les flacons contiennent du DHT, dans du sérum humain en présence de l'azide de sodium (<0,1%). Les valeurs attendues sont comprises dans la fourchette de concentrations indiquée sur le supplément. EXTRAIRE les contrôles avant la détermination. (Voir Procédure)

### Solution d'oxydation : 2 bouteilles de 25 mL (prêtes à l'emploi)

Les bouteilles contiennent tampon avec du permanganate de potassium (<5%) et de l'azide de sodium (<0,1%).

### Tampon de reprise : 1 flacon de 5,5 mL (prêt à l'emploi)

Le flacon contient tampon avec <23 % ethyl alcohol et <29 % d'hydroxyde de sodium.

## ÉLÉMENTS NÉCESSAIRES, MAIS NON FOURNIS

En plus de l'équipement de laboratoire usuel, il est nécessaire d'utiliser le matériel suivant :

- tubes à essai en 12 x 75 mm ou 13 x 100 mm ou en **VERRE** de 16 x 150 mm vec les bouchons,
- Support pour tubes à essai de 12 x 75 mm
- Eau déionisée.
- micropipettes de précision (100 µL, 250 µL and 400 µL),
- pipette semi-automatique (500 µL).
- Mélangeur de type vortex.
- pipette sérologique en verre graduée de 5 mL - **Pour l'extraction**,
- solvants organiques: n-hexane et ethanol (de qualité HPLC),
- Centrifuge (1500 X g, de préférence réfrigérée)
- appareil d'évaporation muni d'un bloc chauffant ou par aspiration sous azote (Pour l'extraction)
- agitateur pouvant agiter à ≥ 180 rpm
- Support en éponge ou appareil semblable pour décantation
- Système d'aspiration.
- Matériel absorbant pour éponger les tubes
- Compteur gamma calibré pour l'iode 125.
- Papier quadrillé semi-log (log-linéaire) ou logiciel d'analyse de données RIA.

## RÉSULTATS

Les résultats sont déduits de la courbe standard par interpolation. La courbe sert à déterminer les taux de DHT de tous les échantillons mesurés en même temps que les calibrateurs.

### Courbe standard

Les résultats présentés dans cette notice ont été calculés par avec ajustement de courbe log-linéaire ("spline" mode) pour la gamme standard avec en ordonnée le rapport B/T (%) ou B/B<sub>0</sub> (%) et en abscisse les concentrations en DHT des calibrateurs (pg/mL). L'utilisation d'un autre mode de calcul peut conduire à des résultats légèrement différents.

ED50 = 100.7 pg/mL

Activité totale : 57 936 cpm				
Calibrators	DHT (pg/mL)	cpm (n=2)	B/T (%)	B/B <sub>0</sub> (%)
0	0	37,670	65,0	100
1	24,0	31,164	53,8	82,7
2	48,0	26,403	45,6	70,1
3	96,0	19,356	33,4	51,4
4	192	12,449	21,5	33,0
5	480	6,948	12,0	18,4
6	960	4,570	7,88	12,1
7	2,400	2,514	4,33	6,67

(Exemple de courbe standard, ne pas utiliser pour les calculs)

### Echantillons

Pour chaque échantillon, repérer le rapport B/T (%) ou B/B<sub>0</sub> (%) sur l'axe vertical, puis le point correspondant de la courbe standard et en déduire par lecture sur l'axe horizontal la concentration en DHT de l'échantillon. Pour convertir des concentrations de pg/mL en pmol/L, multipliez les résultats par 3,44.

## VALEURS ATTENDUES

Il est recommandé à chaque laboratoire d'établir ses propres valeurs normales. A titre indicatif, une étude réalisée en interne sur adultes apparemment sains, donne les concentrations en DHT indiquées dans la table ci dessus.

	tranches d'âge	n	Médian (pg/mL)	2,5% percentile (pg/mL)	97,5% percentile (pg/mL)	Gamme absolue (pg/mL)
Homme:	20 - 60	119	274,7	109,2	583,1	33,69 - 756,4
Femme:	20 - 60	122	82,81	33,28	196,5	17,67 - 245,8

(voir la feuille "APPENDIX" pour plus de détails)

## CONTRÔLE DE QUALITÉ

Les bonnes pratiques de laboratoire impliquent que des échantillons de contrôle soient utilisés dans chaque série de dosage pour s'assurer de la qualité des résultats obtenus. Ces échantillons devront être traités de la même façon que les prélèvements à doser et il est recommandé d'en analyser les résultats à l'aide de méthodes statistiques appropriées.

L'obtention de valeurs inappropriées pour les contrôles peut indiquer des manipulations imprécises, des manutentions inexactes de l'échantillon ou la détérioration de réactifs. En cas de détérioration de l'emballage ou si les résultats obtenus montrent une perte de performance du produit, veuillez contacter: [imunochem@beckman.com](mailto:imunochem@beckman.com)

## PROCÉDURE

### Préparation des réactifs

Equilibrer les réactifs à température ambiante et mélanger avant usage en les inversant ou en les faisant tourbillonner doucement.

### Reconstitution de traceur

Reconstituer le contenu de flacon avec 55 mL d'eau désionisée. Attendre 10 minutes après reconstitution et agiter doucement avant de répartir dans les tubes. Entreposer entre 2-8 °C jusqu'à 14 jours.

### Reconstitution des calibrateurs et contrôles

Reconstituer le contenu des calibrateurs 1-7 et contrôles avec le volume d'eau désionisée indiqué sur l'étiquette du flacon. Attendre 10 minutes après reconstitution et agiter doucement avant de répartir dans les tubes. Entreposer <-20 °C jusqu'à la date de péremption de la trousse.

### Extraction des échantillons biologiques

*Note : les extractions doivent être réalisées en utilisant des tubes et des pipettes en verre propres et de préférence jetables. Laisser la solution d'oxydation et les autres réactifs d'extraction se stabiliser à température ambiante (18-25 °C) avant utilisation.*

Les échantillons et les contrôles doivent être extraits. NE PAS EXTRAIRE les calibrateurs.

- Numéroter un tube pour chaque échantillon ou contrôle.
- Ajouter 400 µL d'échantillon ou de contrôles dans un tube en verre numérotés et ajouter 500 µL de solution d'oxydation. Vortexer doucement et incubé à température ambiante (18-25 °C) pendant 15 minutes.
- Préparer le mélange d'extraction: 98% n-hexane et 2% ethanol.
- Extraire l'échantillon oxydé par l'ajout de 4,0 mL de n-hexane-ethanol en utilisant une pipette en verre. Vortexer chaque tube immédiatement pendant une minute.
- Ajouter 50 µL de tampon d'échantillon DHT, boucher les tubes et mélanger par inversion douce 3 à 4 fois.
- Centrifuger à 1500 X g pendant 15 minutes à 2-8 °C pour séparer les phases aqueuse et organique.
- Transférer 2,5 mL de la phase supérieure organique dans un tube en verre étiqueté de façon appropriée et évaporer, en utilisant de l'azote ou un speed-vac avec chauffage.

Reconstituez le matériel deshydraté avec 250 µL de calibrateur 0 pg/mL. Agitez vigoureusement à l'aide d'un vortex et laissez au minimum 1 heure à 18-25 °C.

### REMARQUE:

- NE PAS EXTRAIRE LES CALIBRATEURS.
- Utilisez des tubes de 12 x 75 mm ou 13 x 100 mm avec des bouchons de sécurité. Si des bouchons de sécurité ne sont pas disponibles, des tubes de 16 x 150 mm peuvent être utilisés. Après l'extraction, couvrir les tubes de 16 x 150 mm avec de l'aluminium pour éviter l'évaporation du solvant organique.
- Ne pas utiliser d'échantillons lipémiques.

### Mode opératoire

Les calibrateurs, contrôles et échantillons inconnus devront être dosés en deux exemplaires.

Etape 1 Répartition	Etape 2 Incubation	Etape 3 Comptage
Extraire les échantillons et les contrôles, selon Procédure.  Au fond des tubes revêtus, distribuer successivement :  100 µL de calibrateur, de contrôle ou d'échantillon, immédiatement  500 µL de traceur.*  Agiter tous les tubes.	Incuber 2 heures sur un agitateur réglé sur ≥180 rpm à température ambiante (18-25 °C).  Aspirer ou décanter tous les tubes, par inversion simultanée avec une claie en éponge dans un récipient à déchets radioactifs. (sauf les 2 tubes «cpm totaux»).	Ajouter 3,0 mL d'eau désionisée à chaque tube, excepté les tubes d'activité totale.  Aspirer ou décanter tous les tubes, par inversion simultanée avec une claie en éponge dans un récipient à déchets radioactifs. (sauf les 2 tubes «cpm totaux»).  Frapper vigoureusement les tubes sur un buvard pour faciliter l'égouttage complet.  Laisser égoutter pendant 2 minutes. Frotter rebord des tubes.  Compter les cpm liés (B) et les cpm totaux (T) pendant 1 min.

\*Ajouter 500 µL de traceur dans 2 tubes supplémentaires pour obtenir les cpm totaux.

## PERFORMANCES DU DOSAGE

(voir la feuille "APPENDIX" pour plus de détails)

Les données représentatives ne sont fournies qu'à titre d'illustration. Les performances obtenues dans les laboratoires individuels peuvent varier.

### Sensibilité

**Sensibilité analytique** : 9,14 pg/mL.

**Sensibilité fonctionnelle** : 19,63 pg/mL.

### Spécificité

L'anticorps utilisé dans ce dosage est hautement spécifique du DHT. Des réactivités croisées extrêmement basses ont été obtenues vis à vis de quelques molécules proches (androstenedione, oestradiol et testostérone).

### Précision

#### Intra-essai

Des échantillons ont été dosés 25 fois dans une même série. Les coefficients de variation obtenus sont inférieurs ou égaux à 7,9 %.

#### Inter-essais

Des échantillons ont été dosés en doublet dans 10 séries différentes. Les coefficients de variation obtenus sont inférieurs ou égaux à 7,1 %.

### Exactitude

#### Epreuve de dilutions

Des échantillons de concentration élevée ont été dilués dans le calibrateur zéro de la trousse. Les pourcentages de recouvrement s'échelonnent entre 80,5 % et 114 %.

#### Epreuve de surcharge

Des quantités connues de DHT ont été ajoutées à des sérums humains. Les pourcentages de recouvrement s'échelonnent entre 88,0 % et 107 %.

**Plage de mesure** (de la sensibilité analytique au calibrateur le plus élevé) : 9,14 à environ 2500 pg/mL.

## LIMITES

- Le non-respect des recommandations indiquées dans cette notice peut avoir un impact significatif sur les résultats.
- Si les tubes ne sont pas épongés correctement après la décantation, cela peut entraîner des valeurs fausses et des répétitions médiocres.
- La congélation et décongélation répétées des échantillons et des réactifs peut diminuer les taux d'aldostérone.
- Ne pas utiliser de spécimens hémolysés, ictériques ou lipémiques.

- Si une contamination microbienne ou un trouble excessif apparaît dans un réactif, éliminer le flacon.





# ACTIVE® Dihydrotestosterone RIA

**REF** DSL9600i

## RADIOIMMUNOASSAY FÜR DIE QUANTITATIVE IN-VITRO BESTIMMUNG VON DIHYDROTESTOSTERON (DHT) IN HUMANEM SERUM ODER PLASMA

*In-vitro*-Diagnostikum.

### PRINZIP

Der Assay für die Bestimmung von Dihydrotestosteron (5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron; DHT; 17 $\beta$ -Hydroxy-5 $\alpha$ -Androstan-3-one) ist ein radioimmunologischer, kompetitiver Assay. Dem Verfahren liegt das Grundprinzip eines Radioimmunoassays zugrunde, wobei radioaktive und nicht radioaktive Antigene um eine konstante Anzahl von Antikörper-Bindungsstellen konkurrieren. Die an den Antikörper gebundene Menge des mit [125I-] markierten DHTs ist umgekehrt proportional zur Konzentration des vorhandenen unmarkierten DHTs. Die Trennung des freien und gebundenen Antigens wird durch Dekantieren oder Absaugen der mit Antikörpern beschichteten Röhrchen erreicht. Unbekannte Probenwerte werden durch Interpolation aus der Standardkurve bestimmt.

**Zusammenfassung und Erläuterung des Tests siehe "APPENDIX"**

### WARNUNGEN UND VORSICHTSMASSNAHMEN

#### Allgemeinhinweise:

- *In-vitro*-Diagnostikum.
- Fläschchen mit Kalibratoren oder Kontrollen sollten nur kurz geöffnet werden um jegliche Verflüchtigung zu vermeiden.
- Reagenzien aus Kits von verschiedenen Produktionsserien sollten nicht miteinander vermischt werden.
- Keine Komponenten nach dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.
- Eine Standardkurve ist für jeden Assay notwendig.
- Der Assay sollte in Doppelbestimmung durchgeführt werden.
- Kalibrator- und Kontrolllösungen sollten vor der Verwendung durch vorsichtiges Umdrehen oder Schwenken und nicht mit Hilfe eines Vortex-Mixers gemischt werden.

#### Grundregeln der Handhabung von Radioaktivität

Annahme, Besitz und Verwendung, Lagerung, Transport und Beseitigung unterliegen den Vorschriften der Atomenergie- bzw. der jeweiligen staatlichen Behörde. Die Einhaltung der Grundregeln beim Umgang mit Radioaktivität sollte eine ausreichende Sicherheit gewährleisten:

- In Räumen, in denen mit radioaktiven Materialien gearbeitet wird, sollte Essen, Trinken, Rauchen und das Auftragen von Kosmetika vermieden werden.
- Kein Pipettieren im Mund.
- Jeglicher Kontakt mit radioaktiven Materialien muss durch Tragen von Handschuhen und Laborkittel vermieden werden.
- Das Arbeiten mit radioaktiven Stoffen muss in dafür speziell gekennzeichneten Bereichen, die vom normalen Laborbetrieb und von anderen beschäftigten Bereichen abgetrennt sind, erfolgen.
- Radioaktive Materialien sollten in einem speziell gekennzeichneten Bereich gelagert werden.
- Ein Register der Eingänge und Lagerung aller radioaktiven Produkte sollte ständig aktualisiert werden.
- Kontaminierte Labor- und Glasgeräte sollten isoliert werden, um eine Kreuzkontamination von verschiedenen Radioisotopen zu verhindern.
- Kontaminationen des Arbeitsplatzes müssen unverzüglich sorgfältig nach den üblichen Verfahren entfernt werden.
- Radioaktiver Abfall muss entsprechend den Richtlinien jedes Einsatzortes entsorgt werden.

#### Natriumazid

Zur Vermeidung mikrobieller Kontamination enthalten einige Reagenzien Natriumazid. Natriumazid kann mit Blei, Kupfer oder Messing zu explosiven Metallaziden reagieren. Um dies zu vermeiden, sollte bei einer Entsorgung über Rohrleitungen mit viel Wasser nachgespült werden.

### Bestandteile menschlichen Ursprungs

Patientenproben und aus Blut hergestellte Produkte können, wie in dieser Anleitung beschrieben, mit minimalem Risiko routinemäßig getestet werden. Diese Produkte sollten jedoch, ungeachtet ihrer Herkunft, Aufbereitung oder vorherigen Bescheinigung, wie potenziell infektiöses Material unter Beachtung allgemein anerkannter Vorsichtsmaßnahmen und der GLP-Richtlinien gehandhabt werden. Zur Dekontamination ist ein geeignetes Desinfektionsmittel zu verwenden. Diese Materialien und ihre Behälter sind nach den örtlichen Vorschriften und Richtlinien zu lagern und zu beseitigen.

### GHS-GEFAHRSTOFFKLASSIFIZIERUNG

Oxidation Solution



H411

Giftig für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung. Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Verschüttete Mengen aufnehmen. Kaliumpermanganat 1 - 5%

P273

P391

Sample Buffer

GEFAHR



H226

Flüssigkeit und Dampf entzündbar.

H314

Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden. Von Hitze, heißen Oberflächen und Funken fernhalten. Nicht rauchen.

P210

P280

Schutzhandschuhe, Schutzkleidung und Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.

P301+P330+P331

BEI VERSCHLUCKEN: Mund ausspülen. KEIN Erbrechen herbeiführen.

P303+P361+P353

BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT (oder dem Haar): Haut mit Wasser abwaschen.

P305+P351+P338

BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.

P310

Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen. Ethylalkohol 10 - 20% Natriumhydroxid 20 - 30%

**SDS**

Das Sicherheitsdatenblatt ist auf [techdocs.beckmancoulter.com](http://techdocs.beckmancoulter.com) verfügbar

### PROBENENTNAHME, -BEHANDLUNG, -LAGERUNG UND VERDÜNNUNG

- Serum oder EDTA-Plasma wird empfohlen.
- Serumproben vor dem Zentrifugieren vollständig gerinnen lassen.
- Die abzentrifugierten Proben können bei 2-8 °C bis zu 24 Stunden bzw. aliquotiert und tiefgekühlt bei -20 °C oder darunter bis zu 1

Jahr gelagert werden. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren sollte vermieden werden. Auftauen sollte bei Raumtemperatur stattfinden.

- Proben MÜSSEN vor dem Assayansatz extrahiert werden. Siehe Durchführung.
- Wenn die Probenkonzentration über dem höchsten Kalibratorwert liegen müssen sie mit Nullkalibrator verdünnt werden.
- Serum- und EDTA-Plasmawerte von 19 Proben (Serumwerte im Bereich zwischen 53,75 und 341,5 pg/mL) wurden unter Verwendung des DSL9600i RIA-Kits verglichen. Das Ergebnis lautet:

$$[\text{EDTA Plasma}] = 0,9592[\text{Serum}] + 31,583 \text{ R} = 0,9783$$

## PRODUKT

Die Reagenzien sind bis zum Verfallsdatum verwendbar, wenn sie bei 2-8°C gelagert werden. Auf die Fläschchen gedruckte Verfallsdaten betreffen nur die Langzeitlagerung beim Hersteller, vor der Zusammensetzung des Kits. Bitte nicht beachten.

Lagerungskonditionen der Reagenzien nach der Öffnung werden in jeweiligem Paragraph erläutert.

**Röhrchen mit Anti-DHT Antikörpern beschichtet: 2 x 50 Röhrchen** (gebrauchsfertig)

Kunststoffröhrchen mit polyklonalem Kaninchen-anti-DHT-Immunglobulin, das an die Innenseite der Röhrchen gebunden ist.

**125I-markierter DHT Tracer: eine 55 mL Flasche** (lyophilisiert)

Die Flasche enthält 185 kBq (<5 µCi), (am Tag der Herstellung) des 125I markierten DHTs in Puffer mit Proteinen (BSA), Natriumazid (<0,1%). Den Tracer mit 55 mL deionisiertem Wasser rekonstituieren. Der aufgelöste Tracer kann bei 2-8 °C für 2 Wochen gelagert werden, um eine maximale Bindung (%B<sub>0</sub>/T) von >25% zu erhalten.

**Kalibratoren: eine 50 mL Flasche (0)** (gebrauchsfertig) **und sieben Fläschchen (1 - 7)** (lyophilisiert)

Die Kalibratorfläschchen enthalten DHT von 0 bis ungefähr 2500 pg/mL (0 bis ungefähr 8600 pmol/L) in Puffer mit Proteinen (BSA) und Natriumazid (<0,1%). Die genauen Konzentrationen sind auf jedem Fläschchen angegeben. Die Kalibratoren-Werte wurde mithilfe eines zertifizierten Referenzmaterials (Cerilliant) etabliert. Kalibratoren vor der Bestimmung NICHT extrahieren.

**Kontrollen: zwei Fläschchen (1, 2)** (lyophilisiert)

Die Fläschchen enthalten DHT in humanem Serum mit Natriumazid (<0,1%). Der Konzentrationsbereich ist auf einem Beiblatt in der Packung angegeben. Kontrollen vor der Bestimmung EXTRAHIEREN (siehe Durchführung).

**Oxidationslösung: zwei 25 mL Flaschen** (gebrauchsfertig)

Die Flaschen enthalten Kaliumpermanganat-Lösung (<5 %) in einem Puffer mit Natriumazid (<0,1 %).

**Probenpuffer: ein 5,5 mL Fläschchen** (gebrauchsfertig)

Das Fläschchen enthält einen Puffer mit <23 % Ethylalkohol und <29 % Natriumhydroxid.

## BENÖTIGTE MATERIALIEN, DIE NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTEN SIND

Zusätzlich zu der Standardlaborausstattung, werden die folgenden Materialien benötigt:

- 12 x 75 mm oder 13 x 100 mm oder 16 x 150 mm **Glasröhrchen** mit Stopfen.
- Röhrchenständer für 12 x 75 mm Röhrchen
- Deionisiertes Wasser
- Präzisionspipette (100 µL, 250 µL, 400 µL).
- halbautomatische Pipetten (500 µL).
- Vortex-Mixer.
- Graduierte 5 mL Glaspipetten - **FÜR DIE EXTRAKTION.**
- Organische Lösungsmittel: n-Hexan und Ethanol (HPLC grade).
- Zentrifuge (1500 x g, vorzugsweise gekühlt)
- Stickstoff oder eine Speed-Vac mit Heizmöglichkeit (zur Extraktion).
- Schüttler ≥ 180 rpm
- Dekantierständer oder Ähnliches
- Absaugsystem.

- Saugfähiges Material zum Austropfen der Röhrchen
- Gamma-Counter für I-125.
- Halblogarithmisches Papier oder Computerprogramm zur RIA-Datenanalyse.

## ERGEBNISSE

Die Ergebnisse werden aus der Standardkurve durch Interpolation ermittelt. Die Kurve kann für die Bestimmung der Dihydrotestosteron-Konzentrationen in den Proben dienen, die zur gleichen Zeit wie die Standardkurve gemessen wurden.

### Standardkurve

Die Ergebnisse in der Packungsbeilage wurden durch eine log-lin Kurvenanpassung ermittelt ("spline" Mode), mit B/T (%) oder B/B<sub>0</sub> (%) auf der y-Achse und den DHT-Konzentrationen der Kalibratoren auf der x-Achse (pg/mL). Andere Datenreduktions-Methoden können zu leicht abweichenden Ergebnissen führen.

ED50 = 100.7 pg/mL

Totalaktivität: 57 936 cpm				
Calibrators	DHT (pg/mL)	cpm (n=2)	B/T (%)	B/B <sub>0</sub> (%)
0	0	37,670	65,0	100
1	24,0	31,164	53,8	82,7
2	48,0	26,403	45,6	70,1
3	96,0	19,356	33,4	51,4
4	192	12,449	21,5	33,0
5	480	6,948	12,0	18,4
6	960	4,570	7,88	12,1
7	2,400	2,514	4,33	6,67

(Beispiel einer Standardkurve, nicht zur Berechnung verwenden)

### Proben

Für jede Probe wird der B/T (%) oder B/B<sub>0</sub> (%) Wert auf der y-Achse aufgetragen und die entsprechende DHT-Konzentration (in pg/mL) auf der x-Achse abgelesen. Um die Werte von pg/mL in pmol/L umzurechnen, müssen sie mit 3,44 multipliziert werden.

## ERWARTETE WERTE

Jedes Labor sollte seinen eigenen Normalbereich festlegen. Eine interne Studie mit gesunden Erwachsenen ergab die in der Tabelle gezeigten DHT-Werte, die aber nur als Richtlinie gelten.

	Alter	n	Median (pg/mL)	2,5 Perzentil (pg/mL)	97,5 Perzentil (pg/mL)	Bereich (pg/mL)
Männlich	20 - 60	119	274,7	109,2	583,1	33,69 - 756,4
Weiblich	20 - 60	122	82,81	33,28	196,5	17,67 - 245,8

(Für mehr Details, siehe die Beilage "APPENDIX")

## QUALITÄTSKONTROLLE

Zur Einhaltung der Laborgrundregeln sollten regelmäßig Kontrollproben benutzt werden, um die Qualität der Ergebnisse zu sichern. Diese Proben müssen in genau derselben Weise wie die Assay Proben getestet werden, und die Analyse der Ergebnisse sollte mit angebrachten statistischen Methoden stattfinden.

Wenn für die Kontrollen nicht die richtigen Werte ermittelt werden, kann dies auf ungenaues Arbeiten, unvorschriftsmäßigen Umgang mit den Proben oder Verfall der Reagenzien zurückzuführen sein. Im Falle von Verpackungsschäden oder einer Leistungsbeeinträchtigung des Produkts, kontaktieren Sie bitte Ihren lokalen Vertreter oder benutzen Sie die folgende e-mail: imunochem@beckman.com

## DURCHFÜHRUNG

### Reagenzienvorbereitung

Die Reagenzien sollten Raumtemperatur haben und vor der Verwendung durch vorsichtiges Umdrehen gemischt werden.

### Rekonstitution des Tracers

Tracer mit 55 mL deionisiertem Wasser rekonstituieren. Nach dem Auflösen 10 Minuten warten und nur leicht Mischen, um jegliche Schaumbildung vor dem Pipettieren zu vermeiden. Der aufgelösten Tracer kann bei 2-8 °C für 2 Wochen gelagert werden.

## Rekonstitution der Kalibratoren und Kontrollen

Kalibratoren 1-7 und Kontrollen 1-2 mit einem auf dem Etikett angegebenen Volumen deionisiertem Wassers rekonstituieren. Nach dem Auflösen 10 Minuten warten und nur leicht Mischen, um jegliche Schaumbildung vor dem Pipettieren zu vermeiden. Die aufgelösten Kalibratoren und Kontrollen bei <-20 °C bis zum Verfallsdatum des Kits lagern.

## Extraktion der Proben

*Hinweis: Die Extraktion muss in sauberen Einweg-Glasröhrchen und mit Glaspipetten durchgeführt werden. Vor der Verwendung müssen die Oxidationslösung und die anderen Reagenzien Raumtemperatur (18-25 °C) haben.*

Proben und Kontrollen müssen extrahiert werden. Kalibratoren NICHT extrahieren.

- Ein Röhrchen für jede Probe oder Kontrolle beschriften.
- 400 µL Probe oder Kontrolle in die beschrifteten Glasröhrchen geben und 500 µL Oxidationslösung hinzufügen. Sorgfältig vortexen und 15 Min. bei Raumtemperatur (18-25 °C) inkubieren.
- Extraktionslösung vorbereiten: 98% n-Hexan und 2% Ethanol
- Oxidierte Proben durch Zugabe von 4,0 mL n-Hexan-Ethanol-Mischung (98% Hexan : 2% Ethanol) mit einer Glaspipette extrahieren. Jede Probe sofort 1 Min. vortexen.
- 50 µL DHT-Probenpuffer hinzufügen, Röhrchen verschließen und durch vorsichtiges Umdrehen (3-4x) mischen.
- 15 Min. bei 1500 x g und 2-8 °C zentrifugieren, um die organische von der wässrigen Phase abzutrennen.
- 2,5 mL der oberen organischen Phase in ein sauberes beschriftetes Glasröhrchen überführen und mit Stickstoff oder einer heizbaren Speed-Vac zur Trockene eindampfen.

Den getrockneten Rückstand mit 250 µL DHT-Nullkalibrator aufnehmen. Sorgfältig vortexen und für mindestens 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-25 °C) stehen lassen.

## ANMERKUNG:

- KEINE KALIBRATOREN EXTRAHIEREN!
- 12 x 75 mm oder 13 x 100 mm Glasröhrchen mit Verschluss verwenden. Falls keine Stopfen zur Verfügung stehen können die 16 x 150 mm Röhrchen verwendet werden. Diese dann nach der Extraktion mit Aluminiumfolie bedecken, um ein Verdampfen des organischen Lösungsmittels zu verhindern.
- Keine lipämischen Proben verwenden.

## Testdurchführung

Kalibratoren, Kontrollen und Proben sollten als Doppelbestimmung durchgeführt werden.

Schritt 1 Zugabe	Schritt 2 Inkubation	Schritt 3 Messung
Proben und Kontrollen extrahieren, wie unter Durchführung beschrieben.	Röhrchen bedecken und 2 Stunden bei Raumtemperatur (18-25 °C) auf einem Schüttler (≥180 rpm) inkubieren.	In alle Röhrchen, mit Ausnahme der Röhrchen zur Bestimmung der Totalaktivität, 3,0 mL deionisiertes Wasser geben.
Zugabe zu den beschichteten Röhrchen (in dieser Reihenfolge):	Alle Röhrchen (ausser „Totalaktivität“) durch Umdrehen des Dekantierständers in einen Behälter für radioaktiven Abfall dekantieren oder absaugen.	Alle Röhrchen (ausser „Totalaktivität“) durch Umdrehen des Dekantierständers in einen Behälter für radioaktiven Abfall dekantieren oder absaugen.
100 µL Kalibrator, Kontrolle oder Probe, und unverzüglich		Die Röhrchen auf einer saugfähigen Unterlage kräftig ausklopfen, damit diese völlig entleert werden.
500 µL Tracer.*		Röhrchen >2 Minuten auf einer saugfähigen Unterlage austropfen lassen und ausklopfen.
Alle Röhrchen vortexen.		Gebundene cpm (B) und Totalaktivität (T) 1 min zählen.

\*Fügen Sie 500 µL Tracer in 2 zusätzliche Röhrchen hinzu, um die Totalaktivität zu erhalten.

## SPEZIFISCHE LEISTUNGSMERKMALE

(Für mehr Details, siehe die Beilage "APPENDIX")

Repräsentative Daten dienen nur der Veranschaulichung. Die in einzelnen Labors erzielten Leistungen können anders ausfallen.

### Empfindlichkeit

**Analytische Sensitivität:** 9,14 pg/mL

**Funktionale Sensitivität:** 19,63 pg/mL

### Spezifität

Der in diesem Immunoassay verwendete Antikörper ist hoch spezifisch für Dihydrotestosteron. Extrem niedrige Kreuzreaktionen wurden mit einigen verwandten Molekülen gemessen (Androstendion, Estradiol und Testosteron).

### Präzision

#### Intra-Assay

Proben wurden 25-fach im selben Ansatz getestet. Der Variationskoeffizient betrug ≤7,9 %.

#### Inter-assay

Proben aus 10 verschiedenen Serien wurden in Doppelbestimmungen gemessen. Der Variationskoeffizient war jeweils kleiner oder gleich 7,1 %.

### Genauigkeit

#### Verdünnungstest

Serumproben wurden seriell mit Nullkalibrator verdünnt. Die erhaltene Wiederfindung befindet sich zwischen 80,5 % und 114 %.

#### Wiederfindungstest

Serumproben wurden mit definierten DHT-Mengen vermischt. Die erhaltene Wiederfindung befindet sich zwischen 88,0 % und 107 %.

**Messbereich** (von der analytischen Sensitivität bis zum höchsten Kalibrator): 9,14 bis ungefähr 2 500 pg/mL.

## EINSCHRÄNKUNGEN

- Die Nichtbeachtung der Anweisungen in dieser Packungsbeilage kann die Ergebnisse signifikant beeinflussen.
- Wenn die Röhrchen nach dem Dekantieren nicht ausreichend von noch vorhandener Flüssigkeit befreit werden, so kann dies ungenaue Doppelbestimmungen und falsche Messwerte zur Folge haben.
- Wiederholtes Auftauen und Einfrieren der Proben oder Reagenzien sollte vermieden werden.

- Es dürfen keine hämolytischen, ikterischen oder lipämischen Proben verwendet werden.
  - Fläschchen nicht benutzen, die Anzeichen für eine mikrobielle Kontamination zeigen oder stark getrübt sind.
-

# ACTIVE® Dihydrotestosterone RIA

**REF** DSL9600i

## KIT RADIOIMMUNOLOGICO PER LA DETERMINAZIONE QUANTITATIVA IN VITRO DEL DIIDROTESTOSTERONE IN SIERO O PLASMA UMANI Per uso diagnostico *in vitro*.

### PRINCIPIO

Questo kit per il dosaggio del diidrotestosterone, (5 $\alpha$ -Dihydrotestosterone, DHT; 17 $\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ -androstan-3-on) utilizza un metodo radioimmunologico competitivo. La procedura segue il principio fondamentale del dosaggio radioimmunologico, che comporta la competizione tra un antigene radioattivo e uno non radioattivo per un numero fisso di siti leganti l'anticorpo. La quantità di DHT marcato con [125I] legato all'anticorpo è inversamente proporzionale alla concentrazione di DHT non marcato presente. La separazione tra antigene libero e legato si ottiene usando un sistema a provette sensibilizzate. Si traccia una curva di taratura e si calcolano per interpolazione sulla curva le concentrazioni dei campioni.

**Sommario e spiegazione del test sono riportati in APPENDICE.**

### AVVERTENZE E PRECAUZIONI

#### Considerazioni generali:

- Per uso diagnostico *in vitro*.
- I flaconi di calibratori e controlli devono essere aperti il meno possibile per evitare l'evaporazione.
- Non utilizzare reattivi di lotti diversi.
- Non utilizzare i componenti oltre la data di scadenza indicata sull'etichetta.
- Inserire la curva standard in ogni esperimento.
- Eseguire il dosaggio in duplicato.
- Prima dell'uso, mescolare calibratori e controlli capovolgendoli o agitando delicatamente; non vortexarli.

#### Norme di radioprotezione

L'acquisto, la detenzione, l'utilizzo e il trasporto di materiale radioattivo sono soggetti a regolamentazione locale. Lo scrupoloso rispetto delle norme per l'uso di sostanze radioattive fornisce una protezione adeguata agli utilizzatori.

- Nei luoghi dove si usano sostanze radioattive non è consentito consumare cibi o bevande, fumare o usare cosmetici.
- Non pipettare con la bocca.
- Evitare ogni contatto con i materiali radioattivi usando guanti e camice da laboratorio.
- Tutte le manipolazioni di sostanze radioattive devono essere effettuate in un luogo appropriato, lontano da corridoi o altre aree affollate.
- Le sostanze radioattive devono essere conservate in propri contenitori in appositi locali che devono essere interdetti alle persone non autorizzate.
- Deve essere tenuto un registro di carico e scarico del materiale radioattivo.
- Il materiale di laboratorio e la vetreria deve essere dedicato all'uso di isotopi specifici per evitare cross-contaminazioni.
- In caso di contaminazione o dispersione di materiale radioattivo, fare riferimento alle norme locali di radioprotezione.
- I rifiuti radioattivi devono essere smaltiti secondo le norme locali di radioprotezione.

#### Sodio azide

Alcuni reattivi contengono sodio azide come conservante, che può reagire con piombo, rame o ottone presenti nelle tubature di scarico per formare metallo-azidi esplosivi. Smaltire questi reattivi facendo scorrere abbondante acqua negli scarichi.

#### Materiale di origine umana

Campioni di pazienti e prodotti emoderivati possono essere analizzati di routine con rischio minimo, osservando la procedura indicata. Tuttavia, maneggiare questi prodotti come fonte potenziale di infezione, indipendentemente dall'origine, dal trattamento o da precedente certificazione, adottando le precauzioni adeguate e seguendo le corrette pratiche cliniche di laboratorio. Per la decontaminazione, utilizzare un

disinfettante adeguato. Per la conservazione e lo smaltimento di queste sostanze e dei loro contenitori, attenersi scrupolosamente alle locali norme di legge in materia.

### CLASSIFICAZIONE PERICOLI GHS

Oxidation Solution



H411

Tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.

P273

Non disperdere nell'ambiente.

P391

Raccogliere il materiale fuoriuscito.  
Permanganato di potassio 1 - 5%

Sample Buffer

PERICOLO



H226

Liquido e vapori infiammabili.

H314

Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari.

P210

Tenere lontano da fonti di calore, superfici calde e scintille. Non fumare.

P280

Indossare guanti/indumenti protettivi. Proteggere gli occhi/il viso.

P301+P330+P331

IN CASO DI INGESTIONE: sciacquare la bocca. NON provocare il vomito.

P303+P361+P353

IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE (o con i capelli): lavare abbondantemente con acqua.

P305+P351+P338

IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI/un medico. Alcool etilico 10 - 20% Idrossido di sodio 20 - 30%

P310

**SDS**

La scheda tecnica sulla sicurezza è disponibile su [techdocs.beckmancoulter.com](http://techdocs.beckmancoulter.com)

### RACCOLTA, MANIPOLAZIONE, DILUIZIONE E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

- Raccogliere i campioni in provette senza anticoagulante o con EDTA.
- Lasciar coagulare completamente i campioni di siero prima della centrifugazione.
- Conservare i campioni a 2-8 °C fino a 24 ore oppure, suddivisi in aliquote, a -20 °C o a temperature inferiori per un massimo di 1 anno. Evitare ripetuti cicli di congelamento / scongelamento dei campioni. Lo scongelamento deve avvenire a temperatura ambiente.
- Estrarre i campioni prima di utilizzarli per il dosaggio, vedi § Procedura.
- Diluire con calibratore zero i campioni con concentrazioni di DHT superiori a quelle dell'ultimo calibratore.

- Sono stati comparati i valori di siero e di plasma anticoagulato con EDTA per 19 campioni (valori del siero compresi nel range da 53,75 a 341,5 pg/mL), usando il kit DSL9600i RIA. Sono stati ottenuti i risultati seguenti.

$$[\text{EDTA plasma}] = 0,9592[\text{siero}] + 31,583 \quad R = 0,9783$$

## MATERIALI FORNITI

I reattivi, conservati a 2-8 °C, sono stabili fino alla data di scadenza riportata sul kit. Le date di scadenza riportate sulle etichette di ciascun flacone si riferiscono alla conservazione dei reattivi stabilita in produzione, prima del loro inserimento nel kit.

Le modalità di conservazione dei reattivi, una volta aperti sono riportate nel paragrafo corrispondente.

**Provette sensibilizzate con anticorpo anti-DHT: 2 x 50 provette** (pronte per l'uso)

Provette di plastica, sensibilizzate con immunoglobulina di coniglio anti-DHT, adesa alla parete interna di ogni provetta.

**Marcato 125I-DHT: un flacone 55 mL** (liofilizzato)

Il flacone contiene meno di 185 kBq (<5 µCi), (alla data di marcatura) di 125I-DHT in tampone con proteine (BSA) e sodio azide (<0,1%). Ricostituire il contenuto del flacone con 55 mL di acqua deionizzata. Conservare il marcato ricostituito a 2-8 °C per un massimo di due settimane in modo tale da mantenere la massima capacità legante (%B<sub>0</sub>/T) > 25%.

**Calibratori: un flacone da 50 mL (0)** (pronto per l'uso) + **7 flaconi (1-7)** (liofilizzati)

I flaconi contengono DHT a concentrazioni comprese tra 0 e circa 2500 pg/mL (0 e circa 8600 pmol/L) in tampone con proteine (BSA) e sodio azide (<0,1%). L'esatta concentrazione dei calibratori è riportata sulle etichette di ciascun flacone. I Valori dei calibratori sono stati determinati utilizzando materiale di riferimento certificato (Cerilliant). **NON ESTRARRE I CALIBRATORI PRIMA DI UTILIZZARLI PER IL DOSAGGIO.**

**Controlli: due flaconi (1, 2)** (liofilizzati)

I flaconi contengono DHT in siero umano con sodio azide (<0,1%). I valori attesi sono riportati sul foglio del controllo di qualità. **ESTRARRE I CONTROLLI PRIMA DI DOSARLI.** Vedi § Procedura.

**Soluzione di Ossidazione: due flaconi da 25 mL** (pronti per l'uso)

Flaconi contenenti una soluzione di permanganato di potassio (<5 %) in tampone con sodio azide (<0.1 %).

**DHT Sample Buffer: un flacone da 5,5 mL** (pronto per l'uso)

Il flacone contiene un tampone con <23 % di Alcol Etilico e <29 % di Idrossido di Sodio.

## MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

Oltre alla normale attrezzatura da laboratorio, è richiesto il materiale seguente:

- Provette da 12 x 75 mm o 13 x 100 mm, o 16 x 150 mm in vetro dotate di tappi di sicurezza
- portaprovette per provette da 12 x 75 mm
- Acqua deionizzata.
- Micropipette di precisione (100 µL, 250 µL, 400 µL)
- pipette semi-automatiche (500 µL).
- Agitatore tipo vortex.
- Pipette graduate di vetro da 5 mL – **UTILIZZATE NELL'ESTRAZIONE**
- Solventi organici: n-Esano ed Etanolo (per HPLC)
- centrifuga (1500 x g, preferibilmente refrigerata)
- Azoto o sistema speed-vac con dispositivo di riscaldamento (per le estrazioni)
- agitatore (con una capacità di ≥ 180 rpm)
- rack per la decantazione o dispositivo simile
- Sistema di aspirazione.
- materiale assorbente per tamponare le provette
- Contatore gamma programmato per leggere <sup>125</sup>I.
- carta semilogaritmica (log-lineare) oppure software adatto all'analisi dei dati del dosaggio radioimmunologico.

## RISULTATI

Le concentrazioni di diidrotestosterone nei campioni e controlli vengono calcolate per interpolazione sulla curva standard. Dosare i campioni e controlli assieme ai calibratori.

### Curva standard

I risultati contenuti in queste istruzioni sono stati calcolati usando come interpolazione log-lin (modo "spline"), con B/T % o B/B<sub>0</sub> % sull'asse verticale (asse delle ordinate) e le concentrazioni degli calibratori (pg/mL) sull'asse orizzontale (asse delle ascisse). Altri metodi di interpolazione dati possono dare risultati leggermente differenti.

$$\text{ED50} = 100.7 \text{ pg/mL}$$

Attività totale: 57 936 cpm				
Calibrators	DHT (pg/mL)	cpm (n=2)	B/T (%)	B/B <sub>0</sub> (%)
0	0	37,670	65,0	100
1	24,0	31,164	53,8	82,7
2	48,0	26,403	45,6	70,1
3	96,0	19,356	33,4	51,4
4	192	12,449	21,5	33,0
5	480	6,948	12,0	18,4
6	960	4,570	7,88	12,1
7	2,400	2,514	4,33	6,67

(Esempio di curva standard. Non usare per calcolare il valore dei propri campioni)

### Campioni

Calcolare B/T % o B/B<sub>0</sub> % per ogni campione, riportarlo sull'asse delle ordinate e leggere le concentrazioni corrispondenti sull'asse delle ascisse. Fattore di conversione per passare da pg/mL a pmol/L: Moltiplicare i risultati per 3,44.

## VALORI ATTESI

Uno studio interno su individui adulti sani, ha fornito le concentrazioni di DHT riportate nella tabella seguente; tali dati vengono qui descritti solo a titolo di esempio.

	Età	n	Mediana (pg/mL)	2,5% Percentile (pg/mL)	97,5% Percentile (pg/mL)	Intervallo (pg/mL)
Uomini	20 - 60	119	274,7	109,2	583,1	33,69 - 756,4
Donne	20 - 60	122	82,81	33,28	196,5	17,67 - 245,8

(Ulteriori dati sono riportati in appendice)

## CONTROLLO QUALITÀ

Si consiglia ad ogni laboratorio di dosare regolarmente sieri di controllo per verificare la qualità dei risultati ottenuti. Questi campioni devono essere manipolati esattamente come i campioni in esame; i risultati devono essere analizzati con metodi statistici appropriati.

Il mancato ottenimento di valori appropriati per i controlli, può indicare manipolazioni errate, trattamento inappropriato dei campioni o deterioramento dei reagenti. Nel caso di deterioramento dell'imballaggio o nel caso in cui i dati ottenuti mostrino una diminuzione di performance del prodotto, si prega di contattare il distributore locale o di riferirsi all'indirizzo e-mail imunochem@beckman.com

## PROCEDURA

### Preparazione dei reattivi

Equilibrare i reattivi a temperatura ambiente e mescolare le con cura.

### Ricostituzione di marcato

Ricostituire il contenuto di flacone con 55 mL di acqua deionizzata. Lasciar riposare per almeno 10 minuti e controllare la completa dissoluzione del liofilizzato invertendo più volte il flacone. Conservare a 2-8 °C per un massimo di due settimane.

### Ricostituzione di calibratori e di controlli

Ricostituire il contenuto dei flaconi con il volume di acqua deionizzata riportato sull'etichetta di ciascun flacone. Lasciar riposare per almeno 10 minuti e controllare la completa dissoluzione del liofilizzato invertendo più volte i flaconi. Conservare ad almeno <-20 °C fino alla data di scadenza del kit.

## Estrazione dei campioni

*Nota: Eseguire l'estrazione utilizzando provette DI VETRO pulite, preferibilmente monouso. Lasciar equilibrare a temperatura ambiente (18-25 °C) la Soluzione di Ossidazione e gli altri reattivi per l'estrazione prima dell'uso.*

Estrarre i campioni e i controlli del kit. **NON ESTRARRE I calibratori.**

- Numerare una provetta per ciascun campione e controllo.
- Aggiungere 400 µL di campione o controllo alle provette di vetro corrispondenti e pipettare 500 µL di Soluzione di Ossidazione. Vortexare vigorosamente e incubare per 15 minuti a temperatura ambiente (18-25 °C).
- Preparare la miscela di estrazione: 98% n-Esano e 2% Etanolo.
- Utilizzando una pipetta di vetro graduata, estrarre il campione ossidato aggiungendo 4.0 mL di miscela n-Esano/Etanolo (98% n-Esano; 2% Etanolo). Vortexare subito dopo ciascun campione per 1 minuto.
- Aggiungere 50 µL di Tampone DHT per i Campioni ("DHT Sample Buffer"), tappare le provette e mescolare delicatamente invertendole 3-4 volte.
- Centrifugare a 1500 X g per 15 minuti at 2-8 °C per separare la fase organica da quella acquosa.
- Trasferire 2,5 mL della fase organica superiore in provette di vetro pulite e numerate ed evaporare a secco, utilizzando o corrente di Azoto oppure un dispositivo speed-vac con dispositivo di riscaldamento.

Ricostituire il materiale essiccato con 250 µL del calibratore DHT zero. Agitare bene su vortex e conservare a temperatura ambiente (18-25°C) per almeno 1 ora.

### NOTA:

- NON ESTRARRE I CALIBRATORI DEL KIT.
- Utilizzare provette 12 x 75 mm o 13 x 100 mm di vetro con tappi di sicurezza. Nel caso in cui non siano disponibili i tappi di sicurezza, possono essere utilizzate provette 16 x 150 mm. Dopo l'estrazione, coprire le provette 16 x 150 mm con un foglio di alluminio per evitare l'evaporazione del solvente organico.
- Evitare di dosare campioni lipemici.

### Schema del dosaggio

Analizzare calibratori, controlli e campioni sconosciuti in duplicato.

Fase 1 Dispensazione	Fase 2 Incubazione	Fase 3 Conteggio
Estrarre campioni e controlli seguendo la procedura descritta al paragrafo Procedura.  Aggiungere in successione alle provette sensibilizzate:  100 µL di calibratori, controlli o campioni, immediatamente  500 µL di marcato.*  Vortexare tutte le provette.	Coprire e incubare a temperatura ambiente (18-25 °C) per 2 ore su un agitatore impostato sulla velocità di ≥180 rpm.  Aspirare o fare decantare, eccetto provette per le conte totali, capovolgendo contemporaneamente il rack di decantazione in un recipiente per rifiuti radioattivi.	Aggiungere 3.0 mL di acqua deionizzata in tutte le provette, ad eccezione di quelle per le conte totali.  Aspirare o fare decantare, eccetto provette per le conte totali, capovolgendo contemporaneamente il rack di decantazione in un recipiente per rifiuti radioattivi.  Picchiettare le provette con decisione su materiale assorbente per facilitare lo svuotamento completo.  Lasciar svuotare le provette su materiale assorbente per 2 minuti e tamponarne delicatamente il bordo.  Contare la radioattività legata (B) e l'attività totale (T) per 1 min.

\*Aggiungere 500 µL di marcato a 2 provette non sensibilizzate per la determinazione dell'attività totale.

## CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

(Ulteriori dati sono riportati in appendice)

Vengono forniti dati rappresentativi a mero scopo illustrativo. I risultati possono variare da laboratorio a laboratorio.

### Sensibilità

**Sensibilità analitica:** 9,14 pg/mL

**Sensibilità funzionale:** 19,63 pg/mL

### Specificità

L'anticorpo utilizzato in questo dosaggio è altamente specifico per DHT. Cross-reazioni molto basse sono state trovate per alcune molecole correlate (androstenedione, estradiolo e testosterone).

### Precisione

#### Intra-saggio

Alcuni campioni sono stati analizzati 25 volte in uno stesso esperimento. Per i campioni di siero è stato trovato un coefficiente di variazione del 7,9 % o inferiore.

#### Inter-saggio

Alcuni campioni sono stati analizzati in duplicato in 10 esperimenti differenti. E' stato trovato un coefficiente di variazione del 7,1 % o inferiore.

### Accuratezza

#### Test di diluizione

Alcuni campioni ad alta concentrazione di DHT sono stati diluiti serialmente con il calibratore zero. Il recupero è risultato essere compreso tra 80,5 % e 114 %.

#### Test di recupero

Ad alcuni campioni a bassa concentrazione di DHT sono state aggiunte quantità note di DHT. Il recupero è risultato essere compreso tra 88,0 % e 107 %.

**Campo di misura** (è compreso tra la concentrazione pari alla sensibilità analitica e la concentrazione del calibratore più elevato): 9,14 e circa 2500 pg/mL.

## LIMITAZIONI

- Seguire fedelmente le istruzioni d'uso per evitare risultati aberranti.
- Un'asciugatura non appropriata delle provette dopo la decantazione, può determinare replicati inadeguati e valori non attendibili.
- Evitare cicli ripetuti di congelamento e scongelamento dei reagenti o dei campioni.
- Non usare campioni emolizzati, itterici o lipemici.
- Se si rilevano segni di contaminazione microbica o torbidità eccessiva in un reagente, scartare il flaconcino.

# ACTIVE® Dihydrotestosterone RIA

**REF** DSL9600i

## RADIOINMUNOENSAYO PARA LA DETERMINACIÓN “IN VITRO” CUANTITATIVA DEL DIHYDROTESTOSTERONA (DHT) EN SUERO O PLASMA HUMANOS

Para uso en diagnóstico *in vitro*.

### PRINCIPIO

El radioinmunoensayo del dihydrotestosterona (DHT, 5 $\alpha$ -dihydrotestosterona, 17 $\beta$ -hidroxy-5 $\alpha$ -androstan-3-one) es un ensayo competitivo. El procedimiento sigue el principio básico del radioinmunoensayo, en donde existe una competencia entre un antígeno radiactivo y otro no radiactivo por un número fijo de sitios de unión a anticuerpos. La cantidad de DHT marcado con 125I unida al anticuerpo es inversamente proporcional a la concentración de DHT sin marcar presente en la muestra. La separación del antígeno libre del unido se realiza mediante una simple decantación o aspiración de los tubos recubiertos. Se prepara una curva estándar y los valores desconocidos se determinan mediante interpolación con dicha curva.

Para RESUMEN Y EXPLICACION DEL ENSAYO ver la página de “APENDICES”.

### ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

#### Precauciones generales

- Para uso diagnóstico *in vitro*.
- Los frascos con los calibradores y controles deben abrirse el menor tiempo posible para evitar evaporación.
- No mezclar los reactivos de lotes diferentes.
- No utilice ningún componente después de la fecha de caducidad indicada en su etiqueta.
- Incluir una curva estándar en cada ensayo.
- Se recomienda realizar el ensayo por duplicado.
- Los calibradores y controles deben mezclarse antes de su uso, para lo cual es mejor invertirlos o agitarlos suavemente en vez de vortexear (agitación fuerte).

#### Reglas básicas de seguridad radiológica

La compra, posesión, uso y transferencia de material radiactivo están sujetas a las disposiciones legales del país en el que se utiliza. El cumplimiento de las normas básicas de seguridad radiológica proporciona protección adecuada.

- No se debe comer, beber, fumar o aplicarse cosméticos en presencia de materiales radiactivos.
- No pipetear con la boca.
- Evitar cualquier contacto con materiales radiactivos mediante el uso de guantes y bata de laboratorio.
- Toda manipulación de material radiactivo debe realizarse en el lugar adecuado, alejado de corredores y espacios ocupados.
- Los materiales radiactivos deben almacenarse en el contenedor aprobado en una zona especializada.
- Se debe llevar y conservar actualizado un registro de las entradas y almacenamiento de todos los productos radiactivos.
- El equipo y material de vidrio de laboratorio que son objeto de contaminación se deben separar para evitar la contaminación con otros radioisótopos.
- Cada caso de contaminación radiactiva, o de pérdida de materiales radiactivos se debe resolver de acuerdo con los procedimientos establecidos.
- El desecho radiactivo debe manipularse de acuerdo a las reglas establecidas por el país donde se utiliza.

#### Azida de sodio

Algunos reactivos contienen azida de sodio como conservador. La azida de sodio puede reaccionar con el plomo, el cobre y el bronce para formar azidas

metálicas explosivas. Deseche los reactivos a través del sistema de drenaje mediante lavado con grandes cantidades de agua.

#### Material de origen humano

Las muestras de los pacientes y los hemoderivados pueden procesarse rutinariamente con un mínimo de riesgo utilizando el procedimiento descrito. No obstante, deben manipularse dichos productos como potencialmente infecciosos con arreglo a las precauciones universales y a las buenas prácticas de laboratorio clínico, independientemente de su origen, tratamiento o certificación previa. Debe utilizarse un desinfectante apropiado para la descontaminación. Deben conservarse y eliminarse dichos materiales y sus envases con arreglo a las normas y directrices locales.

### CLASIFICACIÓN DE MATERIAL PELIGROSO SEGÚN EL SGA

Oxidation Solution



H411

Tóxico para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.

P273

No dispersar en el medio ambiente.

P391

Recoger los vertidos.  
Permanganato potásico 1 - 5%

Sample Buffer

PELIGRO



H226

Líquido y vapores inflamables.

H314

Provoca graves quemaduras en la piel y lesiones oculares.

P210

Mantener alejado del calor, superficies calientes y chispas. No fumar

P280

Use guantes/ropa de protección y equipo de protección para los ojos/la cara.

P301+P330+P331

EN CASO DE INGESTIÓN: Enjuagar la boca. NO provocar el vómito.

P303+P361+P353

EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL (o el pelo): Enjuagar la piel con agua.

P305+P351+P338

EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuagar con agua cuidadosamente durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto cuando estén presentes y pueda hacerse con facilidad. Proseguir con el lavado.

P310

Llamar inmediatamente a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA o a un médico.



Alcohol etílico 10 - 20%  
Hidróxido de sodio 20 - 30%



La hoja de datos de seguridad está disponible en  
techdocs.beckmancoulter.com

## RECOLECCIÓN, PROCESAMIENTO, ALMACENAMIENTO Y DILUCION DE LAS MUESTRAS

- Se recomienda el uso tanto de muestrás séricas como plasmáticas EDTA.
- Permitir que las muestras de suero se coagulen completamente antes de su centrifugado.
- Las muestras pueden conservarse entre 2 °C y 8 °C si el ensayo se realiza dentro de las primeras 24 hs. Si las muestras requieren ser conservadas por un período mayor, se recomienda almacenar las mismas, a una temperatura  $\leq -20$  °C durante máximo de 1 año. Es fundamental el uso de alícuotas para así evitar congelamientos y descongelamientos sucesivos de las muestras séricas. La descongelación de las muestras debe realizarse a temperatura ambiente.
- Las muestras DEBEN SER EXTRAÍDAS previo al ensayo. Vea el Procedimiento.
- Toda muestra cuyo resultado sea mayor que el calibrador más alto debe ser cuidadosamente diluida con el calibrador 0 pg/mL y ser procesada nuevamente.
- Se compararon los valores en suero y plasma con EDTA de 19 muestras (valores séricos de 53.75 a 341.5 pg/mL) usando el equipo DSL9600i. Los resultados fueron los siguientes:

$$[\text{EDTA-plasma}] = 0.9592[\text{suero}] + 31.583 \quad R = 0.9783$$

## MATERIALES SUMINISTRADOS

Todos los reactivos provistos-sin abrir- son estables entre 2 y 8 °C hasta la fecha de caducidad del equipo, la cual se indica en la etiqueta externa. Las fechas de caducidad impresas sobre las etiquetas de los frascos son válidas sólo para el fabricante, durante su almacenamiento a largo plazo hasta antes del ensamblaje del equipo. No tener en cuenta.

Las condiciones de almacenaje para los reactivos una vez abiertos, se indican en los párrafos respectivos.

**Tubos recubiertos con anti-DHT (dihydrotestosterona): 2 x 50 tubos** (listos para usar).

Tubos de plástico recubiertos en su pared interna con la inmunoglobulina policlonal de conejo, anti-dihydrotestosterona.

**Trazador dihydrotestosterona marcado con 125I: 1 frasco x 55 mL** (líoofilizado)

El frasco contiene 185 kBq (<5  $\mu$ Ci), en el día de la elaboración, de DHT marcado con 125I en buffer proteico (albúmina sérica bovina) (BSA) con azida sódica (<0.1%). El contenido del vial se reconstituye con 55 mL de agua deionizada. Una vez reconstituido conserve el trazador entre 2-8 °C hasta un máximo de 14 días, de manera tal de alcanzar el máximo binding (%B<sub>0</sub>/T) > 25%.

**Calibradores: 1 frasco x 50 mL, rotulado 0** (listo para usar) + **7 frascos, rotulados 1-7** (líoofilizados)

Los frascos contienen desde 0 hasta aproximadamente 2,500 pg/mL (desde 0 hasta aproximadamente 8,600 pmol/L) de DHT en buffer proteico (albúmina sérica bovina) (BSA), con azida sódica (<0.1%). La concentración exacta se indica en la etiqueta de cada frasco. Los valores de los calibradores fueron establecidos utilizando material de referencia certificado (Cerilliant). NO extraiga los calibradores previo al ensayo.

**Controles: 2 frascos, (rotulados 1, 2)** (líoofilizados)

Los frascos contienen dihydrotestosterona en suero humano + azida sódica (<0.1%). La concentración exacta se indica en la hoja anexa. Los controles DEBEN ser extraídos previo al ensayo. Vea el Procedimiento.

**Solución Oxidativa: 2 frascos x 25 mL** (listos para usar)

Los frascos contienen permanganato de potasio (<5 % agente oxidativo) en un buffer con azida sódica (<0.1 %).

**Buffer para la Muestra: 1 frasco x 5.5 mL** (listo para usar)

El frasco contiene el buffer para la muestra con <23 % Alcohol etílico y <29 % Hidróxido de sodio.

## MATERIALES NECESARIOS, PERO NO SUMINISTRADOS

Además del equipo normal de laboratorio se requiere lo siguiente:

- Tubos de VIDRIO: 12 x 75 mm ó 13 x 100 mm ó 16 x 150 mm con tapa bien segura.
- Gradilla para tubos de ensayo de 12 x 75 mm
- Agua desionizada.
- Micropipetas de precisión (100  $\mu$ L, 250  $\mu$ L y 400  $\mu$ L).
- Pipeta semiautomática (500  $\mu$ L).
- Agitador tipo vórtex.
- Pipeta de VIDRIO graduada en 5 mL (**USAR EN LA EXTRACCIÓN**),
- Solventes Orgánicos: n-hexane y ethanol (grado para HPLC),
- Centrífuga (1500 x g, preferiblemente refrigerada)
- Gas Nitrógeno ó sistema de aceleración de la evaporación al vacío con calor (para el proceso extractivo).
- Agitador (adecuado para  $\geq 180$  rpm)
- Gradilla –absorbente- para decantación o dispositivo similar
- Sistema de aspiración.
- Material absorbente para secado de los tubos
- Contador gamma calibrado para I125.
- Papel gráfico semilogarítmico (logarítmico – lineal) o programa informático de análisis de datos de RIA.

## RESULTADOS

Los resultados se obtienen por interpolación con la curva estándar. La curva sirve para la determinación de las concentraciones de la DHT en las muestras medidas al mismo tiempo que los calibradores.

### Curva estándar

Los resultados que se muestran más abajo han sido obtenidos utilizando una curva de ajuste logarítmica–lineal (modo “spline”), en donde B/T (%) ó B/B<sub>0</sub> (%) corresponde al eje de las “y” (vertical) y las concentraciones de los calibradores de la DHT en pg/mL sobre el eje de las “X” (horizontal). El uso de otros tipos de cálculo pueden dar resultados ligeramente diferentes.

ED50 = 100.7 pg/mL

Actividad total: 57 936 cpm				
Calibrators	DHT (pg/mL)	cpm (n=2)	B/T (%)	B/B <sub>0</sub> (%)
0	0	37,670	65,0	100
1	24,0	31,164	53,8	82,7
2	48,0	26,403	45,6	70,1
3	96,0	19,356	33,4	51,4
4	192	12,449	21,5	33,0
5	480	6,948	12,0	18,4
6	960	4,570	7,88	12,1
7	2,400	2,514	4,33	6,67

(Ejemplo de curva estándar, no utilizar para realizar los cálculos)

### Muestras

Para cada muestra marcar sobre el eje vertical el B/T (%) o el B/B<sub>0</sub> (%) y sobre el eje horizontal, interpolar la correspondiente concentración de la DHT de las muestras en pg/mL. Para convertir de pg/mL a pmol/L, multiplicar los resultados por 3.44.

## VALORES ESPERADOS

Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia. En la Tabla de más abajo se informan los valores de DHT

realizados en un estudio interno de adultos saludables y se dan solamente como referencia.

	Edad	n	Mediana (pg/mL)	2.5% Percentilo (pg/mL)	97.5% Percentilo (pg/mL)	Rango (pg/mL)
Varón:	20 - 60	119	274,7	109,2	583,1	33,69 - 756,4
Hembra:	20 - 60	122	82,81	33,28	196,5	17,67 - 245,8

(Para mayores detalles ver la página de "APENDICES")

## CONTROL DE CALIDAD

Las buenas prácticas de los laboratorios implica que las muestras controles sean utilizadas en forma regular para así asegurar la calidad de los resultados que se obtengan. Dichas muestras controles deben ser procesadas de la misma manera que las muestras séricas de los pacientes. Y se recomienda que dichos resultados sean analizados utilizando métodos estadísticos apropiados.

Fallas en la obtención de valores adecuados para los controles podría indicar manipulaciones imprecisas, mal manejo de las muestras, ó deterioro de los reactivos. En caso de deterioro del embalaje o si los resultados obtenidos muestran un desarrollo alterado, por favor, contacte su distribuidor local ó utilice la siguiente dirección de e-mail: imunochem@beckman.com

## PROCEDIMIENTO

### Preparación de los reactivos

Antes de su uso, permita que todos los reactivos alcancen temperatura ambiente y mézclelos totalmente mediante una inversión suave.

### Preparación del Trazador

El contenido del vial se reconstituye con 55 mL de agua deionizada. Espere 10 minutos, y mezcle suavemente para evitar la formación de espuma antes de dispensar. Conserve el trazador entre 2-8 °C hasta un máximo de 14 días.

### Reconstitución de los calibradores y controles

Reconstituya los calibradores de 1-7 y los controles 1-2 con el volumen de agua deionizada señalado en la etiqueta. Espere 10 minutos, y mezcle suavemente para evitar la formación de espuma antes de dispensar. Consérvelos a <-20 °C hasta la fecha de vencimiento del equipo.

### Extracción de las muestras

*NOTA: la extracción debe ser procesada en material de VIDRIO limpio, preferentemente descartable ya sea para los tubos como para las pipetas. Permita que tanto la solución oxidativa como otros reactivos extractivos alcancen temperatura ambiente (18-25 °C) previo a su uso.*

*Tanto las muestras como los controles requieren extracción. NO EXTRAIGA LOS CALIBRADORES.*

- Numere un tubo por muestra ó control.
- Agregue 400 µL de muestra ó control a cada uno de los tubos ya rotulados, + 500 µL de la Solución Oxidativa. Agite completamente con el vortex e incube a Temperatura Ambiente (18-25 °C) durante 15 minutos.
- Prepare la mezcla extractiva: 98% de n-hexano + 2% de etanol.
- Utilice la pipeta de vidrio extraiga la muestra oxidada con el agregado de 4 mL de una mezcla de n-hexano-etanol (98% de hexano: 2% de etanol). agite enérgicamente (vortex) cada muestra, inmediatamente después, por el término de 1 minuto.
- Agregue 50 µL del Buffer para la Muestra provisto, tape los tubos y mezcle suavemente los tubos por inversión 3-4 veces.
- Centrifugue a 1500xg durante 15 minutos entre 2 °C y 8 °C (centrifuga refrigerada) para separar la capa orgánica de la acuosa.
- Transfiera 2.5 mL de la capa orgánica superior en tubos de vidrio limpios, rotulados apropiados para ser llevados a sequedad por evaporación utilizando, ya sea, gas nitrógeno ó, un dispositivo de aceleración de la evaporación al vacío + calor.

Reconstituir el material seco con 250 µL del Calibrador Cero de DHT. Mezcle completamente con Vortex y conserve a temperatura ambiente (18-25 °C) por al menos 1 hora.

NOTA:

- NO EXTRAIGA LOS CALIBRADORES PROVISTOS.

- Utilice solo tubos con tapa bien segura de 12 x 75 mm ó 13 x 100 mm. Si las tapas no se encuentran disponibles se pueden utilizar tubos de 16 x 150 mm. Después de la extracción, cubra con papel de aluminio los tubos de 16 x 150 mm para así evitar la evaporación del solvente orgánico.
- Evite procesar muestras lipémicas.

### Procedimiento del ensayo

Los calibradores, controles y muestras de concentración desconocida deben ser procesados en el ensayo por duplicado.

Paso 1 Adiciones	Paso 2 Incubación	Paso 3 Contaje
Extraiga las muestras y controles como se indica en la sección Procedimiento.  Agregue en el fondo de los tubos rotulados lo siguiente:  100 µL de calibradores, controles ó muestras, e inmediatamente después 500 µL de trazador.*  Agite con el vortex.	Tape e incube los tubos durante 2 horas a temperatura ambiente (18-25 °C) en un agitador a ≥180 rpm.  Aspire ó decante todos los tubos, (excepto los tubos de cuentas totales), mediante inversión simultánea con una gradilla absorbente-ó dispositivo similar-para decantación, volcando el contenido radiactivo dentro del dispositivo especial de recolección de residuos líquidos radiactivos.	Agregue 3.0 mL de agua deionizada a todos los tubos, excepto los tubos de cuentas totales (T)  Aspire ó decante todos los tubos, (excepto los tubos de cuentas totales), mediante inversión simultánea con una gradilla absorbente-ó dispositivo similar-para decantación, volcando el contenido radiactivo dentro del dispositivo especial de recolección de residuos líquidos radiactivos.  Golpee los tubos firmemente sobre un material absorbente para facilitar su drenaje completo.  Drene durante 2 minutos. Seque los tubos.  Determine con un contador gamma, las cpm unidas (B) y las cpm totales (T) durante 1 min.

\*Agregar 500 µL de trazador a 2 tubos adicionales para obtener las cpm totales.

## CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

(Para mayores detalles ver la página de "APENDICES")

Se facilitan datos representativos solo a modo de ejemplo. El rendimiento obtenido en los distintos laboratorios puede variar.

### Sensibilidad

**Sensibilidad Analítica:** 9.14 pg/mL

**Sensibilidad funcional:** 19.63 pg/mL

### Especificidad

El anticuerpo usado en este inmunoensayo es altamente específico para la dihidrotestosterona (DHT), presentando niveles extremadamente bajos de reacción cruzada con otras moléculas relacionadas (androstenediona, estradiol, testosterona, etc).

### Precisión

#### Intra- ensayo

Las muestras se evaluaron 25 veces en las mismas series. Los coeficientes de variación fueron ≤ 7.9 %.

#### Inter-análisis

Las muestras se evaluaron 10 veces en diferentes series. Los coeficientes de variación fueron iguales o por debajo de 7.1 %.

**Precisión****Prueba de dilución**

Las muestras muy concentradas se diluyeron serialmente con el calibrador cero. Los porcentajes de recuperación obtenidos fueron entre 80.5 % y 114%.

**Prueba de recuperación**

A muestras de baja concentración se les agregó cantidades conocidas de DHT. Los porcentajes de recuperación obtenidos fueron entre 88.0 % y 107%.

**Rango de medida** (desde la sensibilidad analítica del calibrador más alto): desde 9.14 hasta aproximadamente 2,500 pg/mL.

**LIMITACIONES**

- Siga atentamente las instrucciones de uso ya que de lo contrario, los resultados pueden verse afectados significativamente.

- No proceder con el buen secado de los tubos después de la decantación, puede arrojar duplicados y/o resultados erróneos.
  - Evite congelar y descongelar repetidamente los reactivos y las muestras.
  - No utilice muestras hemolizadas, ictéricas o lipémicas.
  - Descarte el vial, si hubiera evidencia de contaminación microbiana o una excesiva turbidez en el reactivo.
-

# ACTIVE® Dihydrotestosterone RIA

**REF** DSL9600i

## RADIOIMUNOENSAIO PARA DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA 'IN VITRO' DE DIHIDROTESTOSTERONA (DHT) EM SORO OU PLASMA HUMANO

Para fins de diagnóstico *in vitro*.

### PRINCÍPIO

O radioimunoensaio de dihidrotestosterona (5 $\alpha$ -Dihydrotestosterona; DHT; 17 $\beta$ -Hydroxy-5 $\alpha$ -androstano-3-ona) é um ensaio de competição. O procedimento segue o princípio básico de radioimunoensaio, onde existe competição entre um antígeno radioativo e um não radioativo por um número fixo de sítios de ligação ao anticorpo. A quantidade de substância dosada marcada com [125I] DHT ligada ao anticorpo é inversamente proporcional à concentração de DHT não marcada presente na amostra. A separação do antígeno livre e do ligado é feita utilizando-se a decantação ou aspiração dos tubos revestidos. Uma curva padrão é construída e os valores das amostras desconhecidas de DHT são obtidos a partir da curva por interpolação.

Para **SUMÁRIO E EXPLICAÇÃO DO TESTE** veja o **Apêndice**.

### AVISOS E PRECAUÇÕES

#### Orientações Gerais:

- Para fins de diagnóstico *in vitro*.
- Os frascos dos calibradores e controles devem estar abertos durante o menor tempo possível, de forma a evitar evaporação excessiva.
- Não misture os reagentes de kits de diferentes lotes.
- Não utilize qualquer componente para além da data de validade indicada no rótulo.
- Deve ser estabelecida uma curva padrão em cada ensaio.
- É recomendado que o ensaio seja feito em duplicado.
- Calibradores e Controles devem ser homogeneizados antes do uso por inversão ou por agitação suave ao invés do uso de vórtex.

#### Regras básicas de segurança para radiação

A compra, uso e transferência de material radioactivo estão sujeitos à regulamentação de cada país. A adesão às regras básicas de segurança para a radiação fornecem a protecção adequada:

- Não comer, beber, fumar ou aplicar cosméticos na presença de materiais radioativos.
- Não pipetar com a boca.
- Utilize luvas e bata para evitar qualquer contacto com materiais radioativos.
- A manipulação de substâncias radioativas deve ser efetuada em local apropriado e longe de corredores e outras zonas muito frequentadas.
- Materiais radioativos devem ser armazenados no frasco fornecido e em área designada.
- O registo de recepção e armazenamento de produtos radioativos devem ser mantidos atualizados.
- Equipamentos laboratoriais e vidrarias que estão sujeitas à contaminação devem ser separados para prevenir a contaminação cruzada de radioisótopos diferentes.
- Cada caso de contaminação ou perda de material radioativo deve ser efetuada de acordo com os procedimentos estabelecidos.
- Descarte dos reagentes e materiais deve ser de acordo com a regulamentação aplicável.

#### Azida Sódica

Alguns dos reagentes contêm azida de sódio como conservante. A azida de sódio reage com chumbo e cobre das canalizações e forma azidas metálicas altamente explosivas. Ao descartar os líquidos, deixe correr grande quantidade de água a fim de prevenir a formação destas azidas.

#### Soro Humano

As amostras dos doentes e os produtos hemoderivados podem ser analisados rotineiramente com riscos mínimos utilizando o procedimento descrito. Contudo, deve manusear estes produtos como potencialmente infecciosos de acordo com as precauções gerais e os métodos adequados de laboratórios clínicos, independentemente da origem, tratamento ou certificação anterior. Usar um desinfetante apropriado para a

descontaminação. Armazenar e eliminar estes materiais e os respectivos contentores segundo o regulamento e as normas locais.

## CLASSIFICAÇÃO DE PERIGO DO GHS

Oxidation Solution



H411

Tóxico para os organismos aquáticos com efeitos duradouros.

P273

Evitar a libertação para o ambiente.

P391

Recolher o produto derramado.  
Permanganato de Potássio 1 - 5%

Sample Buffer

PERIGO



H226

Líquido e vapor inflamáveis.

H314

Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves.

P210

Manter afastado do calor, superfícies quentes e faísca. Não fumar.

P280

Use luvas de proteção, vestuário de proteção e proteção ocular/proteção facial.

P301+P330+P331

EM CASO DE INGESTÃO: enxaguar a boca. NÃO provocar o vômito.

P303+P361+P353

SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE (ou o cabelo): enxaguar a pele com água.

P305+P351+P338

SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continuar a enxaguar.

P310

Contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico.

Álcool etílico 10 - 20%  
Hidróxido de sódio 20 - 30%

**SDS**

A SDS (FDS — Ficha de dados de segurança) está disponível em [techdocs.beckmancoulter.com](http://techdocs.beckmancoulter.com)

## COLHEITA, PROCESSAMENTO, ARMAZENAMENTO, E DILUIÇÃO DAS AMOSTRAS

- Colete em tubos contendo EDTA ou sem aditivos. Soro ou plasma é recomendado como amostra.
- Deixar as amostras de soro coagularem completamente antes da centrifugação.
- As amostras podem ser armazenadas de 2-8 °C, se o ensaio for realizado dentro de 24 horas. Para longos períodos mantenha congelado à <-20 °C, por até 1 ano após alíquotar as amostras, evitando assim os repetidos ciclos de descongelamento.

Descongelamento da amostra deve ser realizada à temperatura ambiente.

- As amostras devem ser extraídas antes do ensaio (veja § Procedimento).
- Qualquer amostra com leituras acima da maior concentração da curva deve ser diluída apropriadamente com o calibrador 0 pg/mL e ensaiada novamente.
- Os valores de 19 amostras de soro e plasma EDTA (valores séricos que variam de 53,75 a 341,5 pg/mL) foram comparados utilizando o kit DSL9600i. Os resultados são como se segue:

$$[\text{EDTA-plasma}] = 0.9592[\text{soro}] + 31.583 \text{ R} = 0.9783$$

## MATERIAIS FORNECIDOS

Todos os reagentes fechados do kit são estáveis até a data de validade apontada no rótulo do kit, quando armazenado de 2-8 °C. As datas de validade impressa nos rótulos são válidas, somente, para armazenamento dos componentes em longo prazo pelo fabricante.

As condições de armazenamento dos reagentes após abertos estão indicadas nos parágrafos apropriados.

**Tubos revestidos com Anticorpo anti-DHT: 2 x 50 tubos** (pronto para uso)

Tubos plásticos com imunoglobulina de coelho anti-DHT imobilizadas às paredes de cada tubo.

**Traçador DHT-[125I]: um frasco 55 mL** (liofilizado)

O frasco contém, na data de fabricação, 185 kBq (<5 µCi) de [125I] ligado ao DHT, em tampão com proteínas (BSA) e azida sódica (<0.1 %). O conteúdo do frasco é reconstituído com 55 mL de água deionizada. Depois de reconstituído armazenar de 2-8 °C por até duas semanas para que seja atingido o máximo de ligação (%B<sub>0</sub>/T) > 25%.

**Calibradores: um frasco 50 mL (0)** (pronto para uso) + **sete frascos (1-7)** (liofilizados)

O calibrador contém de 0 a, aproximadamente 2,500 pg/mL (0 a, aproximadamente 8,600 pmol/L) de DHT em tampão com proteínas (BSA) e azida sódica (<0.1 %). A concentração exata é indicada no rótulo de cada frasco. Os calibradores foram calibrados utilizando-se material de referência certificado (Cerilliant). NÃO EXTRAIR os calibradores antes do ensaio.

**Controles: dois frascos identificados 1,2** (liofilizados)

Os frascos contêm DHT em soro humano com azida (<0.1 %). Os valores esperados estão na faixa de concentração indicada em um suplemento. Os controles DEVEM SER EXTRAÍDOS antes do ensaio. Veja § Procedimento.

**Solução de Oxidação: dois frascos 25 mL** (pronto para uso)

Frascos contendo solução de permanganato de potássio (<5%) em um tampão com azida sódica (<0.1%).

**Tampão de Amostra: um frasco 5.5 mL** (pronto para uso)

Frasco contendo tampão com <23 % álcool etílico e < 29 % de hidróxido de Sódio.

## MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

Em adição ao material usual de laboratório, é ainda necessário:

- Tubos **DE VIDRO** para teste de 12 x 75 mm ou 13 x 100 mm ou 16 x 150 mm.
- Suporte para tubos 12 x 75 mm.
- Água desionizada.
- Micropipetas de Precisão (100 µL, 250 µL and 400 µL).
- Pipeta semi-automática (500 µL).
- Agitador tipo Vortex
- Pipeta Graduada de vidro 5 mL – **UTILIZADA NA EXTRAÇÃO.**
- Solventes Orgânicos: n-hexano e etanol (HLPC 'grade').
- Centrifuga (1500 x g, de preferência refrigerada).
- Comprimido azoto ou evaporador de vácuo para secar os extractos,
- Agitador capaz ≥ 180 rpm.
- Uma estante de espuma para decantação ou dispositivo similar.
- Sistema de Aspiração.

- Material absorvente para secagem dos tubos.
- Contador Gamma ajustado para iodo 125.
- Papel gráfico semi-log (log-linear) ou programa de análise de RIE.

## RESULTADOS

Os resultados são obtidos da curva padrão por interpolação. A curva fornece as concentrações de DHT nas amostras dosadas ao mesmo tempo dos calibradores.

### Curva Padrão

Os resultados no protocolo são calculados utilizando-se uma curva log-linear (modo "spline") com B/T (%) ou B/B<sub>0</sub> (%) em um eixo vertical e as concentrações de DHT dos calibradores no eixo horizontal (pg/mL). Outro método de análise de dados pode apresentar um resultado diferente.

ED50 = 100.7 pg/mL

Atividade Total: 57,936 cpm				
Calibrators	DHT (pg/mL)	cpm (n=2)	B/T (%)	B/B <sub>0</sub> (%)
0	0	37,670	65,0	100
1	24,0	31,164	53,8	82,7
2	48,0	26,403	45,6	70,1
3	96,0	19,356	33,4	51,4
4	192	12,449	21,5	33,0
5	480	6,948	12,0	18,4
6	960	4,570	7,88	12,1
7	2,400	2,514	4,33	6,67

(Exemplo de curva padrão, não utilize para cálculo)

### Amostras

Estabeleça a relação B/T (%) para cada amostra ou B/B<sub>0</sub> (%) no eixo vertical da curva padrão e leia a concentração de DHT correspondente da amostra no eixo horizontal em pg/mL. Para conversão para pmol/L: pg/mL x 3.44 = pmol/L.

## VALORES ESPERADOS

É sugerido que cada laboratório estabeleça seus próprios valores normais. Um estudo interno com adultos aparentemente saudáveis forneceu as concentrações de DHT mostradas na tabela abaixo e são fornecidos apenas como referência.

	Idade	n	Mediana (pg/mL)	2.5% Percentil (pg/mL)	97.5% Percentil (pg/mL)	Faixa (pg/mL)
Homens:	20 - 60	119	274,7	109,2	583,1	33,69 - 756,4
Mulheres:	20 - 60	122	82,81	33,28	196,5	17,67 - 245,8

(Para mais detalhes, veja o data sheet "APPENDIX")

## CONTROLO DE QUALIDADE

As boas práticas de laboratório implicam a execução regular do controlo para garantir a qualidade dos resultados obtidos. Estes controlos devem ser processados exactamente como as amostras do ensaio, e é recomendado que seus resultados sejam analisados utilizando um método estatístico adequado.

Falha na obtenção de valores apropriados para os controlos podem indicar manipulação inadequada ou deterioração do reagente. Em caso de deterioração da embalagem ou se o dado obtido mostrar alguma alteração de desempenho, por favor, contate o distribuidor local ou utilize o seguinte endereço de e-mail: imunochem@beckman.com

## PROCEDIMENTO

### Preparação dos Reagentes

Deixe todos os reagentes atingirem a temperatura ambiente e homogenize bem por suave inversão antes do uso.

### Reconstituição do traçador

O conteúdo do frasco é reconstituído com 55 mL de água deionizada. Aguarde 10 min e misture suavemente evitando espuma antes da pipetagem. Armazenar as soluções reconstituídas de 2-8 °C por até duas semanas

## Reconstituição dos calibradores e amostras controle.

O conteúdo do frasco é reconstituído com o volume de água deionizada indicado no rótulo. Aguarde 10 minutos e misture gentilmente evitando espuma antes da pipetagem. Depois de reconstituído armazenar à <-20 °C até a data validade do kit

Extração das amostras

*NOTA: A extração deve ser feita em vidraria limpa, preferencialmente descartável. Deixe os reagentes Solução de Oxidação e outros reagents de extração a temperatura ambiente (18-25 °C) antes do uso.*

*Somente as amostras e controles requerem extração. Não extraia os calibradores.*

- Númere um tubo para cada amostra.
- Adicione 400 µL de amostra ou controle aos tubos numerados e adicione 500 µL de Solução de Oxidação. Vortex e incube à temperatura ambiente (18-25 °C) por 15 minutos.
- Preparar da mistura de n-hexano-etanol homogeneize: 98% hexano: 2% ethanol
- Extraia a amostra oxidada por adição da mistura de n-hexano-etanol homogeneize (98% hexano: 2% ethanol) no total de 4 mL. Utilize pipeta de vidro. agite em vórtex cada amostra imediatamente por 1 minuto.
- Adicione 50 µL de Tampão de Amostra, tampe os tubos e homogeneize por suave inversão de 3-4 vezes.
- Centrifugue à 1500 X g por 15 minutos de 2-8 °C para separar a camada orgânica da aquosa.
- Transfira 2.5 mL da camada orgânica superior em tubos de vidro limpos apropriados e identificados e evapore até secar, usando ou gas nitrogênio ou um vácuo com aquecimento.

Reconstitua o material seco com 250 µL de Diluente de amostra (calibrador Zero). Completamente vórtice e manter à temperatura ambiente (18-25 °C), pelo menos 1 hora.

NOTA:

- NÃO EXTRAIA OS PADRÕES
- Use tubos de 12 x 75 mm ou 13 x 100 mm com tampas. Se as tampas não estiverem disponíveis tubos de 16 x 150 mm podem ser usados. Após extração, cubra o tubo de 16 x 150 mm com papel alumínio para evitar a evaporação do solvente orgânico.
- Evite a utilização de amostras lipêmicas.

## Procedimento de Ensaio

Ensaia os Calibradores, Controles e amostras de pacientes em duplicata.

Passo 1 Pipetagens	Passo 2 Incubação	Passo 3 Contagem
Extraia as amostra e controles como especificado na seção Procedimento. Nos tubos revestidos adicione sucessivamente:  100 µL de calibrador, controles ou amostras,  imediatamente adicione 500 µL do marcador.*  Agite em vórtex todos os tubos.	Cubra e incube 2 horas em um agitador (≥180 rpm) à temperatura ambiente (18-25 °C). Decantar ou aspirar todos os tubos, (exceto tubos de contagem total «total cpm»), Poe inversão simultânea com uma raque a um recipiente de descarte de radioativos.	Adicione 3 mL de água deionizada para todos os tubos, exceto os de contagem total. Decantar ou aspirar todos os tubos, (exceto tubos de contagem total «total cpm»), Poe inversão simultânea com uma raque a um recipiente de descarte de radioativos. Bata os tubos vigorosamente em papel absorvente para facilitar a completa drenagem. Aspire o decante em material absorvente por 2 minutos e gentilmente bata os tubos. Conte a cpm ligada (B) e a cpm total (T) por 1 minuto.

\*Adicione 500 µL do marcador a 2 tubos adicionais para obter "cpm total".

## CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

(Para mais detalhes, veja o data sheet "APPENDIX")

São fornecidos dados representativos apenas para fins ilustrativos. O desempenho pode variar de um laboratório para outro.

### Sensibilidade

**Sensibilidade analítica:** 9.14 pg/mL

**Sensibilidade funcional:** 19.63 pg/mL

### Especificidade

O anticorpo usado no imunoensaio é altamente específico para DHT. Foram obtidas reatividades cruzadas extremamente baixas com os seguintes compostos: (androstenediona, estradiol, testosterona, etc).

### Precisão

#### Intra-ensaio

Amostras foram testadas 25 vezes na mesma série. Os coeficientes de variação encontrados foram ≤ 7.9 %.

#### Inter-ensaio

As amostras foram analisadas em duplicado em 10 ensaios diferentes. Os coeficientes de variação obtidos foram ≤ 7.1 %.

### Exactidão

#### Teste de Diluição

Altas concentrações foram diluídas em série com o calibrador zero. As porcentagens de recuperação obtidas estão entre 80.5 % e 114 %.

#### Teste de Recuperação

Em baixas concentrações foram adicionadas quantidades conhecidas de DHT. As porcentagens de recuperação obtidas estão entre 88.0 % e 107 %.

**Intervalo de dosagem** (da sensibilidade analítica ao calibrador mais alto) 9.14 a, aproximadamente 2,500 pg/mL.

## LIMITAÇÕES

- O não cumprimento das instruções deste protocolo pode afectar significativamente os resultados.
- Falha na decantação dos tubos pode resultar e duplicatas pobres e resultados errôneos. - Os resultados devem ser interpretados com a clareza de toda apresentação clínica do paciente, incluindo história clínica, dados de testes adicionais e outras informações apropriadas.
- Evite repetidos ciclos de congelamento e descongelamento de amostras.
- Não use amostras hemolizadas, ictericas ou lipêmicas.
- Se existir evidência de contaminação microbiana ou turvação excessiva num reagente, elimine o tubo.

# ACTIVE® Dihydrotestosterone RIA

**REF** DSL9600i

## ΑΝΟΣΟΡΑΔΙΟΜΕΤΡΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ IN VITRO ΤΗΣ ΔΙΥΔΡΟΞΥΤΕΣΤΟΣΤΕΡΟΝΗΣ ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΟΡΟ ΚΑΙ ΠΛΑΣΜΑ

Για διαγνωστική χρήση *in vitro*.

### ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Η διαδικασία ακολουθεί τη βασική αρχή του ανοσολογικού προσδιορισμού όπου υπάρχει ανταγωνισμός μεταξύ ενός ραδιενεργού και ενός μη ραδιενεργού αντιγόνου για έναν καθορισμένο αριθμό θέσεων δέσμευσης αντισωμάτων. Η ποσότητα της σημασμένης με [1-125] διυδροξυτεστοστερόνη που είναι δεσμευμένη στο αντίσωμα είναι αντιστρόφως ανάλογη προς τη συγκέντρωση της υπάρχουσας ανδροστενεδιόνης. Ο διαχωρισμός ελεύθερου και δεσμευμένου αντιγόνου επιτυγχάνεται μέσω μετάγγισης ή αναρρόφησης των επιστρωμένων με αντίσωμα σωληναρίων.

Βλέπε τη σελίδα "APPENDIX" Περιληψη και επεξηγηση της εξετασης

### ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

Γενικές παρατηρήσεις:

- Για διαγνωστική χρήση *in vitro*.
- Τα φιαλίδια με τα βαθμονομητές και τα δείγματα ελέγχου πρέπει να ανοίγονται για όσο μικρότερο χρονικό διάστημα γίνεται, ώστε να αποφεύγεται η εξάτμιση.
- Μην ανακατεύετε αντιδραστήρια από διαφορετικές παρτίδες.
- Μη χρησιμοποιείτε οποιοδήποτε αντιδραστήριο μετά την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα του.
- Κάνετε ταυτόχρονα την πρότυπη καμπύλη και τον ποσοτικό προσδιορισμό των δειγμάτων.
- Σας συστήνεται να πραγματοποιείτε δύο φορές τον κάθε προσδιορισμό.
- οι βαθμονομητές και οι οροί ελέγχου πρέπει να ανακατεύονται ελεφρά με το χέρι παρά να γίνεται χρήση του vortex.

#### Προστασία από την ιονίζουσα ακτινοβολία

Η αγορά, η κατοχή, η χρήση και η μεταφορά του ραδιενεργού υλικού υπόκεινται στους κανονισμούς της χώρας στην οποία το υλικό αυτό χρησιμοποιείται. Η συμμόρφωση με τους βασικούς κανόνες ασφάλειας από την ακτινοβολία παρέχει επαρκή προστασία :

- Υπό την παρουσία ραδιενεργών υλικών, μην καταναλώνετε τρόφιμα ή ποτά, μην καπνίζετε και μη χρησιμοποιείτε καλλυντικά.
- Μην αναρροφείτε υγρά του εργαστηρίου με το στόμα δίκην πιπέτας.
- Αποφύγετε κάθε επαφή με ραδιενεργά υλικά, και χρησιμοποιείτε γάντια και εργαστηριακή μπλούζα.
- Κάθε χειρισμός ραδιενεργών ουσιών πρέπει να γίνεται σε κατάλληλο χώρο, μακριά από διαδρόμους και άλλα πολυσύχναστα μέρη.
- Το αρχείο παραλαβής και αποθήκευσης ραδιενεργών υλικών πρέπει να είναι πάντα ενημερωμένο.
- Το αρχείο παραλαβής και αποθήκευσης ραδιενεργών υλικών πρέπει να είναι πάντα ενημερωμένο.
- Ο εργαστηριακός εξοπλισμός ή τα γυάλινα σκεύη που έχουν μολυνθεί από ραδιενεργά υλικά πρέπει να απομονώνονται, προκειμένου να αποφευχθεί μόλυνση από διαφορετικά ραδιοϊσότοπα.
- Κάθε περίπτωση ραδιενεργής μόλυνσης ή απώλειας ραδιενεργού υλικού θα πρέπει να επιλύεται με βάση τις ισχύουσες διαδικασίες.
- Ο χειρισμός των ραδιενεργών αποβλήτων πρέπει να ακολουθεί τους κανονισμούς της χώρας στην οποία χρησιμοποιείται το ραδιενεργό υλικό.

#### Αζίδιο του Νατρίου

Κάποια αντιδραστήρια περιέχουν αζίδιο του Νατρίου ως συντηρητικό. Το αζίδιο του Νατρίου μπορεί να αντιδράσει με το χαλκό ή το μόλυβδο

προς το σχηματισμό εκρηκτικών αζιδίων των μετάλλων. Η απόρριψη των αντιδραστηρίων πρέπει να γίνεται μέσα από το υδραυλικό σύστημα, χρησιμοποιώντας μεγάλες ποσότητες νερού.

#### Υλικό ανθρώπινης προέλευσης

Η επεξεργασία των δειγμάτων ασθενών και των προϊόντων που προέρχονται από αίμα μπορεί να γίνει τακτικά με ελάχιστη πιθανότητα κινδύνου χρησιμοποιώντας τη διαδικασία που περιγράφηκε προηγουμένως. Ωστόσο, χειριστείτε τα προϊόντα αυτά ως πιθανές μολυσματικές ουσίες σύμφωνα με τις γενικές προφυλάξεις και τις καλές τακτικές κλινικών εργαστηρίων ανεξάρτητα από την προέλευση, το χειρισμό ή την προηγούμενη πιστοποίησή τους. Για απολύμανση χρησιμοποιήστε ένα κατάλληλο μέσο αφαίρεσης επικινδύνων ή ανεπιθύμητων προσμίξεων. Φυλάξτε και απορρίψτε τα υλικά αυτά και τους περιέκτες τους σύμφωνα με τους τοπικούς κανονισμούς και τις κατευθυντήριες γραμμές.

### ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΕΠΙΚΙΝΔΥΝΟΤΗΤΑΣ ΚΑΤΑ ΠΕΣ

Oxidation Solution



H411

Τοξικό για τους υδρόβιους οργανισμούς, με μακροχρόνιες επιπτώσεις.

P273

Να αποφεύγεται η ελευθέρωση στο περιβάλλον.

P391

Μαζέψτε τη χυμένη ποσότητα.

Υπερμαγγανικό κάλιο 1 - 5%

Sample Buffer

ΚΙΝΔΥΝΟΣ



H226

Υγρό και ατμοί εύφλεκτα.

H314

Προκαλεί σοβαρά δερματικά εγκαύματα και οφθαλμικές βλάβες.

P210

Μακριά από θερμότητα, θερμές επιφάνειες και σπινθήρες. Μην καπνίζετε.

P280

Να φοράτε προστατευτικά γάντια/προστατευτικά ενδύματα και μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια/το πρόσωπο.

P301+P330+P331

ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΚΑΤΑΠΟΣΗΣ: ξεπλύνετε το στόμα. ΜΗΝ προκαλέσετε εμετό.

P303+P361+P353

ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΟ ΔΕΡΜΑ (ή με τα μαλλιά): ξεπλύντε την επιδερμίδα με νερό.

P305+P351+P338

ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΑ ΜΑΤΙΑ: ξεπλύντε προσεκτικά με νερό για αρκετά λεπτά. Εάν υπάρχουν φακοί επαφής, αφαιρέστε τους, εφόσον είναι εύκολο. Συνεχίστε να ξεπλένετε.

P310

Καλέστε αμέσως το ΚΕΝΤΡΟ ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΕΩΝ ή ένα γιατρό.

## ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ ΑΛΛΑ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

Ο απαιτούμενος εργαστηριακός εξοπλισμός, επιπλέον του συνήθους, είναι ο εξής:

- Γυάλινα δοκιμαστικά σωληνάρια 12 x 75 mm ή 13 x 100 mm ή 16 x 150 mm και καπάκια ασφαλείας.
- Έδρανο σωληναρίων δοκιμασιών για 12 x 75 mm σωληνάρια.
- Απιονισμένο νερό.
- Μικροπιπέτες ακριβείας (100 µL, 250 µL, 400 µL).
- Ημι-αυτόματη πιπέτα (500 µL).
- Μίξερ τύπου vortex.
- 5ml διαβαθμισμένες γυάλινες πιπέτες. **Χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση.**
- Οργανικοί διαλύτες: n-hexane and αιθυλική αλκοόλη (HPLC grade).
- Φυγόκεντρος (1500 x g, κατά προτίμηση με ψύξη).
- Αέριο άζωτο ή συσκευή κενού αέρος με θέρμανση (για την εκχύλιση).
- Μείκτης ικανός για ≥ 180 gpm
- Ένα έδρανο με σπόγγο ή παρόμοια συσκευή για απόχυση.
- Σύστημα απόχυσης.
- Απορροφητικό υλικό για σωληνάρια ανοσοαποτύπωσης (blotting).
- Gamma counter, σεντ για Ιώδιο 125.
- Ημιλογαριθμικό (log-linear) χαρτί ή ηλεκτρονικό πρόγραμμα ανάλυσης δεδομένων RIA.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα των δειγμάτων υπολογίζονται με παρεμβολή στην πρότυπη καμπύλη. Η καμπύλη χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων DHT σε δείγματα που μετρώνται ταυτόχρονα με τα βαθμονομητές.

### Πρότυπη καμπύλη

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται σε αυτό το φυλλάδιο υπολογίστηκαν με τη χρήση log-lin (μέθοδος "spline") καμπύλης προσαρμογής με το λόγο B/T (%) ή B/B<sub>0</sub> (%) στον κάθετο άξονα, και τις συγκεντρώσεις DHT των βαθμονομητών (pg/mL) στον οριζόντιο άξονα. Άλλες μέθοδοι αναγωγής δεδομένων μπορεί να οδηγήσουν σε ελαφρώς διαφορετικά αποτελέσματα.

ED50 = 100.7 pg/mL

Ολική ραδιενέργεια: 57,936 cpm				
Calibrators	DHT (pg/mL)	cpm (n=2)	B/T (%)	B/B <sub>0</sub> (%)
0	0	37,670	65,0	100
1	24,0	31,164	53,8	82,7
2	48,0	26,403	45,6	70,1
3	96,0	19,356	33,4	51,4
4	192	12,449	21,5	33,0
5	480	6,948	12,0	18,4
6	960	4,570	7,88	12,1
7	2,400	2,514	4,33	6,67

(Παράδειγμα τυπικής καμπύλης, μην την χρησιμοποιείτε για υπολογισμούς)

### Δείγματα

Σημειώστε τον λόγο B/T ή B/B<sub>0</sub> στον κάθετο άξονα, έπειτα το αντίστοιχο σημείο στην καμπύλη και διαβάστε στον οριζόντιο άξονα την αντίστοιχη συγκέντρωση διυδροξυτεστοστερόνης σε pg/mL. Για να μετατρέψετε τις συγκεντρώσεις από pg/mL στο pmol/L, πολλαπλασιάστε τα αποτελέσματα με 3.44.

## ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ

Προτείνουμε το κάθε εργαστήριο να καθιερώσει τις δικές του τιμές αναφοράς. Μια εσωτερική μελέτη σε υγιείς ενήλικες έδωσε συγκεντρώσεις



Το Δελτίο δεδομένων ασφαλείας είναι διαθέσιμο στη διεύθυνση techdocs.beckmancoulter.com

## ΣΥΛΛΟΓΗ, ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ, ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΚΑΙ ΑΡΑΙΩΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

- Θα πρέπει να χρησιμοποιείται ορός ή πλάσμα (EDTA) και θα πρέπει να τηρούνται οι συνήθειες προφυλάξεις για φλεβοπαράκντηση.
- Αφήστε τα δείγματα ορού να πήξουν εντελώς πριν τη φυγοκέντρωση.
- Τα δείγματα ορού μπορούν να διατηρηθούν στους 2-8 °C, αν η εξέταση πρόκειται να γίνει σε 24 ώρες. για μεγαλύτερο χρόνο διατήρησης καταψύχτε στους -20 °C για μεγαλύτερες περιόδους, για 1 χρόνο το πολύ. Ενδύκνεται η δημιουργία ισομερών δόσεων, έτσι ώστε να αποφευχθεί η επαναλαμβανόμενη ψύξη και απόψυξη. Η απόψυξη των δειγμάτων πρέπει να γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου.
- Τα δείγματα αποσπάστε πριν από τον προσδιορισμό. δείτε ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ
- Αν τα δείγματα που έχουν αναλυθεί έχουν μεγαλύτερη συγκέντρωση από το βαθμονομητο με την υψηλότερη συγκέντρωση, πρέπει να αραιωθούν στο μηδενικό βαθμονομητο.
- τιμές από ορό και πλάσμα EDTA από 19 δείγματα (οι τιμές ορού είναι μεταξύ 53.75 με 341.5 pg/mL) συγκρίθηκαν χρησιμοποιώντας το DSL9600i kit. Τα αποτελέσματα έχουν ως εξής,

[EDTA- πλάσμα] = 0.9592[ορού] + 31.583 R = 0.9783

## ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ

Όλα τα αντιδραστήρια είναι σταθερά μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα του kit, όταν αποθηκεύονται σε θερμοκρασία 2-8 °C. Οι ημερομηνίες λήξης που αναγράφονται στις ετικέτες των φιαλιδίων αφορούν αποκλειστικά στη μακροπρόθεσμη αποθήκευση των αντιδραστηρίων από τον κατασκευαστή, πριν από τη συναρμολόγηση του kit. Να μη λαμβάνονται υπόψη.

Οι συνθήκες φύλαξης των αντιδραστηρίων που έχουν ανοιχτεί υποδεικνύονται στις αντίστοιχες ενότητες.

**Σωληνάρια επιστρωμένα με αντι- διυδροξυτεστοστερόνη: 2 x 50 σωληνάρια** (έτοιμα προς χρήση)

Πλαστικά σωληνάρια με ανοσοσφαιρίνη αντι-διυδροξυτεστοστερόνη κουνελίου ακινητοποιημένη στο εσωτερικό τοίχωμα κάθε σωληναρίου.

**Ιχνηθέτης διυδροξυτεστοστερόνης επισημασμένο με 125I: 1 φιαλίδιο των 55 mL** (λυοφιλημμένα)

Το φιαλίδιο περιέχει, την ημέρα που παρασκευάζεται, 185 kBq (<5 µCi), επισημασμένο με 125I- διυδροξυτεστοστερόνη σε ρυθμιστικό που περιέχει πρωτεΐνες, αζίδιο του Νατρίου (<0.1 %). Η ανασύσταση του ιχνηθέτη με 55 mL απιονισμένου νερού. Μετά την ανασύσταση, φυλάσσετε σε 2-8 °C σε 2 εβδομάδες για να επιτευχθεί η μέγιστη δέσμευσης (% B<sub>0</sub>T) > 25%.

**Βαθμονομητές: 1 φιαλίδιο των 50 mL (0)** (έτοιμο προς χρήση) **+7 φιαλίδια (1-7)** (λυοφιλημμένα)

Τα βαθμονομητές φιαλίδια περιέχουν μεταξύ 0 μέχρι κατά προσέγγιση 2,500 pg/mL (0 μέχρι κατά προσέγγιση 8,600 pmol/L) διυδροξυτεστοστερόνη σε ρυθμιστικό που περιέχει πρωτεΐνες, αζίδιο του Νατρίου (<0.1 %). Οι ακριβείς συγκεντρώσεις αναγράφονται στην ετικέτα κάθε φιαλιδίου. Οι τιμές των βαθμονομητών καθορίστηκαν με τη χρήση πιστοποιημένου υλικού αναφοράς (Cerilliant). ΜΗΝ εκχυλίσετε τους βαθμονομητές πριν την χρήσης τους.

**Ορός ελέγχου: 2 φιαλίδια (1, 2)** (λυοφιλημμένα)

Τα φιαλίδια περιέχουν διυδροξυτεστοστερόνη αφυδατωμένη σε ανθρώπινο ορό με αζίδιο του Νατρίου (<0.1%). Οι αναμενόμενες τιμές είναι στη σειρά συγκέντρωσης που αναγράφεται στο συμπλήρωμα. Οι οροί ελέγχου πρέπει να εκχυλιστούν πριν τη χρήση τους. δείτε ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

**Διάλυμα οξείδωσης: δύο 25 mL φιαλίδια** (έτοιμα προς χρήση)

Τα φιαλίδια περιέχουν υπερμαγγανικό κάλιο (<5 %) σε ρυθμιστικό διάλυμα αζιδίου του νατρίου (<0.1 %).

**Ρυθμιστικό διάλυμα: 1 φιαλίδιο των 5.5 mL** (έτοιμο προς χρήση)

Το φιαλίδιο περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα με <23 % αιθυλική αλκοόλη και <29 % υπεροξείδιο του νατρίου.



διυδροϋστεοστερόνης όπως παραθέτονται στον παρακάτω πίνακα και διατίθενται μόνο ως αναφορά.

	Ηλικία	n	Διάμεση τιμή (pg/mL)	2.5% εκατοστημόριο (pg/mL)	97.5% εκατοστημόριο (pg/mL)	σειρά (pg/mL)
άντρες:	20 - 60	119	274,7	109,2	583,1	33,69 - 756,4
γυναίκες:	20 - 60	122	82,81	33,28	196,5	17,67 - 245,8

(Για περισσότερες λεπτομέρειες, βλ. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ)

## ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Σύμφωνα με τις καλές εργαστηριακές πρακτικές τα δείγματα ελέγχου πρέπει να χρησιμοποιούνται τακτικά για να διασφαλίζεται η ποιότητα των λαμβανόμενων αποτελεσμάτων. Η επεξεργασία των εν λόγω ορών ελέγχου πρέπει να γίνεται ακριβώς με τον ίδιο τρόπο όπως και για τα δείγματα των ασθενών και συνιστάται να γίνεται ανάλυση των αποτελεσμάτων με τη χρήση των κατάλληλων στατιστικών μεθόδων.

Αποτυχία στο να αποκτήσετε τις αναμενόμενες τιμές των ορών ελέγχου μπορεί να καταλήξει σε ασαφείς χειρισμούς δειγμάτων ή υποβάθμιση των αντιδραστηρίων. Σε περίπτωση φθοράς της συσκευασίας ή αν παρατηρηθεί μεταβολή στην απόδοση των δεδομένων, παρακαλούμε να έρθετε σε επαφή με την τεχνική μας υπηρεσία: E-mail: imunochem@beckmancoulter.com

## ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

### Προετοιμασία αντιδραστηρίων

Αφήστε τα αντιδραστήρια να επανέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου και αναμείξτε καλά αναστρέφοντας ελαφρά το φιαλίδιο πριν τη χρήση.

### Ανασύσταση ιχνηθέτης

Το περιεχόμενο των φιαλιδίων ανασυστάται με 55 mL απεσταγμένου νερού που αναγράφεται στην ετικέτα. Περιμένετε 10 λεπτά μετά από την ανασύσταση και ανακατέψτε με προσοχή χωρίς να δημιουργηθεί αφρός, πριν τη διανομή του αντιδραστηρίου στα σωληνάρια. Μετά την ανασύσταση τους αποθήκευση στους 2-8 °C μέχρι 2 εβδομάδες.

### Ανασύσταση βαθμονομητών και των ορών ελέγχου

Το περιεχόμενο των φιαλιδίων ανασυστάται με τον όγκο απεσταγμένου νερού που αναγράφεται στην ετικέτα. Περιμένετε 10 λεπτά μετά από την ανασύσταση και ανακατέψτε με προσοχή χωρίς να δημιουργηθεί αφρός, πριν τη διανομή του αντιδραστηρίου στα σωληνάρια. Μετά την ανασύσταση τους αποθήκευση στους <math>-20\text{ }^\circ\text{C}</math> μέχρι την λήξη του kit.

### Εκχύλιση των δειγμάτων

*Παρατήρηση: Οι εκχυλίσεις πρέπει να χρησιμοποιούν καθαρές, κατά προτίμηση μιας χρήσης γυάλινες πιπέτες και σωληνάρια. Αφήστε το διάλυμα οξείδωσης και τα υπόλοιπα αντιδραστήρια για την εκχύλιση να πάρουν την θερμοκρασία δωματίου (18-25 °C), πριν τη χρήση.*

Τα δείγματα και οι οροί ελέγχου χρειάζονται εκχύλιση. ΜΗΝ εκχυλίσετε τους βαθμονομητές.

- αριθμισε ένα σωληνάριο για κάθε δείγμα ή ορό ελέγχου.
- προσθέστε 400 μL του δείγματος ή του ορού ελέγχου σε ένα αριθμημένο γυάλινο σωληνάρια και πρόσθεσε 500 μL διαλύματος οξείδωσης. Ανακινήστε και επωάστε σε θερμοκρασία δωματίου (18-25 °C) για 15 λεπτά.
- παρασκευάστε το μείγμα εκχύλισης: 98% n-hexane και 2% αιθυλική αλκοόλη.
- χρησιμοποιώντας μια γυάλινη πιπέτα, εκχυλίστε το οξειδωμένο δείγμα προσθέτοντας 4.0 mL n-hexane-ethanol mixture (98% hexane: 2% ethanol). Ανακινήστε κάθε δείγμα κατευθείαν για 1 λεπτό.
- προσθέστε 50 μL DHT ρυθμιστικού διαλύματος, καπακώστε τα σωληνάρια και αναμείξτε ελαφρά ανακινώντας τα σωληνάρια 3-4 φορές.
- Φυγοκεντρίστε στους 1500 X g για 15 λεπτά στους 2-8 °C για να αποχωριστεί το οργανικό τμήμα από το υδατικό.
- μεταφέρετε 2.5 mL του ανώτερου οργανικού τμήματος μέσα σε καθαρό γυάλινο σωληνάρια και εξαερώστε για να αποξηρανθεί, χρησιμοποιώντας αέριο άζωτο ή μηχανή κενού αέρος με θερμοκρασία το αποξηραμένο υλικό πρέπει να ανασυσταθεί με 250 μL of the DHT μηδενικό βαθμονομητή. καλή ανακίνηση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (18-25 °C) για τουλάχιστον 1 ώρα.

## ΣΗΜΕΙΩΣΗ:

- ΜΗΝ ΕΚΧΥΛΙΣΕΤΕ ΤΟΥΣ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΤΕΣ
- Χρησιμοποίησε 12 x 75 mm ή 13 x 100 mm γυάλινα σωληνάρια με καπάκι. Εάν δεν μπορούν να βρεθούν καπάκια, μπορούν να χρησιμοποιηθούν σωληνάρια 16 x 150 mm. Μετά την εκχύλιση, καλύψτε τα 16 x 150 mm σωληνάρια με αλουμινοχαρτο για να αποφευχθεί η εξάτμιση του οργανικού διαλύτη.
- Αποφύγετε να χρησιμοποιήσετε λιπαιμικά δείγματα.

## Διαδικασία εξέτασης

Τα βαθμονομητές διαλύματα, οι οροί ελέγχου και τα άγνωστα δείγματα πρέπει να υποβάλλονται σε προσδιορισμό εις διπλούν.

Βήμα 1 Προσθήκες	Βήμα 2 Επώαση	Βήμα 3 Μέτρηση
<p>Εκχύλιστε τα δείγματα και τους ορούς ελέγχου όπως υποδεικνύεται στην παραγραφο «Διαδικασία».</p> <p>Στα επιστρωμένα σωληνάρια, προσθέστε διαδοχικά:</p> <p>100 μL βαθμονομητές, ορού ελέγχου ή δείγματος και</p> <p>500 μL ιχνηθέτη*</p> <p>Αναμείξτε ανακινώντας έντονα με το χέρι τη βάση στήριξης των δοκιμαστικών σωληναρίων.</p>	<p>Καλύψτε και επωάστε 2 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου στους 18-25°C με ανάδευση (<math>\geq 180</math> rpm).</p> <p>Προχωρήστε σε αναρρόφηση ή απόχυση του περιεχομένου των σωληναρίων, (εκτός από τα σωληνάρια «ολικό crm»), με ταυτόχρονη αναστροφή με ένα έδρανο με σπόγγο σε ειδικό κάδο ραδιενεργών αποβλήτων.</p>	<p>Προσθέστε σε όλα τα σωληνάρια 3.0 mL απιονισμένο νερό, με την εξαίρεση των σωληνών "συνολικών κρούσεων".</p> <p>Προχωρήστε σε αναρρόφηση ή απόχυση του περιεχομένου των σωληναρίων, (εκτός από τα σωληνάρια «ολικό crm»), με ταυτόχρονη αναστροφή με ένα έδρανο με σπόγγο σε ειδικό κάδο ραδιενεργών αποβλήτων.</p> <p>Χτυπήστε τα σωληνάρια απότομα σε απορροφητικό υλικό για να επιταχυνθεί το στέγνωμα.</p> <p>Στεγνώστε για &gt; 2 λεπτό. Ανοίξτε τα σωληνάρια.</p> <p>Μετρήστε το δεσμευμένο crm (B) και το συνολικό crm (T) για 1 λεπτό.</p>

\*Προσθέστε 500 μL ιχνηθέτη σε 2 επιπλέον σωληνάρια για να βρείτε τις ολικές κρούσεις.

## ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

(Για περισσότερες λεπτομέρειες, βλ. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ)

Τα αντιπροσωπευτικά δεδομένα παρέχονται μόνο ως παράδειγμα. Η απόδοση που επιτυγχάνεται σε κάθε εργαστήριο μπορεί να διαφέρει.

### Ευαισθησία

**Αναλυτική ευαισθησία:** 9.14 pg/mL

**Λειτουργική ευαισθησία:** 19.63 pg/mL

### Εξειδίκευση

Το αντίσωμα που χρησιμοποιείτε στην ανοσοεξέταση είναι υψηλά εξειδικευμένο για την DHT. Ακρως χαμηλές διασταυρωτές αντιδράσεις βρέθηκαν σε αρκετά ανάλογα μόρια (androstenedione, estradiol, testosterone κλπ.)

### Ακρίβεια

#### Intra-assay

Δείγματα εξετάστηκαν 25 φορές στην ίδια σειρά. Οι συντελεστές απόκλισης που προέκυψαν ήταν μικρότεροι ή ίσοι με 7.9 %.

#### Inter-assay

Δείγματα εξετάστηκαν δύο φορές το καθένα σε 10 διαφορετικές σειρές. Οι συντελεστές απόκλισης που προέκυψαν ήταν μικρότεροι ή ίσοι με 7.1 %.

## **Ακρίβεια**

### **Δοκιμή αραιώσης**

Δείγματα υψηλής συγκέντρωσης αραιώθηκαν διαδοχικά στο μηδενικό βαθμονομητής του kit. Τα ποσοστά ανάκτησης κυμαίνονταν μεταξύ 80.5 % και 114 %.

### **Δοκιμή ανάκτησης**

Γνωστές ποσότητες T3 προστέθηκαν σε δείγματα χαμηλής συγκέντρωσης. Τα ποσοστά ανάκτησης κυμαίνονταν μεταξύ 88.0 % και 107 %.

**Εύρος μέτρησης** (από αναλυτική ευαισθησία έως τον υψηλότερο βαθμονομητή): 9.14 μέχρι κατά προσέγγιση 2,500 pg/mL.

## **ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ**

- Η μη τήρηση των συγκεκριμένων οδηγιών χρήσης μπορεί να επηρεάσει σημαντικά τα αποτελέσματα.

- Τα αποτελέσματα πρέπει να ερμηνευθούν λαμβάνοντας υπόψη τη συνολική κλινική παρουσίαση της ασθενούς συμπεριλαμβανομένων της κλινικής ιστορίας, των δεδομένων από συμπληρωματικές εξετάσεις και άλλων κατάλληλων πληροφοριών.
  - Αποφύγετε την επανειλημμένη κατάψυξη και απόψυξη των δειγμάτων ή αντιδραστηρίων.
  - Αποφύγετε τη χρήση βαριά αιμόλυση, ικτερικά ή λιπαιμικά δείγματα
  - Αν υπάρχουν ενδείξεις μικροβιακής μόλυνσης ή υπερβολικής θολότητας σε ένα αντιδραστήριο, απορρίψτε το φιαλίδιο.
-

# ACTIVE® Dihydrotestosterone RIA

**REF** DSL9600i

## RADIOIMMUNOASSAY A DIHIDROTESZTOSZTERON (DHT) SZÉRUMBÓL ÉS PLAZMÁBÓL TÖRTÉNŐ IN VITRO MENNYISÉGI MEGHATÁROZÁSÁRA In vitro diagnosztikai használatra.

### MŰKÖDÉSI ELV

A dihidrotesztoszteron radioimmunoassay (5 $\alpha$ -Dihidrotesztoszteron; DHT; 17 $\beta$ -Hidroxi-5 $\alpha$ -androsztán-3-on), egy vetékedési assay. Az eljárás a radioimmunoassay alapelvét követi, amikor is a radioaktív és a non-radioaktív antigén az antitest korlátolt számú kötőhelyeiért vetékedik. A [125I]-jelzett dihidrotesztoszteron antitesthez kötött mennyisége fordítva arányos a jelenlévő jelöletlen DHT koncentrációjával. A szabad és a kötött antigén szétválasztását leöntéssel vagy az antitesttel bevont csövek leszívásával érhetjük el. Standard görbét készítünk, s az ismeretlen DHT értékeket a görbéről olvassuk le interpolációval.

**A teszt összefoglalását és magyarázatát a FÜGGELÉKBEN találja meg.**

### FIGYELMEZTETÉSEK ÉS ÓVINTÉZKEDÉSEK

#### Általános megjegyzések:

- In vitro diagnosztikai használatra.
- A kalibrátor és kontroll üvegeket olyan rövid ideig tartjuk nyitva, amennyire csak lehet, hogy a túlzott párolgást elkerüljük
- Ne keverjen össze különböző gyártási számú reagenseket.
- A címkén látható lejárati időn túl egyik összetevőt se használjuk fel.
- Minden vizsgálathoz készítsen standardgörbét.
- Ajánlott a vizsgálat során két párhuzamos mérést végezni.
- A kalibrátorokat és a kontrollokat össze kell keverni használat előtt forgatással vagy gyengéd keveréssel vortexelés helyett.

#### Alapvető sugárzásbiztonsági szabályok

Radioaktív anyagok beszerzését, felhasználását és szállítását külön jogszabályok írják elő. Az alábbi alapvető szabályok betartása megfelelő védelmet biztosíthat:

- Radioaktív anyagok jelenlétében ne fogyasszon ételt, italt, ne dohányozzon és ne használjon kozmetikumokat.
- Ne pipettázzon szájjal.
- Kerülje a radioaktív anyagokkal történő érintkezést: viseljen kesztyűt és laboratóriumi köpenyt.
- Minden, radioaktív anyaggal végzett műveletet egy erre megfelelő, folyosóktól és más forgalmas területektől távol eső helyen kell elvégezni.
- A radioaktív reagenseket egy erre kijelölt helyen tartott edényben kell tárolni.
- A laboratóriumba érkezett radioaktív anyagok átvételéről és tárolásáról vezessen jegyzőkönyvet.
- Azokat a laboratóriumi eszközöket és üvegedényeket, amelyek radioaktív anyaggal szennyeződhetnek, különítse el, hogy elkerülje a különböző radioizotópokkal történő keresztszennyeződést.
- Sugárszennyeződés vagy radioaktív anyag kiömlése esetén tartsa be az erre vonatkozó előírásokat.
- A radioaktív hulladékot kezelje az adott országban érvényes szabályoknak megfelelően.

#### Nátrium azid

Néhány reagens tartósítószerként nátrium azidot tartalmaz. A nátrium azid reakciója ólommal, rézzel, vagy sárgarézzel robbanékony fém-azidokat eredményezhet. Ezért a nátrium azid tartalmú reagenseket a lefolyóba történő kiöntés után nagy mennyiségű folyóvízzel öblítsük le.

#### Emberi eredetű anyagot

A páciensektől vett mintákat és a vérből származó termékeket az ismertetett eljárás segítségével minimális kockázattal, rutinszerűen dolgozhatja fel. Azonban az általános óvintézkedéseknek és a helyes klinikai laboratóriumi gyakorlatoknak megfelelően ezeket a termékeket kezelje úgy, mint a fertőzések egyik lehetséges forrása, tekintet nélkül az eredetükre, kezelésükre vagy a korábbi tanúsítványokra. A szennyeződések eltávolítására használjon megfelelő fertőtlenítőszer; ezen anyagokat és a

tárolóedényzetüket a helyi szabályozásoknak és irányelveknek megfelelően tárolja és semmisítse meg.

## GHS SZERINTI VESZÉLYESSÉGI BESOROLÁS

Oxidation Solution



H411

Mérgező a vízi élővilágra, hosszan tartó károsodást okoz.

P273

Kerülni kell az anyagnak a környezetbe való kijutását.

P391

A kiömlött anyagot össze kell gyűjteni.

Kálium-permanganát 1 - 5%

Sample Buffer

VESZÉLY!



H226

Tűzveszélyes folyadék és gőz.

H314

Súlyos égési sérülést és szemkárosodást okoz.

P210

Hőtől/forró felületektől/szikkasztól távol tartandó. Tilos a dohányzás.

P280

Védőkesztyű, védőruha és szemvédő/arcvédő használata kötelező.

P301+P330+P331

LENYELÉS ESETÉN: a száját ki kell öblíteni. TILOS hánytatni.

P303+P361+P353

HA BÖRRE (vagy hajra) KERÜL: A bőrt le kell öblíteni vízzel.

P305+P351+P338

SZEMBE KERÜLÉS ESETÉN: Több percig tartó óvatos öblítés vízzel. Adott esetben a kontaktlencsék eltávolítása, ha könnyen megoldható. Az öblítés folytatása.

P310

Azonnal forduljon TOXIKOLÓGIAI KÖZPONTHOZ vagy orvoshoz.

Etil-alkohol 10 - 20%  
Nátrium-hidroxid 20 - 30%

**SDS**

A biztonsági adatlap megtalálható a következő internetes helyen: [techdocs.beckmancoulter.com](http://techdocs.beckmancoulter.com)

## MINTAVÉTEL, FELDOLGOZÁS, TÁROLÁS ÉS HIGÍTÁS

- Szérum és EDTA -plazma használható mintaként.
- Hagyja a szérum mintákat teljesen megalvadni centrifugálás előtt.
- A szeparált szérumot vagy plazmát 2-8 °C-on 24 hosszat lehet tárolni. Hosszabb tároláshoz a mintákat -20 °C alá, kell hűteni, így max. 1 évig tárolhatók. Több aliquotot tanácsos lefagyasztani, hogy a többszöri felolvasztást elkerüljük. A gfelolvasztást szobahőmérsékleten kell végezni.
- A mintákat az assay előtt FELTÉTLENÜL extrahálni szükséges. Ld „Eljárás” fejezetet.
- Bármely mintát, emi magasabb értéket ad, mint a legmagasabb kalibrátor, a 0 pg/mL kalibrátorral megfelelően hígítani és újra mérni szükséges.

- 19 db szérumból és EDTA-plazma mintát vizsgáltunk (a szérumból értékek 53.75 és 341.5 pg/mL közöttiek voltak) és hasonlítottunk össze az Active Dihydrotestosztoszteron RIA kittel [DSL9600(i)]. A következő eredményt kaptuk:

$$[\text{EDTA-plazma}] = 0.9592[\text{szérumból}] + 31.583 \text{ R} = 0.9783$$

## BIZTOSÍTOTT ANYAGOK

A kitben található összes reagens - a kit 2-8 °C-on történő tárolása esetén - a címkén jelzett lejárati ideig megőrzi stabilitását. A csövek címkéjén jelzett lejárati idő a gyártó részére szolgáltatóknak információt az adott komponens hosszú távú eltarthatóságával kapcsolatban. Kérjük ezt az adatot ne vegyék figyelembe!

A nyitott reagensekre vonatkozó tárolási körülményeket a megfelelő paragrafusban mutatjuk be.

**Anti-dihydrotestosztoszteron antitest bevont csövek: 2 x 50 cső** (használatra kész)

Műanyag csövek, minden cső belső falához poliklonális nyúl anti-DHT immunoglobulint kötöttek.

**125I-jelzett dihydrotestosztoszteron tracer: 1 db 55 mL-es üveg** (liofilizált)

Az üveg 185 kBq (<5 µCi) 125I-jelzett DHT-t tartalmaz fehérje (BSA) és nátrium-azid (<0.1 %) tartalmú pufferben. A traceret 55 mL deionizált vízben kell feloldani. Feloldást követően 2-8 °C-on 14 napig tárolható, hogy a maximális gátlási százalék(%B<sub>0</sub>/T) > 25%.

**Kalibrátor: 1 db 50 mL-es üveg, "0" jelzésű** (használatra kész) **és 7 db üveg, 1-7 jelzéssel** (liofilizált).

A kalibrátor üvegek 0-tól kb. 2,500 pg/mL (0-tól kb. 8,600 pmol/L) dihydrotestosztoszteron koncentrációjú, fehérje (BSA) és nátrium-azid (<0.1%) tartalmú pufferelt oldatok. A pontos koncentráció az üvegek címkéjén található. A kalibrátorok értékét tanúsított referencia anyagra (Cerilliant) állították be. Ne extrahálja a kalibrátorokat az assay előtt!

**Kontrollok: két üveg 1 és 2 jelzéssel** (liofilizált)

Az üvegek nátrium-azid (<0.1 %) tartalmú humán szérumban odott dihydrotestosztoszteron-t tartalmaznak. A várt értékek a kitben elhelyezett szupplementumon olvashatók. A kontrollokat KÖTELEZŐ extrahálni az assay előtt! (Ld. "Eljárás" fejezetben).

**Oxidációs oldat: 2 db 25 mL-es üveg** (használatra kész)

Az üvegben nátrium-azid (<0.1 %) tartalmú pufferben oldott kálium-permanganát (<5 %) oldat található.

**Minta puffer: 1 db 5.5 mL-es üveg** (használatra kész)

The üvegben <23 % Etil-alkoholt és <29 % nátrium-hidroxidot tartalmazó puffer található.

## SZÜKSÉGES, DE NEM BIZTOSÍTOTT ANYAGOK

A standard laboratóriumi felszerelésen kívül az alábbiak szükségesek:

- 12 x 75 mm vagy 13 x 100 mm vagy 16 x 150 mm méretű **ÜVEG**-csövek bizteonságos
- Teszt cső állvány 12 x 75 mm méretű csöveknek.
- Ionmentes víz.
- Precíziós mikropipetták (100 µL, 250 µL és 400 µL).
- félautomata pipetta (500 µL)
- Vortex típusú keverő
- 5 mL osztott üvegpipetták – **AZ EXTRAKCIÓHOZ EZEK HASZNÁLANDÓK!**
- Organikus oldószerek: n-hexán és etanol (HPLC tisztaságú).
- Centrifuga (1500 x g, lehetőleg hűtött).
- Nitrogén gáz vagy hűthető speed-vac pároló (az extrakcióhoz).
- Rázógép ≥ 180 rpm fordulatszámmal.
- Szivacs állvány vagy hasonló eszköz a dekantáláshoz.
- Leszívórendszer
- Abszorbens anyag a csövek leitatásához.
- 125I-ra beállított gamma-számláló
- Fél-log (log-lineáris) grafikon papír vagy számítógépes RIA adat analízis program.

## EREDMÉNYEK

Az eredmények a standard görbéből interpolációval számíthatók. A görbe használható arra, hogy a kalibrátorokkal egy időben mért minták tesztoszteron koncentrációját meghatározzuk.

### Standard görbe

A Használati útmutatóban található eredményeket log-log görbeillesztéses módszerrel ("spline" eljárás) számítottuk ki. A mért aktivitás értékeket (B/T (%), vagy B/B<sub>0</sub> (%)) a függőleges tengelyen, a standardok dihydrotestosztoszteron koncentrációit (ng/mL) a vízszintes tengelyen tüntettük fel. Egyéb adatkiértékelési eljárások a megadottól némileg eltérő eredményeket adhatnak.

ED50 = 100,7 pg/mL

Totál aktivitás: 57,936 cpm				
Calibrators	DHT (pg/mL)	cpm (n=2)	B/T (%)	B/B <sub>0</sub> (%)
0	0	37,670	65,0	100
1	24,0	31,164	53,8	82,7
2	48,0	26,403	45,6	70,1
3	96,0	19,356	33,4	51,4
4	192	12,449	21,5	33,0
5	480	6,948	12,0	18,4
6	960	4,570	7,88	12,1
7	2,400	2,514	4,33	6,67

(A megadott standard görbe csak minta, ne használjuk számításokhoz.)

### Minták

Minden minta B/T (%) vagy B/B<sub>0</sub> (%) értékét helyezzük el a standard görbe vertikális tengelyén és olvassuk le a hozzá tartozó DHT koncentrációt a horizontális tengelyen pg/mL-ben. A koncentrációk pg/mL-ről pmol/L-re történő átszámításához szorzunk meg az eredményt 3.44-dal.

## VÁRHATÓ ÉRTÉKEK

Javasolt a laborok számára a saját normál tartományok meghatározása. A következő értékek egészséges populációtól származó DHT koncentrációk, melyek bemutatató jellegűek.

	Életkor	n	Median (pg/mL)	2.5% Percentilis (pg/mL)	97.5% Percentilis (pg/mL)	Tartomány (pg/mL)
Férfi	20 - 60	119	274,7	109,2	583,1	33,69 - 756,4
Nő	20 - 60	122	82,81	33,28	196,5	17,67 - 245,8

(A részletekért nézzék meg a FÜGGELÉKET)

## MINŐSÉG-ELLENŐRZÉS

Jó laboratóriumi gyakorlat szerint kontroll mintákat kell rendszeresen használni a kapott eredmények minőségének biztosítása érdekében. Ezeket a kontrollokat a betegek mintáival megegyező módon kell feldolgozni és ajánlott, hogy ezek eredményeit megfelelő statisztikai eljárással analizálják.

Amennyiben a csomagolás sérült, vagy amennyiben az adatok a kit teljesítőképességének romlására utalnak, kérjük, hogy lépjen kapcsolatba országának Immunotech képviselőjével, vagy írjon a következő e-mail címre: imunochem@beckman.com

## ELJÁRÁS

### A reagens előkészítése

Engedjék a reagenseket szobahőre melegedni és alaposan keverjék össze azokat gyengéd forgatással használat előtt.

### A tracer feloldása

A tracer oldjuk fel 55 mL deionizált vízben. A feloldást követően varjunk 10 percet, majd keverjük meg óvatosan az elegyet, hogy a felhabzást elkerüljük. 2-8 °C-on 14 napig tárolható.

### Kalibrátorok és kontroll minták feloldása

A kalibrátorokat (1-7) és kontrollokat (1-2) az üvegek címkéjén látható térfogatú deionizált vízben oldjuk fel. Várjunk 10 percet a feloldást követően majd keverjük meg óvatosan az elegyet, hogy a felhabzást elkerüljük. Tároljuk <-20 °C a kit lejárati idejéig.

### A minták extrakciója

**Megjegyzések:** *Extrahálni csak tiszta, lehetőleg egyszer használatos ÜVEG-csőben, ÜVEG pipettákat használva szabad! Várjuk meg, hogy az*

Oxidáló oldat és a többi extrakciós reagens felvegye a szobahőmérsékletet (18-25 °C) használat előtt.

A mintákat és a kontrollokat szükséges extrahálni. NE extraháljuk a kalibrátorokat!

- Minden egyes mintához és kontrollhoz számozzon be egy csövet.
- Mérjen 400 µL mintát vagy kontrollt a számozott csövekbe, majd adjon hozzájuk 500 µL oxidációs oldatot. Vortexelje őket alaposan és inkubálja szobahőmérsékleten (18-25 °C) 15 percig.
- Készítsen extrakciós keveréket: 98% n-hexán és 2% etanol.
- Üvegpipettát használva extrahálja az oxidált mintákat 4.0 mL n-hexán-etanol eleggyel (98% hexán: 2% etanol). Vortexeljen minden mintát azonnal 1 percig.
- Adjon 50 µL DHT minta-puffert a csövekhez, majd zárja le azokat, óvatosan forgassa meg 3-4-szer a csöveket.
- Centrifugáljon 1500 X g-vel 15 percig 2-8 °C-on az organikus és a vizes fázis szétválasztásához.
- Mérjen át 2.5 mL felső, organikus fázist tiszta, megfelelően és párolja be az anyagot szárazra, nitrogén gázt vagy fűthető speed-vac párolót használva.

A visszamaradt szárazanyagot oldja fel 250 µL DHT zéró kalibrátorban. Vortexeljen alaposan és tartsa az oldatot szobahőmérsékleten (18-25 °C) legalább 1 óra hosszat.

#### MEGJEGYZÉS:

- NE EXTRAHÁLJA A KIT KALIBRÁTOROKAT
- Használjon 12 x 75 mm vagy 13 x 100 mm méretű, biztonságosan zárható üvegcsöveket. Amennyiben biztonsági dugó nem kapható, 16 x 150 mm méretű csövek használhatók. Extrakciót követően fedje be a 16 x 150 mm-es csöveket alumínium fóliával hogy az organikus oldószer elpárolgását megakadályozza.
- Ne elemezzon lipémiás mintát.

#### A vizsgálat menete

A kalibrátorokat, kontrollokat és a betegek mintáit duplikáumban mérjük.

1. lépés Bemérések	2. lépés Inkubáció	3. lépés Aktivitásmérés
<p>Extraháljuk kontrollokat és mintákat a Eljárás pont szerint</p> <p>Az ellenanyaggal fedett csövekhez egymás után adjunk:</p> <p>100 µL of kalibrátort, extrahált kontrollt vagy mintát, majd azonnal mérjük hozzá 500 µL tracer.*</p> <p>Vortexelje össze a csöveket.</p>	<p>Fedjük le és 2 órán át rázón (≥180 rpm) szoba-hőmérsékleten (18-25 °C) inkubáljuk a csöveket.</p> <p>Szívja le vagy dekantálja az összes csövet (kivéve a «total cpm» csöveket) többszöri megfordítással egy szívacs tartóval egy radioaktív hulladék gyűjtőedénybe.</p>	<p>Adjunk 3.0 mL deionizált vizet minden csőhöz (a «total cpm» cső kivételével).</p> <p>Szívja le vagy dekantálja az összes csövet (kivéve a «total cpm» csöveket) többszöri megfordítással egy szívacs tartóval egy radioaktív hulladék gyűjtőedénybe.</p> <p>Sztrájk a csövek élesen nedvszívó elősegítéséhez teljes vízelvezető.</p> <p>Itassuk le a csöveket &gt;2 percig.</p> <p>Mérje meg számlálóval a kötött cpm értékeket (B) és a total cpm értékeket (T) 1 percig.</p>

\*Mérjen 500 µL tracer oldatot 2 csőbe a total cpm (T) meghatározásához.

## MINŐSÉGI JELLEMZŐK

(A részletekért nézzék meg a FÜGGELÉKET)

A reprezentatív adatok kizárólag szemléltető jellegűek. A különálló laboratóriumok eredményei ettől eltérhetnek.

#### Érzékenység

**Analitikai szenzitivitás:** 9.14 pg/mL

**Funkcionális szenzitivitás:** 19.63 pg/mL

#### Specifitás

Az immunoassayhez használt antitest nagyon specifikus DHT-re. Rendkívül alacsony keresztreakció volt észlelhető több rokonmolekulára (androsténdion, ösztrodiol, tesztoszteron stb.).

#### Pontosság

##### Intra-assay

A mintákat 25 szőr mértük ugyanabban a sorozatban. A variációs koefficiens 7.9 % volt.

##### Inter-assay

A mintákat duplikátumban, 10 különböző sorozatban mértük. A variációs koefficiens ≤ 7.1 % volt.

#### Valósság

##### Hígítási teszt

Öt szérumminta sorozathígítását végeztük el zéró kalibrátorral. A visszanyerési százalék 80.5 % és 114 % közöttinek adódott.

##### Visszanyerési teszt

Öt szérummintába ismert mennyiségű DHT-t mértünk. A visszanyerési százalék 88.0% és 107 % közötti volt.

**Méréstartomány** (az analitikai szenzitivitástól a legmagasbb kalibrátorig): 9.14-től kb. 2,500 pg/mL.

## KORLÁTOZÁSOK

- Ezen használati útmutató (IFU) be nem tartása jelentős hatással lehet az eredményekre.
- A csövek nem megfelelő leitatása vagy leszívása nagy szórást, hibás eredményt okoz.
- Kerüljük a reagensek és a minták ismételt feklolvasztását.
- Hemolizált, icterusos vagy lipémiás mintát ne használjanak.
- A reagens mikrobiális fertőzöttségére utaló jelek esetén vagy túl zavaros, akkor dobja ki az ampullát.

# ACTIVE® Dihydrotestosterone RIA

**REF** DSL9600i

## RADIOIMUNOLOGICZNA METODA DO ILOŚCIOWEGO OZNACZANIA IN VITRO DIHYDROTESTOSTERONU (DHT) W SUROWICY LUB OSOCZU CZŁOWIEKA

Do użytku diagnostycznego *in vitro*.

### ZASADA

Zestaw radioimmunologiczny do oznaczania dihydrotestosteronu (5 $\alpha$ -Dihydrotestosterone; DHT; 17 $\beta$ -Hydroxy-5 $\alpha$ -androstano-3-on) jest zestawem kompetycyjnym. Niniejsza procedura jest zgodna z podstawowymi założeniami metody radioimmunologicznej, tzn. radioaktywne antygeny konkurują z nieradioaktywnymi antygenami o określoną liczbę wiązań z przeciwciałem. Przy czym ilość znakowanego 125I dihydrotestosteronu związanego z przeciwciałem jest odwrotnie proporcjonalna do stężenia obecnego w próbce nieoznakowanego DHT. Oddzielenie wolnych antygenów od antygenów związanych uzyskuje się poprzez dekantację lub odciągnięcie płynnej zawartości z pokrytych przeciwciałem próbek. Uzyskane wartości DHT odczytuje się poprzez interpolację ze skonstruowanej krzywej standardowej.

**Podsumowanie i Wyjaśnienia dotyczące Testu patrz APPENDIX.**

### OSTRZEŻENIE I ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

Uwagi ogólne:

- Do użytku diagnostycznego *in vitro*.
- Fiolki z kalibratorami i kontrolami nie powinny pozostawać otwarte przez czas dłuższy niż jest to konieczne, aby uniknąć nadmiernego odparowania zawartości fiołki.
- Nie należy mieszać odczynników z różnych serii produkcyjnych.
- nie wolno używać składników po ich dacie ważności podanej na etykiecie,
- Krzywa standardowa musi być wykonana podczas każdego oznaczania.
- Zalecane jest wykonywanie oznaczeń w duplikatach.
- kalibratory i kontrole należy delikatnie wymieszać przed użyciem; nie mieszać vortexem

#### Podstawowe zasady bezpieczeństwa podczas postępowania z promieniowaniem

Podstawowe zasady bezpieczeństwa podczas postępowania z promieniowaniem Wejście w posiadanie, używanie, utylizacja i transfer materiałów radioaktywnych powinien być zgodny z prawem obowiązującym w kraju użytkownika. Przestrzeganie podstawowych zasad bezpieczeństwa przy stosowaniu materiałów radioaktywnych powinno zapewnić odpowiednią ochronę:

- Nie jeść, nie pić, nie palić wyrobów tytoniowych, nie aplikować kosmetyków w obecności materiałów radioaktywnych.
- Nie pipetować ustami.
- Należy unikać wszelkich kontaktów z materiałami promieniotwórczymi, stosując rękawice i fartuch laboratoryjny.
- Wszelkie manipulacje związane z substancjami promieniotwórczymi powinny być wykonywane w wyznaczonej lokalizacji, z dala od korytarzy i innych zatłoczonych miejsc.
- Materiały radioaktywne powinny być przechowywane w zabezpieczonym pojemniku.
- Należy zapisać datę przyjęcia radioaktywnych produktów, a czas ich przechowywania powinien być zgodny z odpowiednim terminem.
- Sprzęt laboratoryjny i naczynia, które uległy kontaminacji powinny być oddzielone od pozostałych, aby nie spowodować kontaminacji krzyżowej różnymi radioizotopami
- W sytuacji zanieczyszczenia radioizotopami i/lub zgubieniu radioaktywnego materiału powinno być powzięte postępowanie zgodne z prawem obowiązującym w kraju użytkownika.
- Radioaktywne odpady powinny być przechowywane zgodnie z przepisami obowiązującymi w kraju użytkownika.

### Azydek sodu

Niektóre odczynniki zawierają azydek sodu jako środek konserwujący. Azydek sodu wchodzi w reakcje z ołowiem, miedzią lub mosiądzem, tworząc wybuchowe azydki. W związku z tym odczynniki zawierające azydek sodu powinny być rozcieńczane dużą ilością wody przed wylaniem ich do kanalizacji.

### Materiały pochodzące od człowieka

Zastosowanie opisanej procedury umożliwia rutynowe przetwarzanie próbki pochodząca (pobrana) od pacjenta i preparatów krwiopochodnych przy minimalnym ryzyku. Mimo to należy obchodzić się z preparatami potencjalnie zakaźnymi, zgodnie z powszechnie stosowanymi środkami ostrożności i dobrą praktyką laboratoryjną, niezależnie od pochodzenia, rodzaju badań i wcześniejszego świadectwa. Należy stosować odpowiednie środki dezynfekujące do odkażania. Materiały i ich opakowania należy przechowywać i usuwać zgodnie z miejscowymi zasadami i wytycznymi.

## KLASYFIKACJA ZAGROZEŃ WG GHS

Oxidation Solution



H411

Działa toksycznie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki.

P273

Unikać uwolnienia do środowiska.

P391

Zebrać wyciek.  
Nadmanganian potasu 1 - 5%

Sample Buffer



H226

Łatwopalna ciecz i pary.

H314

Powoduje poważne oparzenia skóry oraz uszkodzenia oczu.

P210

Przechowywać z dala od źródeł ciepła, gorących powierzchni i źródeł iskrzenia. Nie palić.

P280

Stosować rękawice ochronne, odzież ochronną i ochronę oczu/ochronę twarzy.

P301+P330+P331

W PRZYPADKU POŁKNIECIA: wypłukać usta. NIE wywoływać wymiotów.

P303+P361+P353

W PRZYPADKU KONTAKTU ZE SKÓRĄ (lub z włosami): Spłukać skórę pod strumieniem wody.

P305+P351+P338

W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO OCZU: Ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać.

P310

Natychmiast skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUĆ/ lekarzem.

Alkohol etylowy 10 - 20%  
Wodorotlenek sodu 20 - 30%



Karta charakterystyki jest dostępna w witrynie  
techdocs.beckmancoulter.com

## ZBIERANIE PRÓB, PRZYGOTOWYWANIE, ROZCIĘCZANIE I PRZECHOWYWANIE

- Zalecane typy prób to surowica i osocze z EDTA.
- Przed odwirowaniem należy odstawić próbki do wytworzenia pełnego skrzepu.
- Próbki z oddzielonej surowicy lub osocza mogą być przechowywane w temp. 2-8 °C do 24 godzin; przy dłuższym przechowywaniu (najdłużej 1 rok) próbki należy zamrozić w temperaturze <math>-20^{\circ}\text{C}</math> po ich uprzednim rozdozowaniu ażeby uniknąć wielokrotnego zamrażania i rozmrażania tej samej próbki. Rozmrażanie próbek musi być przeprowadzane w temperaturze pokojowej.
- Próbki WYMAGAJĄ ekstrakcji przed rozpoczęciem oznaczania (patrz Procedura).
- Jeśli próbka pokazuje stężenie większe niż stężenie najwyższego kalibratora, powinna być odpowiednio rozcieńczona kalibratorem zero (0 pg/mL) a samo oznaczenie powtórzone.
- Wartości surowic i EDTA-osocza dla 19 próbek (wartość surowic była w zakresie od 53.75 do 341.5 pg/mL) porównano z użyciem zestawu DSL9600i. Rezultaty są następujące:

$$[\text{EDTA-osocze}] = 0.9592[\text{surowica}] + 31.583 \quad R = 0.9783$$

## MATERIAŁY DOSTARCZONE

Wszystkie nienaruszone odczynniki zestawu są stabilne zgodnie z ich datą ważności umieszczoną na etykiecie zestawu, pod warunkiem przechowywania ich w temperaturze 2-8 °C. Daty ważności są wydrukowane tylko na etykietach fiolek z przedłużonym okresem skladowania składników przez producenta. Nie należy brać ich pod uwagę.

Warunki przechowywania otwartych odczynników podane są w odpowiednich paragrafach.

**Probówki opłaszczone pokryte przeciwciałem przeciw dihydrotestosteronowi: 2 x 50 probówek** (gotowy do użycia)

Plastikowe probówki z króliczą immunoglobuliną poliklonalną przeciw DHT unieruchomioną na wewnętrznej ściance każdej probówki.

**Znacznik 125I-dihydrotestosteronu: jedna fiołka 55 mL** (liofilizat)

Na dzień produkcji, fiołka zawiera 185 kBq (<math><5 \mu\text{Ci}</math>), DHT znakowanego 125I w buforze z białkami (BSA) i azydkiem sodu (<math><0.1\%</math>). Odtworzyć znacznik dodając do fiołki 55 mL zdejonizowanej wody. Odtworzony odczynnik można przechowywać w temperaturze 2-8 °C do 14 dni co pozwoli uzyskać maksymalną ilość wiązań (%B<sub>0</sub>/T) > 25%.

**Kalibratory: jedna fiołka 50 mL, kalibrator 0** (gotowy do użycia) + **siedem fiołek kalibratory 1-7** (liofilizat)

Fiołki z kalibratorami zawierają od 0 do około 2,500 pg/mL (0 do około 8,600 pmol/L) DHT w buforze z białkami (BSA) i azydkiem sodu (<math><0.1\%</math>). Dokładne stężenia są podane na etykiecie każdej fiołki. Wartości kalibratorów są ustalone w oparciu o certyfikowany materiał referencyjny (Cerilliant). NIE ekstrahować kalibratorów przed rozpoczęciem oznaczania.

**Kontrola: dwie fiołki oznaczone 1,2** (liofilizat)

Fiołki zawierają dihydrotestosteron w ludzkiej surowicy i azydek sodu (<math><0.1\%</math>). Oczekiwane stężenia są podane w suplementie dołączonym do zestawu. Kontrola WYMAGAJĄ ekstrakcji przed rozpoczęciem oznaczania (patrz Procedura).

**Roztwór utleniający: dwie buteleczki 25 mL** (gotowy do użycia)

Buteleczki zawierają (<math><5\%</math>) roztwór nadmanganianu potasu w buforze z azydkiem sodu (<math><0.1\%</math>).

**Bufor do próbek: jedna fiołka 5.5 mL** (gotowy do użycia)

W fiołce znajduje się bufor zawierający <math><23\%</math> alkoholu etylowego i <math><29\%</math> wodorotlenku sodu.

## MATERIAŁY NIEZBĘDNE, LECZ NIEDOSTARCZONE

Poza standardowym wyposażeniem laboratorium wymagane są następujące urządzenia:

PI-DSL9600I-02

- SZKLANE** probówki 12 x 75 mm lub 13 x 100 mm lub 16 x 150 mm z korkami
- stojak na probówki (12 x 75 mm)
- Woda dejonizowana.
- dokładne mikropipety (100  $\mu\text{L}$ , 250  $\mu\text{L}$  i 400  $\mu\text{L}$ )
- Półautomatyczna pipeta (500  $\mu\text{L}$ ).
- Mieszadło wirowe („vortex“).
- 5 mL skalowane szklane pipety – **DO UŻYCIA PRZY EKSTRAKCJI**
- rozpuszczalniki organiczne: n-hexan i etanol (o czystości chromatograficznej HPLC)
- wirówka (1500 x g, zalecana z chłodzeniem)
- linia azotowo-próżniowa lub wyparka próżniowa obrotowa z typu “speed-vac”
- wytrząsarka osiągająca  $\geq 180$  rpm.
- stojak gąbkowy lub inne urządzenie do dekantacji
- System odciągający.
- materiał chłonący do osuszania próbek
- Licznik gamma do 125 J.
- papier do wykresu pół-logarytmicznego lub program komputerowy do analizy danych metody RIA

## WYNIKI

Wyniki należy odczytać z krzywej standardowej. Krzywa ta służy do oznaczania stężenia dihydrotestosteronu w próbkach, mierzonego w tym samym czasie co kalibratory.

### Krzywa standardowa

Zestawienie wyników jest przygotowane przy użyciu krzywej semilogarytmicznej (“spline mode”) skorelowanej z B/T (%) lub B/B<sub>0</sub> (%) na osi pionowej i stężeniem DHT w kalibratorach na osi poziomej (pg/mL). Zastosowanie innych metod do opracowania danych może dać nieco inne wyniki.

ED50 = 100.7 pg/mL

Całkowita aktywność: 57,936 cpm				
Calibrators	DHT (pg/mL)	cpm (n=2)	B/T (%)	B/B <sub>0</sub> (%)
0	0	37,670	65,0	100
1	24,0	31,164	53,8	82,7
2	48,0	26,403	45,6	70,1
3	96,0	19,356	33,4	51,4
4	192	12,449	21,5	33,0
5	480	6,948	12,0	18,4
6	960	4,570	7,88	12,1
7	2,400	2,514	4,33	6,67

(Przykładowe wartości do krzywej wzorcowej, nie do zastosowania)

### Próbki

Dla każdej próbki odnajdź B/T(%) lub B/B<sub>0</sub> (%) na osi pionowej i odczytaj odpowiadające tej wartości stężenie DHT, w pg/mL, na osi poziomej. Aby przeliczyć pg/mL na pmol/L pomóż wynik przez 3.44.

## OCZEKIWANE WARTOŚCI

Każde laboratorium powinno ustalić własne wartości normalne. Dane dotyczące stężeń DHT przedstawione w poniższej tabeli są rezultatem badań zdrowych dorosłych osób. Podane są wyłącznie jako wskazówka dla odniesienia.

	Wiek	n	Median (pg/mL)	2.5% percentyl (pg/mL)	97.5% percentyl (pg/mL)	Zakres (pg/mL)
Mężczyźni	20 - 60	119	274,7	109,2	583,1	33,69 - 756,4
Kobiety	20 - 60	122	82,81	33,28	196,5	17,67 - 245,8

(Szczegóły, patrz APPENDIX)

## KONTROLA JAKOŚCI

Dobrze funkcjonujące laboratorium wymaga regularnego stosowania prób kontrolnych ażeby zapewnić jakość i wiarygodność uzyskiwanych wyników.

Przygotowanie próbek kontrolnych odbywa się w dokładnie taki sam sposób jak próbek od pacjentów. Zaleca się także by rezultaty ich oznaczania były dokładne i statystycznie analizowane aby prawidłowo ocenić jakość zestawu lub prawidłowość przebiegu procedury.

Odbiegające od normy rezultaty dla prób kontrolnych mogą bowiem wskazywać na nieprecyzyjność czynności w czasie oznaczania, niewłaściwe użytkowanie próbek lub wadliwość odczynników. W przypadku wadliwości zestawu lub jeśli uzyskane dane odbiegają od normy prosimy o kontakt z lokalnym dystrybutorem lub na adres: imunochem@beckman.com

## PROCEDURA

### Przygotowanie odczynników

Doprowadzić wszystkie odczynniki do temperatury pokojowej a następnie dokładnie wymieszać delikatnie wstrząsając (przez odwracanie fiolki) przed użyciem.

### Odtworzenie znacznika

Odtworzyć znacznik dodając do fiolki 55 mL zdejonizowanej wody. Odczekać 10 minut od odtworzenia liofilizatu wodą, następnie delikatnie zmieszać aby uniknąć spienienia, przed pipetowaniem. Można przechowywać w temperaturze 2-8 °C do 14 dni.

### Przygotowanie kalibratorów i kontroli

Zawartość fiolek jest odtwarzana przez dodanie wody destylowanej, której objętość podana jest na etykiecie fiolki. Odczekać 10 minut od odtworzenia liofilizatu wodą, następnie delikatnie zmieszać aby uniknąć spienienia, przed pipetowaniem. Można przechowywać w temperaturze <-20 °C do daty ważności zestawu.

### Ekstrakcja próbek

*Uwaga: Ekstrakcja musi być przeprowadzona przy użyciu czystych, najlepiej jednorazowych SZKLANYCH probówek i pipet. Roztwór utleniający i inne odczynniki do ekstrakcji należy przed użyciem doprowadzić do temperatury pokojowej (18-25 °C).*

Tylko próbki i kontrole wymagają ekstrakcji. NIE ekstrahować kalibratorów.

- Ponumerować jedną fiolkę dla każdej próbki lub kontroli.
- Dodać 400 µL próbki lub kontroli do oznaczonej numerem fiolki, następnie dodać 500 µL roztworu utleniającego. Dokładnie mieszać vortexem i inkubować przez 15 minut w temperaturze pokojowej (18-25 °C).
- Przygotować mieszaninę ekstrakcyjną: 98% n-hexanu i 2% etanolu.
- Używając szklanej pipety, ekstrahować utlenioną próbkę poprzez dodanie 4.0 mL mieszaniny n-hexanu z etanolem (98% hexan i 2% etanol). Każdą próbkę niezwłocznie wymieszać vortexem przez 1 minutę.
- Dodać 50 µL bufora do próbek, zakorkować próbówki i delikatnie wymieszać odwracając 3-4 krotnie.
- Odwirowywać w 1500 X g przez 15 minut w temperaturze 2-8 °C ażeby oddzielić fazę organiczną od fazy wodnej.
- Przenieść 2.5 mL wierzchniej fazy organicznej do odpowiednio oznaczonych czystych szklanych probówek, następnie odparować całkowicie – do suchości, używając do tego celu linii azotowo-próżniowej lub podgrzewanej wyparki próżniowej typu "speed-vac".

Odtworzyć suchy materiał w próbówce dodając 250 µL kalibratora DHT zero. Wymieszać dokładnie na wytrząsarce "vortex" i pozostawić w temperaturze pokojowej (18-25 °C) przynajmniej 1 godzinę.

UWAGA:

- NIE EKSTRAHOWAĆ KALIBRATORÓW.
- Używać szklanych probówek 12 x 75 mm lub 13 x 100 mm zaopatrzonych w odpowiednie korki. Jeśli korki są niedostępne można użyć probówek 16 x 150 mm. Po etapie ekstrakcji przykryć próbówki 16 x 150 mm folią aluminiową ażeby zapobiec wyparowaniu rozpuszczalnika organicznego.
- Nie używać próbek lipemicznych.

### Procedura oznaczania

Oznaczać kalibratory, kontrole i próbki pacjentów w duplikatach.

Etap 1 Dodawanie	Etap 2 Inkubacja	Etap 3 Zliczanie
Dokonać ekstrakcji próbek i kontroli wg wskazań w punkcie Procedura.	Przykryć i inkubować 2 godziny w temperaturze pokojowej (18-25°C) na wytrząsarce ustawionej na ≥180 rpm.	Dodać 3.0 mL zdejonizowanej wody do wszystkich probówek poza probówkami «całkowite cpm».
Do pokrytych przeciwciałem probówek dodać kolejno:	Odciągnąć lub dekantować płynną zawartość probówek, (poza probówkami «całkowite cpm» ), odwracając stojak gąbkowy tak by zawartość spłynęła do pojemniczka na odpad radioaktywny	Odciągnąć lub dekantować płynną zawartość probówek, (poza probówkami «całkowite cpm» ), odwracając stojak gąbkowy tak by zawartość spłynęła do pojemniczka na odpad radioaktywny
100 µL kalibratora, wyekstrahowanej kontroli lub próbki, następnie niezwłocznie dodać 500 µL znacznika.*		Strząsnąć zdecydowanie próbówki na chłoniący materiał, aby ułatwić całkowite odsączenie, Odsącać przez minimum 2 minuty. Osuszyć próbówki.
Zmieszać.		Zliczać związane cpm (B) oraz całkowite cpm (T) przez 1 min.

\*Dodać 500 µL znacznika do 2 dodatkowych probówek, aby otrzymać całkowite cpm.

## CHARAKTERYSTYKA TESTU

(Szczegóły, patrz APPENDIX)

Reprezentatywne dane są przedstawiane tylko do celów ilustracyjnych. Uzyskiwane parametry mogą się różnić w zależności od laboratoriów.

### Czułość

**Czułość analityczna:** 9.14 pg/mL

**Czułość funkcjonalna:** 19.63 pg/mL

### Specyficzność

Przeciwciało użyte w zestawie jest wysoce specyficzne w stosunku do DHT. Otrzymano niezwykle niską reaktywność krzyżową w stosunku do kilku pokrewnych molekuł (androstenedion, estradiol, testosteron etc).

### Precyzja

#### Wewnątrz zestawu

Próbki z tej samej serii były oznaczane 25 razy. Współczynniki wariancji wyniosły ≤ 7.9 %.

#### Między oznaczeniami

Próbki były oznaczane w duplikatach w 10 różnych seriach. Współczynniki wariancji były poniżej lub równe 7.1 %.

#### Kontrola dokładności

#### Test rozcieńczenia

Trzy próbki surowicy były seryjnie rozcieńczane kalibratorem zero. Procentowe odzyski obliczono w zakresie 80.5 % do 114 %.

#### Test odzysku

Do trzech próbek surowicy dodano próbki o znanej zawartości DHT. Procentowe odzyski obliczono w zakresie 88.0 % to 107 %.

**Zakres pomiarowy** (od czułości analitycznej testu do stężenia najwyższego kalibratora): 9.14 do około 2,500 pg/mL

## OGRANICZENIA

- Niestosowanie się do instrukcji używania może znacząco wpłynąć na wyniki
- Niewystarczające osuszenie probówek po dekantacji może spowodować słabą replikację i błędne wartości.
- Należy unikać wielokrotnego zamrażania i rozmrażania składników zestawu oraz próbek.
- Nie używać zhemolizowanych, żółtaczkowych i lipemicznych próbek.



- Jeżeli występują objawy świadczące o skażeniu mikrobiologicznym lub nadmierne zmętnienie odczynnika, należy wyrzucić fiolkę.
-

# ACTIVE® Dihydrotestosterone RIA

**REF** DSL9600i

## RADIOIMUNOANALYTICKÉ KVANTITATIVNÍ IN VITRO STANOVENÍ DIHYDROTESTOSTERONU (DHT) V LIDSKÉM SÉRU NEBO PLAZMĚ Pro diagnostické účely *in vitro*.

### PRINCIP

Radioimunoanalytické stanovení dihydrotestosteronu (DHT; 5 $\alpha$ -dihydrotestosteron; 17 $\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ -androstan-3-on) je kompetitivní stanovení. Postup je založen na principu radioimunoanalýzy, kde spolu soutěží radioaktivně značený a neznačený antigen o daný počet vazebných míst na protilátce. Množství 125I-značeného DHT vázaného na protilátku je nepřímo úměrné množství neznačeného DHT přítomného ve vzorku. K separaci vázané a volné frakce z roztoku se používá odsátí nebo dekantace zkumavek pokrytých specifickou protilátkou. Po změření vázané aktivity v gama-čítači se sestrojí kalibrační křivka a z ní se odečtou koncentrace DHT v neznámých vzorcích.

**Souhrn a výklad stanovení jsou uvedeny v příloze "APPENDIX".**

### VAROVÁNÍ A OPATŘENÍ

#### Obecné poznámky:

- Pro diagnostické účely *in vitro*.
- Lahvičky s kalibrátory a kontrolními vzorky nechávejte otevřené jen po nejnutnější dobu, aby nedocházelo k odpařování.
- Nemíchejte substance ze souprav různých šarží.
- Nepoužívejte žádnou složku po uplynutí doby expirace uvedené na jejím štítku.
- Pro každou novou sérii analýz je nutné provést novou kalibraci.
- Doporučuje se provádět stanovení v duplikátech.
- Kalibrátory a kontroly se musí před použitím promíchat převrácením, spíše než na vibračním míchadle vortex.

#### Základní pravidla radiační bezpečnosti

Tento radioaktivní materiál mohou přijímat, skladovat a používat pouze pracovníci, která splňují platné zákonné předpisy upravující podmínky pro bezpečné nakládání s otevřenými radionuklidovými zářiči. Při práci s radioaktivními látkami dodržujte následující pravidla:

- Všechny radioaktivní látky musí být skladovány v původním balení a jen na místech k tomu určených.
- Nepipetujte ústy.
- Při práci s radioaktivními materiály zamezte kontaktu s nimi použitím rukavic a laboratorního pláště.
- Veškerá manipulace s radioaktivními látkami musí probíhat v příslušných prostorách oddělených od chodeb a jiných frekventovaných míst.
- V laboratořích určených k práci s radioaktivními látkami je zakázáno jíst, pít, kouřit, líčit se a pod.
- Obalový materiál, který není kontaminován, je možno odložit do běžného odpadu pouze po odstranění varovných nápisů a značek.
- Povrch pracovních stolů, který by mohl být kontaminován, je třeba pravidelně kontrolovat. Všechno laboratorní sklo, které bylo použito pro práci s radioaktivními látkami, musí být řádně dekontaminováno a proměřeno před dalším použitím.
- V případě kontaminace nebo úniku radioaktivního materiálu postupujte podle stanovených předpisů.
- Radioaktivní odpad likvidujte v souladu s platnými zákony a předpisy.

#### Azid sodný

Některé substance jsou konzervovány azidem sodným. Azid sodný může reagovat s olovem, medí nebo mosazí za vzniku příslušných výbušných azidů. Proto likvidované reagentie splachujte velkým množstvím vody.

#### Materiál lidského původu

Pacientské vzorky a materiály pocházející z krve lze popsaným postupem rutinně zpracovávat s minimálním rizikem. S těmito materiály však zacházejte jako s potenciálně infekčními podle všeobecných bezpečnostních opatření a zásad správné klinické laboratorní praxe bez ohledu na jejich původ, úpravu nebo předchozí certifikaci. K dekontaminaci použijte vhodný

desinfekční prostředek. Tyto materiály a jejich obaly skladujte a likvidujte v souladu s místními předpisy a směrnicemi.

## KLASIFIKACE NEBEZPEČÍ PODLE GHS

Oxidation Solution



H411

Toxický pro vodní organismy, s dlouhodobými účinky.

P273

Zabraňte uvolnění do životního prostředí.

P391

Uniklý produkt seberte. Manganistan draselný 1 - 5%

Sample Buffer

NEBEZPEČÍ



H226

Hořlavá kapalina a páry.

H314

Způsobuje těžké poleptání kůže a poškození očí.

P210

Chraňte před teplem, horkými povrchy a jiskrami. Zákaz kouření.

P280

Používejte ochranné rukavice, ochranný oděv a ochranné brýle/obličejový štít.

P301+P330+P331

PŘI POŽITÍ: Vypláchněte ústa. NEVYVOLÁVEJTE zvracení.

P303+P361+P353

PŘI STYKU S KŮŽÍ (nebo s vlasy): Opláchněte kůži vodou.

P305+P351+P338

PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně vyplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, pokud jsou nasazeny a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování. Okamžitě volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO nebo lékaře. Ethylalkohol 10 - 20% Hydroxid sodný 20 - 30%

P310

**SDS**

Bezpečnostní list je k dispozici na adrese [techdocs.beckmancoulter.com](http://techdocs.beckmancoulter.com)

## SBĚR A PŘÍPRAVA, SKLADOVÁNÍ A ŘEDĚNÍ VZORKŮ

- Odebírejte vzorky krve do zkumavek s EDTA nebo bez aditiv.
- Vzorky séra nechejte před odstředěním náležitě srazit.
- Vzorky séra nebo plazmy lze skladovat při 2-8 °C, jestliže bude stanovení provedeno do 24 hodin. Při delším skladování, nejdéle 1 rok, je nutno vzorky zamrazit při <-20 °C, nejlépe v alikvotech, aby se předešlo opakovanému rozmrazování a zmrazování. Rozmrazování provádějte při laboratorní teplotě.
- Vzorky je třeba před stanovením EXTRAHOVAT, viz Postup.
- Pokud obsahují vzorky vyšší koncentraci než je koncentrace nejvyššího kalibrátoru, je třeba je zředit nulovým kalibrátorem a znovu analyzovat.
- Soupravou DSL9600i bylo porovnáno 19 dvojic vzorků séra a EDTA-plazmy (hodnoty sér byly od 53,75 pg/mL do 341,5 pg/mL). Výsledky dávají rovnici:

[EDTA-plazma] = 0,9592[sérum] + 31,583 R = 0,9783

## POSKYTNUTÉ MATERIÁLY

Všechny reagenty v soupravě jsou stabilní do data expirace, uvedeného na štítku krabice, jestliže jsou skladovány při 2-8 °C. Data expirací uvedených na štítcích jednotlivých složek se vztahují pouze k dlouhodobému skladování u výrobce před kompletací souprav. Neberte na ně tedy, prosím, ohled.

Podmínky pro skladování reagentů po otevření jsou uvedeny v příslušných kapitolách.

**Zkumavky potažené protilátkou proti dihydrotestosteronu: 2 x 50 kusů;** připraveny k použití.

Plastové zkumavky, potažené králičím imunoglobulinem proti DHT na vnitřní stěně každé zkumavky.

**Radioindikátor 125I-DHT: 1 lahvička (55 mL);** lyofilizát

Lahvička obsahuje ke dni výroby 185 kBq (<5 µCi), 125I-značeného DHT v tlumivém roztoku s proteiny (BSA) a azidem sodným (<0,1%). Rekonstituuje obsah lahvičky 55 mL deionizované vody. Po rekonstituci skladujte při 2-8 °C po dobu 14 dnů, aby bylo dosaženo maximálního poměru (%B<sub>0</sub>/T) > 25%.

**Kalibrátory: 1 lahvička (50 mL, označená 0),** připravená k použití + **7 lahviček (označených 1-7);** lyofilizáty

Lahvičky obsahují od 0 do přibližně 2 500 pg/mL (0 do přibližně 8 600 pmol/L) DHT, v tlumivém roztoku s proteiny (BSA) a azidem sodným (<0,1%). Přesné koncentrace jsou uvedeny na štítcích lahviček. Kalibrátory jsou kalibrovány na certifikovaný referenční materiál (Cerilliant). **NEEXTRAHUJTE kalibrátory.**

**Kontrolní vzorky: 2 lahvičky označené 1, 2;** lyofilizáty.

Lahvičky obsahují DHT, lyofilizovaný v lidském séru s azidem sodným (<0,1%). Koncentrační rozsah očekávaných hodnot je uveden v příloze návodu. Kontrolní vzorky **MUSÍ BÝT** před stanovením EXTRAHOVÁNY. Viz. Postup

**Oxidační činidlo: 2 lahvičky (po 25 mL);** připravené k použití

Lahvičky obsahují manganistan draselný (<5%) v pufru s azidem sodným (<0,1%).

**Pufr pro ředění vzorků: 1 lahvička (5,5 mL);** připravená k použití

Lahvička obsahuje tlumivý roztok s <23 % etylalkoholu a <29 % hydroxidu sodného.

## MATERIÁLY POŽADOVÁNY, ALE NEPOSKYTNUTY

Kromě obvyklého laboratorního zařízení je pro analýzu potřebné následující vybavení:

- 12 x 75 mm nebo 13 x 100 mm nebo 16 x 150 mm **SKLENĚNÉ** zkumavky se zátkami,
- stojánek pro zkumavky rozměru 12 x 75 mm,
- Deionizovaná voda.
- přesná mikropipeta (100 µL, 250 µL a 400 µL),
- poloautomatická pipeta (500 µL)
- Vibrační míchadlo.
- skleněné pipety 5 mL dělené – **PRO EXTRAKCI,**
- organická rozpouštědla: n-hexan, a etanol (čistota pro HPLC),
- centrifuga (1500x g, chlazená),
- stlačený dusík nebo vakuová odparka pro vysušení extraktů,
- horizontální třepačka (≥ 180 kmitů /min),
- stojánek s držákem zkumavek – pro dekantaci,
- Vývěva.
- filtrační papír pro osušení zkumavek,
- Gama-čítač, kalibrováný na 125I.
- semi-logaritmičkový (log-lin) papír nebo počítač s programem pro vyhodnocování analýz RIA.

## VÝSLEDKY

Výsledky jsou získány proložením z kalibrační křivky. Křivka slouží k určení koncentrace DHT pouze ve vzorcích měřených současně s kalibrátory.

## Kalibrační křivka

Výsledky uvedené v návodu byly získány v log-lin zobrazení s použitím funkce „spline“. Na vertikální osu bylo vyneseno B/T (%) nebo B/B<sub>0</sub> (%) a na horizontální osu byly vyneseny koncentrace DHT v kalibrátorech (pg/mL). Jiné metody zpracování mohou dávat mírně rozdílné výsledky.

ED50 = 100.7 pg/mL

Celková aktivita: 57 936 cpm				
Calibrators	DHT (pg/mL)	cpm (n=2)	B/T (%)	B/B <sub>0</sub> (%)
0	0	37,670	65,0	100
1	24,0	31,164	53,8	82,7
2	48,0	26,403	45,6	70,1
3	96,0	19,356	33,4	51,4
4	192	12,449	21,5	33,0
5	480	6,948	12,0	18,4
6	960	4,570	7,88	12,1
7	2,400	2,514	4,33	6,67

(Příklad typického stanovení, nepoužívejte pro výpočet.)

## Vzorky

Na vertikální ose lokalizujte pro každý vzorek hodnoty B/T nebo B/B<sub>0</sub> (%) a na horizontální ose odečtěte odpovídající koncentrace DHT v pg/mL. Přepočtení koncentrací z pg/mL na pmol/L se provede vynásobením výsledků faktorem 3,44.

## OČEKÁVANÉ HODNOTY

Každá laboratoř by si měla stanovit vlastní rozmezí referenčních hodnot. Studie provedená na zdravých dospělých dává následující výsledky DHT. Uvádí se pouze jako příklad.

	Stáří	n	Medián (pg/mL)	2,5. Percentil (pg/mL)	97,5. Percentil (pg/mL)	Rozsah (pg/mL)
Muži	20 - 60	119	274,7	109,2	583,1	33,69 - 756,4
Ženy	20 - 60	122	82,81	33,28	196,5	17,67 - 245,8

(podrobnosti jsou uvedeny v příloze "APPENDIX")

## KONTROLA KVALITY

Správná laboratorní praxe předpokládá, že se kontrolní vzorek používá v každé kalibraci, aby se zajistila kontrola kvality získaných výsledků. Kontrolní vzorky musí být zpracovány stejným způsobem jako neznámé vzorky a k vyhodnocení výsledků se mají použít vhodné statistické metody.

Jestliže kontrolní vzorky neposkytnou náležitě hodnoty, může to být známkou nepřesné manipulace, nesprávného nakládání se vzorky nebo znehodnocení reagentů. V případě závažného poškození obalu, nebo jestliže získané výsledky nejsou ve shodě s analytickými parametry stanovení, kontaktujte prosím naše odborné pracovníky. E-mail: imunochem@beckman.com

## POSTUP

### Příprava a skladování reagentů

Vytemperujte všechny reagenty na laboratorní teplotu a řádně je promíchejte jemným převrácením.

### Příprava radioindikátoru

Obsah lahvičky se rozpustí v 55 mL deionizované vody. Po přidání vody nechte volně rozpouštět 10 minut a potom lehce bez napěnění promíchejte. Po rekonstituci skladujte při 2-8 °C po dobu 14 dnů.

### Příprava kalibrátorů a kontrolních vzorků

Obsah lahviček se rozpustí v destilované vodě, její objem je uveden na štítku lahvičky. Po přidání vody nechte volně rozpouštět 10 minut a potom lehce bez napěnění promíchejte. Po rekonstituci skladujte při <-20 °C do data expirace soupravy.

### Extrakce vzorků

*Poznámka: Extrakce musí být prováděna v čistých pokud možno pomocí jednorázových SKLENĚNÝCH zkumavek a pipet. Před použitím vytemperujte oxidační činidlo a ostatní reagenty na laboratorní teplotu (18-25 °C).*

Kontroly a vzorky vyžadují extrakci, neextrahujte kalibrátory.

- Očíslete po jedné zkumavce pro každý kontrolní i neznámý vzorek.

- Napipetujte po 400 µL kontroly nebo vzorku do očišovaných skleněných zkumavek a přidejte 500 µL oxidačního činidla. Řádně promíchejte a inkubujte 15 min při laboratorní teplotě (18-25 °C).
  - Připravte si extrakční směs: 98% n-hexan + 2% etanol
  - Skleněnou pipetou přidejte k oxidovanému vzorku 4,0 mL směsi n-hexan-etanol. Míchejte každou zkumavku po dobu 1 min na vibračním míchadle.
  - Přidejte 50 µL pufru pro ředění vzorků, zazátkujte zkumavku a promíchejte převrácením zkumavky 3-4krát.
  - Centrifugujte 15 min při 2-8 °C a 1500x g, aby se oddělila organická a vodná fáze.
  - Přeneste 2,5 mL horní organické fáze do shodně očišovaných čistých skleněných zkumavek a odpaňte do sucha buď pod proudem dusíku nebo na vakuové odparce s ohřevem.
- Rozpusťte suchý extrakt 250 µL nulového kalibrátoru. Důkladne zvortexujte a nechte při laboratorní teplotě (18-25 °C) minimálně 1 hodinu.

#### POZNÁMKA:

- NEEEXTRAHUJTE KALIBRÁTORY
- Používejte zkumavky o rozměru 12 x 75 mm nebo 13 x 100 mm se zátkami. Pokud nemáte zátky, použijte zkumavky rozměru 16 x 150 mm a zakryjte je alobalem, aby se neopařovala organická rozpouštědla.
- Nepoužívejte lipemické vzorky.

#### Schéma postupu

Kalibrátory, kontrolní vzorky a neznámé vzorky analyzujte v duplikátech.

Krok 1 Pipetace	Krok 2 Inkubace	Krok 3 Měření
<p>Extrahujte kontrolní a neznámé vzorky podle kap. Postup.</p> <p>Do potažených zkumavek pipetujte na dno postupně:</p> <p>100 µL kalibrátoru, kontroly nebo vzorku, a okamžitě 500 µL radioindikátoru.*</p> <p>Promíchejte všechny zkumavky.</p>	<p>Zakryjte a inkubujte 2 hodiny za stálého třepání (≥180 kmitů/min) při laboratorní teplotě (18-25 °C).</p> <p>Odsajte nebo vylijte obsah zkumavek do radioaktivního odpadu (s výjimkou 2 zkumavek pro „total“).</p>	<p>Napipetujte 3,0 mL deionizované vody (s výjimkou 2 zkumavek pro „total“).</p> <p>Odsajte nebo vylijte obsah zkumavek do radioaktivního odpadu (s výjimkou 2 zkumavek pro „total“). Oklepněte zbylé kapky na savý podklad.</p> <p>Oklepněte zkumavky na savý materiál a nechte nejméně 2 minuty okapat. Otfete okraj zkumavek.</p> <p>Měřte po dobu 1 min. vázanou aktivitu (B) a celkovou aktivitu (T).</p>

\*Napipetujte po 500 µL radioindikátoru do 2 nepotažených zkumavek pro zjištění celkové aktivity (T).

## FUNKČNÍ CHARAKTERISTIKY (podrobnosti jsou uvedeny v příloze “APPENDIX”)

Vzorová data slouží pouze k ilustrativním účelům. Výsledky získané v jednotlivých laboratořích se mohou lišit.

#### Citlivost

**Analýtická citlivost:** 9,14 pg/mL

**Funkční citlivost:** 19,63 pg/mL

#### Specifita

Protílátka použitá v systému je vysoce specifická pro DHT. Ostatní příbuzné molekuly (androstendion, estradiol, testosteron atd.) dávají extrémně nízkou zkříženou reakci.

#### Přesnost

##### Intra-assay

Přesnost intra-assay byla stanovena 25krát opakovanou analýzou. Hodnota variačního koeficientu byla menší nebo rovna 7,9 %.

##### Inter-assay

Vzorky byly analyzovány duplikátech v 10 nezávislých analýzách. Hodnota variačních koeficientů byla menší nebo rovna 7,1 %.

#### Správnost

##### Test ředění

Vzorky s vysokou koncentrací byly postupně ředěny nulovým kalibrátorem a analyzovány. Naměřené hodnoty „recovery“ se pohybovaly v rozmezí 80,5% až 114 %.

##### Test „recovery“

Ke vzorkům byla přidána různá známá množství DHT a vzorky byly analyzovány. Naměřené hodnoty „recovery“ se pohybovaly v rozmezí 88,0% až 107 %.

**Rozsah stanovení** (od analytické citlivosti do nejvyššího kalibrátoru): Od 9,14 do přibližně 2 500 pg/mL.

## OMEZENÍ

- Nedodržení instrukcí uvedených v tomto návodu může vést k nesprávným výsledkům.
- Nedostatečné osušení zkumavek po dekantaci může vést k nepřesným výsledkům.
- Vyhněte se opakovanému zmrazování a rozmrazování reagensů a vzorků.
- Nepoužívejte hemolyzované, ikterické ani lipemické vzorky.
- Pokud reagensie jeví známky mikrobiální kontaminace nebo je silně zakalená, lahvičku vylijte.

# ACTIVE® Dihydrotestosterone RIA

**REF** DSL9600i

## KVANTITATÍVNE RÁDIOIMUNOANALYTICKÉ IN VITRO STANOVENIE DIHYDROTESTOSTERÓNU (DHT) V ĽUDSKOM SÉRE

Na *in vitro* diagnostické použitie.

### PRINCÍP

Rádioimunoanalytické stanovenie dihydrotestosteronu (DHT; 5 $\alpha$ -dihydrotestosteron; 17 $\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ -androstán-3-on) je kompetitívne stanovenie. Postup je založený na princípe rádioimunoanalýzy, kde spolu súťažia rádioaktívne značený a neznačený antigén o daný počet väzbových miest na protilátke. Množstvo 125I-značeného DHT viazaného na protilátku je nepriamo úmerné množstvu neznačeného DHT prítomného vo vzorke. K separácii viazanej a voľnej frakcie z roztoku sa používajú skúmavky potiahnuté špecifickou protilátkou. Po zmeraní viazanej aktivity v gama-čítači sa zostrojí kalibračná krivka a z nej sa odpočítajú koncentrácie DHT v neznámych vzorkách.

Súhrn a výklad stanovení sú uvedené v prílohe "APPENDIX".

## VÝSTRAHA A OPATRENIA

Obecné poznámky:

- Na *in vitro* diagnostické použitie.
- Fľaštičky a kalibrátormi a kontrolnými vzorkami nechávajte otvorené čo najkratšie, aby nedochádzalo k odparovaniu.
- Nemiešajte substancie zo súprav rôznych šarží.
- Nepoužívajte žiadnu zložku po uplynutí expirácie uvedenej na jej štítku.
- Ku každému radu stanovení je treba vždy stanoviť novú kalibračnú závislosť.
- Doporučuje sa robiť stanovenia v duplikátoch.
- kalibrátory a kontroly sa musia pred použitím premiešať prevracaním, skôr ako na vibračnom miešadle vortex.

### Základné pravidlá radiačnej bezpečnosti

Tento rádioaktívny materiál môžu prijímať, skladovať a používať iba pracovníčky, ktoré spĺňajú platné zákonné predpisy upravujúce podmienky pre bezpečné nakladanie s otvorenými rádionuklidovými žiaričmi. Pri práci s rádioaktívnymi látkami dodržujte nasledujúce pravidlá:

- Všetky rádioaktívne látky sa musia skladovať v pôvodnom balení a iba na miestach k tomu určených.
- Nepipetujte ústami.
- Používaním rukavíc a laboratórneho pláštá zabráňte kontaktu s rádioaktívnymi materiálmi.
- Všetky manipulácie s rádioaktívnymi látkami by sa mali vykonávať na vhodnom mieste mimo chodieb a iných rušných priestorov.
- V laboratóriách určených na prácu s rádioaktívnymi látkami je zakázané jesť, piť, fajčiť, líčiť sa a pod.
- Obalový materiál, ktorý nie je kontaminovaný, možno odložiť do bežného odpadu až po odstránení výstražných nápisov a značiek.
- Povrch pracovných stolov, ktorý by mohol byť kontaminovaný, treba pravidelne kontrolovať.
- V prípade kontaminácie alebo úniku rádioaktívneho materiálu postupujte podľa stanovených predpisov.
- Rádioaktívny odpad likvidujte v súlade s platnými zákonmi a predpismi.

### Azid sodný

Niektoré substancie sú konzervované azidom sodným. Azid sodný môže reagovať s olovom, meďou alebo mosadzou za vzniku príslušných výbušných azidov. Preto likvidované reagentie splachujte veľkým množstvom vody.

### Materiál ľudského pôvodu

Pacientove vzorky a materiály pochádzajúce z krvi možno popísaným postupom rutinne spracovávať s minimálnym rizikom. S týmito materiálmi však zachádzajte ako s potenciálne infekčnými podľa všeobecných bezpečnostných opatrení a zásad správnej klinickej laboratórnej praxe bez ohľadu na ich pôvod, úpravu alebo predchádzajúcu certifikáciu. Pre

dekontamináciu používajte vhodný dezinfekčný prostriedok. Tieto materiály a ich obaly skladujte a likvidujte v súlade s miestnymi predpismi a smernicami.

## KLASIFIKÁCIA RIZÍK PODĽA GHS

Oxidation Solution



H411

Toxický pre vodné organizmy, s dlhodobými účinkami.

P273

Zabráňte uvoľneniu do životného prostredia.

P391

Zozbierajte uniknutý produkt.  
Manganistan draselný 1 - 5%

Sample Buffer

NEBEZPEČENSTVO



H226

Horľavá kvapalina a pary.

H314

Spôsobuje vážne poleptanie kože a poškodenie očí.

P210

Uchovávajte mimo dosahu tepla, horúcich povrchov a iskier. Nefajčite.

P280

Noste ochranné rukavice/ochranný odev a ochranné okuliare/ochranu tváre.

P301+P330+P331

PO POŽITÍ: vypláchnite ústa. Nevyvolávajte zvracanie.

P303+P361+P353

PRI KONTAKTE S POKOŽKOU (alebo vlasmi): Pokožku opláchnite vodou.

P305+P351+P338

PO ZASIAHNUTÍ OČÍ: Niekoľko minút ich opatrne vyplachujte vodou. Ak používate kontaktné šošovky a ak je to možné, odstráňte ich. Pokračujte vo vyplachovaní.

P310

Okamžite volajte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÉ CENTRUM/lekára/...  
Etanol 10 - 20%  
Hydroxid sodný 20 - 30%



Bezpečnostný list je k dispozícii na stránkach [techdocs.beckmancoulter.com](http://techdocs.beckmancoulter.com)

## ZBER A PRÍPRAVA, SKLADOVANIE A RIEDENIE VZORIEK

- Odoberajte vzorky krvi do skúmaviek s EDTA alebo bez aditív.
- Vzorky krvi nechajte pred centrifugáciou úplne vyzárať.
- Vzorky séra alebo plazmy možno skladovať pri 2-8 °C, ak bude stanovenie urobené do 24 hodín. Pri dlhšom skladovaní (najdlhšie 1 rok) je nutné vzorky zamraziť pri <-20 °C, najlepšie v alikvótach, aby se predišlo opakovanému rozmrazovaniu a zmrazovaniu. Rozmrazovanie robte pri laboratórnej teplote.
- Vzorky je treba pred stanovením EXTRAHOVAŤ, viď § Postup.
- Pokiaľ obsahujú vzorky vyššie koncentrácie ako je koncentrácia najvyššieho kalibrátora, je treba ich zriediť nulovým kalibrátorom a znovu analyzovať.

- Sérum a EDTA plazma hodnoty pre 19 vzoriek (sérové hodnoty v rozmedzí 53,75 až 341,5 pg/mL) boli porovnané pomocou súpravy DSL9600i. Výsledky sú následovné:

$$[\text{EDTA-plazma}] = 0,9592[\text{sérum}] + 31,583 \text{ R} = 0,9783$$

## POSKYTOVANÝ MATERIÁL

Všetky reagensy v súprave sú stabilné do dátumu expirácie, uvedeného na štítku krabice, ak sú skladované pri 2-8 °C. Dátumy expirácií uvedených na štítkoch jednotlivých zložiek sa vzťahujú iba na dlhodobé skladovanie u výrobcu pred kompletizáciou súprav. Neberte na ne, prosím, ohľad.

Podmienky pre skladovanie reagensov po otvorení sú uvedené v príslušných kapitolách.

**Skúmavky potiahnuté protilátkou proti dihydrotestosterónu: 2 x 50 kusov;** pripravené k použitiu.

Plastové skúmavky, potiahnuté zajačím imunoglobulínom proti DHT na vnútornej stene každej skúmavky.

**Rádioindikátor 125I-DHT: 1 fľaštička (55 mL);** lyofilizát.

Fľaštička obsahuje ku dňu výroby 185 kBq (<5 µCi), 125I-značeného DHT v tlmivom roztoku s proteínmi (BSA) a azidom sodným (<0,1%). Rekonštituuje obsah fľaštičky 55 mL deionizovanej vody. Po rekonštitúcii skladujte pri 2-8 °C po dobu 14 dní, aby bolo dosiahnuté maximálneho pomeru (%B<sub>0</sub>/T) > 25%.

**Kalibrátory: 1 fľaštička (50 mL, označená 0);** pripravená k použitiu + 7 fľaštičiek (označených 1-7); lyofilizáty.

Fľaštičky obsahujú od 0 do približne 2 500 pg/mL (0 do približne 8 600 pmol/L) DHT, v tlmivom roztoku s proteínmi (BSA) a azidom sodným (<0,1%). Presné koncentrácie sú uvedené na štítkoch fľaštičiek. Kalibrátory sú kalibrované na certifikovaný referenčný materiál (Cerilliant). NEEEXTRAHUJTE kalibrátory.

**Kontrolné vzorky: 2 fľaštičky označené 1, 2;** lyofilizáty.

Fľaštičky obsahujú DHT, lyofilizované v ľudskom sére s azidom sodným (<0,1%). Koncentračný rozsah očakávaných hodnôt je uvedený v prílohe návodu. Kontrolné vzorky MUSIA BYŤ pred stanovením EXTRAHOVÁNE, viď § Postup.

**Oxidačné činidlo: 2 fľaštičky (po 25 mL);** pripravené k použitiu.

Fľaštičky obsahujú manganistan draselný (<5 %) v pufré s azidom sodným (<0,1 %).

**Pufer pre riedenie vzoriek: 1 fľaštička (5,5 mL);** pripravená k použitiu.

Fľaštička obsahuje tlmivý roztok s <23 % etylalkoholu a <29 % hydroxidu sodného.

## POTREBNÝ MATERIÁL, KTORÝ SA NEPOSKYTUJE

Okrem obvyklého laboratórneho zariadenia je pre analýzu potrebné nasledujúce vybavenie:

- 12 x 75 mm alebo 13 x 100 mm alebo 16 x 150 mm **SKLENENÉ** skúmavky so zátkami,
- stojan pre skúmavky rozmeru 12 x 75 mm,
- Deionizovaná voda
- presná mikropipeta (100 µL, 250 µL a 400 µL),
- poloautomatická pipeta (500 µL)
- Vibračné miešadlo.
- sklenené pipety 5 mL delené – **PRE EXTRAKCIU**,
- organické rozpúšťadlá: n-hexan, a etanol (čistota pre HPLC),
- centrifúga (1500x g, chladená),
- stlačený dusík alebo vakuová odpadka pre vysušenie extraktov,
- horizontálna trepačka (≥ 180 kmitov/min)
- stojan s držiakom skúmaviek – pre dekantáciu,
- Výveva.
- filtračný papier pre osušenie skúmaviek,
- Gama-merač kalibrovaný na 125I.
- semi-logaritmickej (log-lin) papier alebo počítač s programom pre vyhodnocovanie analýz RIA.

## VÝSLEDKY

Výsledky sú získané preložením z kalibračnej krivky. Krivka slúži k určeniu koncentrácie DHT iba vo vzorkách meraných súčasne s kalibrátormi.

## Kalibračná krivka

Výsledky uvedené v návode boli získané v log-lin zobrazení s použitím funkcie „spline“. Na vertikálnu os boli vynesené B/T (%) alebo B/B<sub>0</sub> (%) a na horizontálnu os boli vynesené koncentrácie DHT v kalibrátoroch (pg/mL). Iné metódy spracovania môžu dávať mierne rozdielne výsledky.

$$\text{ED50} = 100.7 \text{ pg/mL}$$

Celková aktivita: 57 936 cpm				
Calibrators	DHT (pg/mL)	cpm (n=2)	B/T (%)	B/B <sub>0</sub> (%)
0	0	37,670	65,0	100
1	24,0	31,164	53,8	82,7
2	48,0	26,403	45,6	70,1
3	96,0	19,356	33,4	51,4
4	192	12,449	21,5	33,0
5	480	6,948	12,0	18,4
6	960	4,570	7,88	12,1
7	2,400	2,514	4,33	6,67

(Príklad typického stanovenia, nepoužívajte pre výpočet.)

## Vzorky

Na vertikálnej ose lokalizujte pre každú vzorku hodnoty B/T alebo B/B<sub>0</sub> (%) a na horizontálnej ose odčítajte odpovedajúce koncentrácie DHT v pg/mL. Prepočet koncentrácií z pg/mL na pmol/L sa urobí vynásobením výsledkov faktorom 3,44.

## OČAKÁVANÉ HODNOTY

Každé laboratórium by si malo stanoviť vlastné rozmedzie referenčných hodnôt. Štúdia urobená na zdravých dospelých dáva nasledujúce výsledky DHT. Uvádza sa iba ako príklad.

	Vek	n	Medián (pg/mL)	2,5. Percentil (pg/mL)	97,5. Percentil (pg/mL)	Rozsah (pg/mL)
Muž	20 - 60	119	274,7	109,2	583,1	33,69 - 756,4
Žena	20 - 60	122	82,81	33,28	196,5	17,67 - 245,8

(podrobnosti sú uvedené v prílohe "APPENDIX")

## KONTROLA KVALITY

Správna laboratórna prax predpokladá, že sa kontrolná vzorka používa v každej kalibrácii, aby sa zaisťovala kontrola kvality získaných výsledkov. Kontrolné vzorky musia byť spracované rovnakým spôsobom ako neznáme vzorky a k vyhodnoteniu výsledkov sa majú použiť vhodné štatistické metódy.

nesprávneho manipulovania so vzorkami alebo znehodnotenia reagensov. V prípade závažného poškodenia obalu, alebo ak získané výsledky nie sú v zhode s analytickými parametrami stanovenia, kontaktujte prosím našich odborných pracovníkov. E-mail: imunochem@beckman.com

## POSTUP

### Priprava reagensov

Vytemperujte všetky reagensy na laboratórnu teplotu a riadne ich premiešajte jemným prevracaním.

### Priprava rádioindikátoru

Obsah fľaštičky sa rozpustí v 55 mL deionizovanej vody. Po pridaní vody nechajte voľne rozpúšťať 10 minút a potom ľahko bez napenenia premiešajte. Po rekonštitúcii skladujte pri 2-8 °C po dobu 14 dní.

### Priprava kalibrátorov a kontrolných vzoriek

Obsah fľaštičiek sa rozpustí v deionizovanej vode, ktorej objem je uvedený na štítku fľaštičky. Po pridaní vody nechajte voľne rozpúšťať 10 minút a potom ľahko bez napenenia premiešajte. Po rekonštitúcii skladujte pri <-20 °C do dátumu expirácie súpravy.

### Extrakcia vzoriek

*Poznámka: Extrakcia musí byť prevedená v čistých pokiaľ možno pomocou jednorázových SKLENENÝCH skúmaviek a pipiet. Pred použitím vytemperujte oxidačné činidlo a ostatné reagensy na laboratórnu teplotu (18-25 °C).*

Kontroly a vzorky vyžadujú extrakciu, neextrahujte kalibrátory.

- Očislujte po jednej skúmavke pre každú kontrolnú i neznámu vzorku.

- Nepipetujte po 400 µL kontroly alebo vzoriek do očíslovaných sklenených skúmaviek a pridajte 500 µL oxidačného činidla. Riadne premiešajte a inkubujte 15 min pri laboratórnej teplote (18-25 °C).
  - Pripravte si extrakčnú zmes: 98% n-hexan + 2% etanol
  - Sklenenou pipetou pridajte k oxidovanej vzorke 4,0 mL zmesi n-hexan-etanol. Miešajte každú skúmavku po dobu 1 min na vibračnom miešadle.
  - Pridajte 50 µL pufru pre riedenie vzoriek, zazátkujte skúmavku a premiešajte prevracaním skúmavky 3-4krát.
  - Centrifugujte 15 min pri 2-8 °C a 1500x g, aby sa oddelila organická a vodná fáza.
  - Preneste 2,5 mL hornej organickej fázy do shodne očíslovaných čistých sklenených skúmaviek a odparte do sucha buď pod prúdom dusíku alebo na vakuovej odparovačke s ohrevom.
- Rozpusťte suchý extrakt 250 µL nulového kalibrátora. Premiešajte na vibračnom miešadle a ponechte pri laboratórnej teplote (18-25 °C) minimálne 1 hodinu.

#### POZNÁMKA:

- NEEXTRAHUJTE KALIBRÁTORY
- Používajte skúmavky o rozmere 12 x 75 mm alebo 13 x 100 mm so zátkami. Pokiaľ nemáte zátky, použite skúmavky rozmeru 16 x 150 mm a zakryte ich alobalom, aby sa neodparovala organická rozpúšťadlá.
- Nepoužívajte lipemické vzorky.

#### Schéma postupu

Kalibrátory, kontrolné vzorky a neznáme vzorky analyzujte v duplikátoch.

Krok 1 Pipetácia	Krok 2 Inkubácia	Krok 3 Meranie
<p>Extrahujte kontrolné a neznáme vzorky podľa kap. Postup.</p> <p>Do potiahnutých skúmaviek pipetujte na dno postupne:</p> <p>100 µL kalibrátora, kontroly alebo vzorky, a okamžite 500 µL rádioindikátora.*</p> <p>Premiešajte.</p>	<p>Zakryte a inkubujte 2 hodiny za stáleho trepania (≥180 kmitov/min) pri laboratórnej teplote (18-25 °C).</p> <p>Odsajte alebo vylejte obsah skúmaviek do rádioaktívneho odpadu (s výnimkou 2 skúmaviek pre „total“).</p>	<p>Napipetujte 3,0 mL deionizovanej vody (s výnimkou 2 skúmaviek pre „total“).</p> <p>Odsajte alebo vylejte obsah skúmaviek do rádioaktívneho odpadu (s výnimkou 2 skúmaviek pre „total“).</p> <p>Oklepte kvapky na savý podklad.</p> <p>Oklepte skúmavky na savý materiál a nechajte najmenej 2 minúty odkvapkať. Otrite okraj skúmaviek. Merajte po dobu 1 min. viazanú aktivitu (B) a celkovú aktivitu (T).</p>

\*Napipetujte po 500 µL rádioindikátora do 2 nepotiahnutých skúmaviek na zistenie celkovej aktivity (T).

## VÝKONNOSTNÉ CHARAKTERISTIKY (podrobnosti sú uvedené v prílohe “APPENDIX”)

Vzorové dáta slúžia iba k informačným účelom. Výsledky získané v jednotlivých laboratóriách sa môžu líšiť.

#### Citlivosť

**Analytická citlivosť:** 9,14 pg/mL

**Funkčná citlivosť:** 19,63 pg/mL

#### Špecifita

Protílátka použitá v systéme je vysoko špecifická pre DHT. Ostatné príbuzné molekuly (androstendion, estradiol, testosterón atď.) dávajú extrémne nízku skríženú reakciu.

#### Presnosť

##### Intra-assay

Presnosť intra-assay bola stanovená 25krát opakovanou analýzou. Hodnota variačného koeficientu bola menšia alebo rovná 7,9 %.

##### Inter-assay

Vzorky boli stanovené v duplikátoch v 10 rôznych stanoveniach. Nájdené hodnoty variačných koeficientov nepresiahli 7,1 %.

#### Správnosť

##### Test riedenia

Vzorky s vysokou koncentráciou boli postupne riedené nulovým kalibrátorom a analyzované. Namerané hodnoty „recovery“ sa pohybovali v rozmedzí 80,5% až 114 %.

##### Test „recovery“

Ku vzorkám boli pridané rôzne známe množstvá DHT a vzorky boli analyzované. Namerané hodnoty „recovery“ sa pohybovali v rozmedzí 88,0% až 107 %.

**Rozsah stanovenia** (od analytickej citlivosti po najvyšší kalibrátor): od 9,14 do približne 2 500 pg/mL.

## OBMEDZENIA

- Nedodržanie inštrukcií uvedených v tomto návode môže viesť k nesprávnym výsledkom.
- Výsledky stanovenia by mali byť interpretované vo svetle celkového klinického obrazu pacienta vrátane anamnézy, údajov z ďalších testov a iných vhodných informácií.
- Vyhnite sa opakovanému zmrazovaniu a rozmrazovaniu reagensov a vzoriek.
- Nepoužívajte silne hemolyzované, ikterické ani lipemické vzorky.
- Pokiaľ sa v reagensoch objavia známky mikrobiálnej kontaminácie alebo nadmerný zákal, obsah fľaštičky zlikvidujte.

# ACTIVE® Dihydrotestosterone RIA

**REF** DSL9600i

## İNSAN SERUM VEYA PLAZMASINDA DIHIDROTESTOSTERON (DHT)'NİN KANTİTATİF ÖLÇÜMÜ İÇİN IN VITRO RADIOİMMUNOASSAY KİTTİR *In vitro* diagnostik kullanım içindir.

### PRENSİP

Dihydrotestosteron (5 $\alpha$ -Dihydrotestosterone; DHT; 17 $\beta$ -Hydroxy-5 $\alpha$ -androstan-3-one), radio-immunoassay testi, bir yarışma deneyidir. Prosedür, radyoaktif ve radyoaktif olmayan antijenlerin belli sayıda antikor bağlanmış bölgeler için yarışması temeline dayalı, radioimmunoassay prensibine göre çalışır. Antikora bağlanmış [125I]-işaretlenmiş DHT miktarı, işaretlenmemiş DHT miktarı ile ters orantılıdır. Serbest ve bağlanmış antijenin ayrıştırılması, antikor kaplanmış tüplerin yıkanması ve aspire edilmesi ile sağlanır. Bir kalibrasyon eğrisi oluşturulur ve bilinmeyen DHT değerleri interpolasyon yöntemiyle eğriden tespit edilirler.

**Testin Özeti ve Açıklaması için APPENDIX-EK'e bakınız.**

### UYARILAR VE ÖNLEMLER

#### Genel yorumlar:

- *In vitro* diagnostik kullanım içindir.
- Kalibratör ve kontrol şişeleri, buharlaşmayı önlemek amacıyla mümkün olduğunca kısa süreli açık kalmalıdır.
- Farklı lotlardan kit reaktiflerini karıştırmayınız.
- Hiçbir bileşeni etiketinde gösterilen son kullanma tarihinden sonra kullanmayın.
- Her deney için bir standard eğrisi dahil edilmelidir.
- Testi duplike olarak çalışmak önerilmektedir.
- Kalibratörler ve kontroller kullanılmadan önce elde çevirerek karıştırılmalıdır, vortekslemek önerilmez.

#### Radyasyon güvenliği için temel kurallar

Radyasyon güvenliği için temel kurallar Satınalma, sahip olma, kullanma ve radyoaktif materyalin taşınması, kullanılan ülkenin yönetmeliğine tabidir. Radyasyon güvenliğinin temel kurallarına bağlı kalınması, yeterli korumayı sağlayacaktır.

- Radyoaktif materyallerin bulunduğu ortamda yeme, içme, sigara içme, kozmetik uygulaması gibi faaliyetler gerçekleştirilmemelidir.
- Ağızla pipetleme yapılmamalıdır.
- Radyoaktif maddelerle temastan kaçınmak için eldiven ya da laboratuvar önlüğü kullanın.
- Radyoaktif maddelerle ilgili tüm işlemler, koridorlardan ve diğer işlek bölümlerden uzakta, uygun bir yerde yapılmalıdır.
- Radyoaktif materyaller, bu malzemeler için ayrılmış bir bölümde ve kapalı bir dolapta saklanmalıdır.
- Radyoaktif ürünlerin girişi ve saklanması ile ilgili bir kayıt güncel olarak tutulmalıdır.
- Kontaminasyona uğramış laboratuvar ekipmanları ve tüpler, farklı radyoizotopların çapraz kontaminasyonunu önlemek için ayrı tutulmalıdır.
- Her bir radyoaktif kontaminasyon veya radyoaktif malzeme kayıp vakası, belirlenen prosedürler izlenerek çözülmelidir.
- Radyoaktif atıklar, ülkenin kurallarına uyularak ele alınmalı ve yok edilmelidir.

#### Sodyum asit

Bazı reaktifler koruyucu olarak sodyum asit içermektedir. Sodyum asit, kurşun, bakır veya pirinç ile reaksiyona girebilir ve patlayıcı metal asitler oluşturabilir. Reaktiflerin, lavabo ve boru sisteminden bol su akıtılarak giderilmesi gerekmektedir.

#### İnsan kaynaklı materyal

Hasta örnekleri ve kandan elde edilen ürünler, belirtilen prosedür kullanılarak minimum risk ile rutin biçimde çalışılabilir. Fakat bu ürünleri, kaynağına, işlenmesine veya ön sertifikalarına bakılmaksızın evrensel koruma önlemlerine ve iyi klinik laboratuvar uygulamalarına uygun olarak bulaşıcı potansiyele sahip maddeler gibi kullanın. Dekontaminasyon için uygun bir

dezenfektan kullanın. Bu maddeleri ve kaplarını yerel yönetmeliklere ve kılavuzlara uygun olarak saklayın ve atın.

## GHS TEHLİKE SINIFLANDIRMASI

Oxidation Solution



H411

Sucul ortamda uzun süre kalıcı, toksik etki.

P273

Çevreye verilmesinden kaçının.

P391

Döküntüleri toplayın.  
Potasyum Permanganat 1 - 5%

Sample Buffer

TEHLİKE



H226

Alevlenir sıvı ve buhar.

H314

Ciddi cilt yanıklarına ve göz hasarına yol açar.

P210

Isıdan, sıcak yüzeylerden ve kıvılcımdan uzak tutun.  
Sigara içilmez.

P280

Koruyucu eldiven, koruyucu kıyafet ve göz koruyucu/yüz koruyucu kullanın.

P301+P330+P331

YUTULMASI HALİNDE: ağzınızı çalkalayın. İstifra etmeye ÇALIŞMAYIN.

P303+P361+P353

CİLDİN (VEYA SAÇIN) ÜZERİNDE OLMASI HALİNDE: Cildinizi su ile durulayın.

P305+P351+P338

GÖZLE TEMASI HALİNDE: Birkaç dakika dikkatli şekilde suyla yıkayın. Varsa ve çıkarılması kolaysa, kontak lensleri çıkarın. Yıkamaya devam edin.

P310

Hemen ULUSAL ZEHİR DANIŞMA MERKEZİNİN 114 NOLU TELEFONUNU veya doktoru/hekimi arayın.  
Etil Alkol 10 - 20%  
Sodyum Hidroksit 20 - 30%

**SDS**

Güvenlik Bilgi Formuna [techdocs.beckmancoulter.com](http://techdocs.beckmancoulter.com) adresinden ulaşılabilir

## NUMUNE TOPLANMASI, SAKLANMASI VE DİLÜSYONU

- Numune tipi olarak serum veya plazma (EDTA) önerilmektedir.
- Santrifüj öncesinde serum örneklerinin tamamen pıhtılaşmasını bekleyin.
- Ayrılmış serum veya plazmayı 24 saat 2-8 °C'de saklayınız. 1 yıl kadar uzun süreli saklamak için <-20 °C'de dondurulması önerilir. Dondurma ve çözme işlemini tekrarlamamak için numunelerin bölünerek dondurulması önerilir. Numunelerin buzu oda ısısında çözündürülmelidir.
- Numuneler testten önce mutlaka EKSTRAKTE edilmelidir. Prosedür bakınız.
- En yüksek kalibratörün konsantrasyonundan daha yüksek okumalar 0 pg/mL kalibratör ile dilüe edilerek tekrar test edilmelidir.
- Değerleri 53,75 ile 341,5 pg/mL arasında değişen 19 adet EDTA'lı plazma numunesinin değerleri DSL9600i kiti kullanılarak karşılaştırılmıştır. Sonuçlar şu şekildedir



[EDTA-plasma] = 0,9592[serum] + 31,583 R = 0,9783

ED50 = 100.7 pg/mL

## SAĞLANAN MALZEMELER

2-8°C'de saklandığında bütün reaktifler, kit etiketindeki son kullanma tarihine kadar stabildir. Şişe üzerindeki son kullanma tarihleri sadece üretici tarafından içeriklerin uzun süreli saklanmaları durumunda geçerlidir.

Açılmış reaktifler için saklama koşulları, ilgili paragraflarda belirtilmiştir.

**Anti-dihidrottestosteron antikör kaplanmış tüpler: 2 x 50 tüpler** (kullanıma hazır)

Tüplerin iç duvarı poliklonal tavşan anti-DHT immunoglobulinle sabitlenmiş plastik tüpler.

**125İ-ışaretlenmiş dihidrottestosteron tracer: 55 mL bir şişe** (liyofilize)

Üretim tarihinde şişe, sodyum asit (<0,1 %) ve proteinler (BSA) içeren tampon içinde 185 kBq (<5 µCi) 125İ-ışaretlenmiş DHT içerir. Tracer'ı 55 mL deiyonize su ile çözünüz. Çözüldükten sonra, en yüksek bağlanma oranına ulaşmak için (%B<sub>0</sub>/T) > 25 %, 14 güne kadar 2-8 °C'de saklayınız.

**Kalibratörler: 0 ışıaretlenmiş 50 mL bir şişe** (kullanıma hazır) **ve 1-7 ışıaretlenmiş yedi şişe** (liyofilize).

Kalibratör şişeleri, sodyum asit (<0,1 %) ve protein (BSA) içeren tampon içinde 0 ile yaklaşık 2 500 pg/mL (0 ile yaklaşık 8 600 pmol/L) arasında dihidrottestosteron içerir. Tam konsantrasyon, her bir şişenin üzerindeki etikette belirtilmiştir. Kalibratör değerleri, onaylı referans materyali (Cerilliant) kullanılarak oluşturulmuştur. Kalibratörleri testten önce ekstrakte etmeyiniz.

**Kontroller: 1, 2 etiketlenmiş iki şişe** (liyofilize)

Şişeler, sodyum asit (<0,1 %) ve insan serumunda dihidrottestosteron içerir. Beklenen değerler, kit içinde sağlanan ekte belirtilmiştir. Testten önce kontroller ekstrakte edilmelidir! (Prosedür bakınız).

**Oksidasyon Solüsyonu: 25 mL iki şişe** (kullanıma hazır)

Şişeler, sodyum asit (<0,1 %) içeren bir tampon içinde potasyum permanganat solüsyonu (<5 %) içerir.

**Numune tamponu: 5,5 mL bir şişe** (kullanıma hazır)

Şişe, <23 % Etil Alkol ve <29 % Sodyum Hidroksit tamponu içerir.

## GEREKEN ANCAK SAĞLANMAYAN MALZEMELER

Standard laboratuvar ekipmanlarına ek olarak aşağıdaki malzemeler gerekmektedir:

- 12 x 75 mm veya 13 x 100 mm veya 16 x 150 mm **CAM** tüpler ve güvenlik kapakları.
- 12 x 75 mm tüpler için rack.
- Deiyonize su.
- Hassas mikropipet (100 µL, 250 µL ve 400 µL).
- Yarı-otomatik pipet (500 µL).
- Vorteks tipi mikser.
- 5 mL dereceli cam pipetler - **EKSTRAKSİYONDA KULLANILACAK.**
- Organik çözücüler: n-hexane ve etanol (HPLC sınıfı).
- Santrifüj (1500 x g, tercihen soğutuculu).
- Nitrojen gazı veya ısıtılmalı speed-vac gereci (ekstraksiyonlar için).
- ≥ 180 rpm hızında çalkalayıcı.
- Tüpleri boşaltmak için süngerli rack veya benzer bir gereç.
- Aspirasyon sistemi.
- Tüplerin içini kurutmak için kağıt havlu
- 125 iyot için gamma counter seti.
- Semi-log (log-linear) grafik kağıdı veya RIA veri analizi için bilgisayar programı.

## SONUÇLAR

Sonuçlar, standard eğrisinden interpolasyon yoluyla alınır. Eğri, kalibratörlerle aynı anda ölçülen numunedeki DHT konsantrasyonunu belirlemede hizmet eder.

### Standard eğrisi

Paket içindeki kullanma kılavuzundaki sonuçlar, dikey ekseninde yarı logaritmik ("spline" mode) eğri çizgisi le B/T (%) veya B/B<sub>0</sub> (%) ve yatay ekseninde (pg/mL) kalibratörlerin DHT konsantrasyonları kullanılarak hesaplanmıştır. Diğer veri indirgeme metodları biraz farklı sonuçlar verebilir.

PI-DSL96001-02

Total aktivite: 57,936 cpm				
Calibrators	DHT (pg/mL)	cpm (n=2)	B/T (%)	B/B <sub>0</sub> (%)
0	0	37,670	65,0	100
1	24,0	31,164	53,8	82,7
2	48,0	26,403	45,6	70,1
3	96,0	19,356	33,4	51,4
4	192	12,449	21,5	33,0
5	480	6,948	12,0	18,4
6	960	4,570	7,88	12,1
7	2,400	2,514	4,33	6,67

(Standard eğrisi örneği, hesaplamada kullanmayınız)

### Numuneler

Her bir numune için, dikey ekseninde B/T (%) veya B/B<sub>0</sub> (%) yerini belirleyiniz ve yatay ekseninde ona karşılık gelen DHT konsantrasyonunu pg/mL olarak okuyunuz.pg/mL'yi pmol/L'e dönüştürmek için sonuçları 3,44 ile çarpınız.

## BEKLENEN DEĞERLER

Her laboratuvar kendi normal değerlerini oluşturmalıdır. Görünüşte sağlıklı yetişkin üzerinde yapılan bir internal çalışmada DHT değerleri ile oluşturulan sonuçlar aşağıda verilmiştir ve sadece referans amaçlıdır.

	Yaş	n	Medyan (pg/mL)	% 2,5 yüzdilik (pg/mL)	%97,5 Yüzdilik (pg/mL)	Sınır (pg/mL)
Erkek	20 - 60	119	274,7	109,2	583,1	33,69 - 756,4
Kadın	20 - 60	122	82,81	33,28	196,5	17,67 - 245,8

(Daha fazla bilgi için APPENDIX-EK'e bakınız)

## KALİTE KONTROL

İyi laboratuvar uygulamaları, alınan sonuçların kalitesini garanti altına almak için kontrol numunelerinin düzenli olarak kullanılmasını gerektirir. Bu numuneler, aynen test numuneleri gibi kullanılmalıdır ve sonuçlarının uygun istatistiksel metodlarla analiz edilmesi önerilmektedir.

Kontrollerden, beklenen sonuçların alınmaması, hatalı manipülasyon, numunenin hazırlanmasındaki hata veya reaktiflerin bozulmasından kaynaklanabilir. Paketteki bozulma veya alınan verilerde değişiklik olduğu durumlarda lütfen yerel distribütörünüzü arayınız veya aşağıdaki e-mail adresini kullanınız: imunochem@beckman.com

## PROSEDÜR

### Reaktiflerin hazırlanması

Kullanmadan önce bütün reaktifleri oda ısısına getiriniz ve yavaşça çevirerek karıştırınız.

### Tracer'ın çözülmesi

Tracer'ı 55 mL distile su ile çözünüz. Çözüldükten sonra 10 dakika bekleyiniz ve kullanmadan önce, köpüklenmeden yavaşça karıştırınız. 2-8 °C'de 14 güne kadar saklayabilirsiniz.

### Kalibratör ve kontrol numunelerinin çözülmesi

Şişelerin içeriği etikette belirtilen miktarda distile su ile sulandırılmalıdır. Çözüldükten sonra 10 dakika bekleyiniz ve kullanmadan önce, köpüklenmeden yavaşça karıştırınız. <-20 °C'de kitin son kullanma tarihine kadar saklayabilirsiniz.

### Numunelerin ekstraksiyonu

*Not: Ekstraksiyonlar temiz, tercihen tek kullanımlık CAM tüplerde ve pipetlerle yapılmalıdır. Kullanmadan önce, Oksidasyon Solüsyonu ve ekstraksiyon reaktiflerinin oda ısısına (18-25 °C) gelmesini sağlayınız.*

*Numuneler ve kontroller ekstraksiyon gerektirir. Kalibratörleri EKSTRAKTE ETMEYİNİZ!*

- Her numune ve kontrol için tüpleri numaralandırınız.
- Numaralandırılmış tüplere 400 µL numune veya kontrollerden ekleyiniz ve 500 µL Oksidasyon solüsyonu ekleyiniz. İyice vorteksleyiniz ve oda ısısında (18-25 °C) 15 dakika inkübe ediniz.
- Ekstraksiyon karışımını hazırlayınız: 98% n-hexane ve 2% etanol.

- Cam pipet kullanarak oksidize numuneye 4,0 mL n-hexane-ethanol karışımı (98% hexane: 2% ethanol) ekleyerek ekstrakte ediniz. Herbir numuneyi hemen 1 dakika vorteksleyiniz.
  - 50 µL DHT Numune tamponu ekleyiniz ve tüplerin kapağını kapattıktan sonra 3-4 defa çevirerek yavaşça karıştırınız.
  - Organik tabakayı, sıvı tabakadan ayırmak için 15 dakika, oda ısısında, 1500 X g'de santrifüjleyiniz.
  - Organik tabakanın üstünden 2,5 mL alarak etiketlenmiş temiz cam tüplere koyunuz ve nitrojen gazı kullanarak veya ısıtmalı speed-vac gereci kullanarak buharlaştırarak kurutunuz.
- Kurutulmuş materyali 250 µL DHT sıfır kalibratörü ile çözünüz. İyice vorteksleyiniz ve oda ısısında (18-25 °C) en az 1 saat bekletiniz.

**NOT:**

- KALİBRATÖRLERİ EKSTRAKTE ETMEYİNİZ
- 12 x 75 mm veya 13 x 100 mm kapaklı cam tüp kullanınız. Güvenlik kapakları yoksa 16 x 150 mm tüpler kullanılabilir. Ekstraksiyondan sonra, organik çözücülerin buharlaşmasını önlemek için 16 x 150 mm tüpleri alüminyum folyo ile kapatınız.
- Lipemik numuneleri kullanmayınız.

**Test prosedürü**

Kalibratörler, Kontrol ve hasta numunelerini duplike olarak çalışınız.

Aşama 1 Eklèmeler	Aşama 2 İnkübasyon	Aşama 3 Sayım
Örnek ve kontrolleri Prosedür bölümünde açıkladığı şekilde ekstrakte ediniz.	Kapatınız ve 2 saat, oda ısısında (18-25 °C), shaker üzerinde (≥180 rpm) inkübe ediniz.	«Total cpm» tüpleri hariç bütün tüplere 3.0 mL deiyonize su ekleyiniz.
Antikor eklenmiş tüplere dikkatlice ekleyiniz:	Sünger rack'taki tüpleri, radyoaktif atık kabına ters çevirerek aynı anda boşaltınız veya aspire ediniz («total cpm» tüpleri hariç).	Sünger rack'taki tüpleri, radyoaktif atık kabına ters çevirerek aynı anda boşaltınız veya aspire ediniz («total cpm» tüpleri hariç).
100 µL kalibratör, ekstrakte kontrol veya numuneler, ve hemen		Tüpleri kağıt havlu üzerine ters çevirerek sertçe vurarak tamamen boşaltınız.
500 µL tracer ekleyiniz.*		Tüpleri kağıt havlu üzerine ters çeviriniz ve boşalmayı hızlandırmak için sertçe vurunuz ve >2 dakika bekleterek tüpleri kurutunuz.
Bütün tüpleri vorteksleyiniz.		Bağlı cpm (B) ve total cpm'yi (T) 1 dakika sayınız.

## PERFORMANS ÖZELLİKLERİ

(Daha fazla bilgi için APPENDIX-EK'e bakınız)

Temsili veriler yalnızca örnek olarak verilmiştir. Her bir laboratuarda elde edilen performans farklılık gösterebilir.

**Duyarlılık**

**Analitik duyarlılık:** 9,14 pg/mL

**Fonksiyonel duyarlılık:** 19,63 pg/mL

**Özgüllük**

Immunoassay'de kullanılan antikor DHT'ye yüksek özgüllüğe sahiptir. Birkaç ilgili moleküle karşı (androstenedione, estradiol, testosterone vb) düşük çapraz reaksiyona rastlanmıştır.

**Kesinlik**

**Deney-içi**

Numuneler, aynı çalışma içinde 25 kez test edildi. Değişkenlik katsayısı % ≤ 7,9 bulundu.

**Testler arası**

Numuneler, 10 farklı çalışmada duplike olarak test edildi. Değişkenlik katsayısı ≤ 7,1 % bulundu.

**Doğruluk**

**Dilüsyon testi**

Numune, sıfır kalibratör ile seri olarak dilüe edildi. Düzeltme oranı %80,5 ile %114 arasında değişti.

**Düzeltilme testi**

Serum numunesine bilinen miktarda DHT eklendi. Düzeltme oranı %88,0 ile %107 arasında değişti.

**Ölçüm sınırları** (analitik duyarlılıktan en yüksek kalibratöre kadar): 9,14 ile yaklaşık 2,500 pg/mL.

## SINIRLAMALAR

- Bu kullanma kılavuzuna uyulmaması, sonuçları belirgin bir şekilde etkileyebilir.
- Tüplerin boşaltıldıktan sonra iyi kurutulmaması, zayıf replikasyon ve hatalı sonuçlara neden olabilir.
- Reaktifler ve numunelerin dondurulma ve çözme işleminin tekrarından kaçınılmalıdır.
- Çok hemolizli, sararmış ve lipemik numuneleri kullanmayınız.
- Bir reaktifte mikrobik kontaminasyon veya aşırı bulanıklık belirtisi varsa şişeyi atın.

\*Total cpm'yi elde etmek için 2 boş tüpe 500 µL tracer ekleyiniz.

# ACTIVE® Dihydrotestosterone RIA

**REF** DSL9600i

## НАБОР ДЛЯ РАДИОИММУНОЛОГИЧЕСКОГО КОЛИЧЕСТВЕННОГО IN VITRO ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДИГИДРОТЕСТОСТЕРОНА (DHT) В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА Для диагностики *in vitro*.

### ПРИНЦИП

Радиоиммунологическое определение дигидротестостерона (5 $\alpha$ -дигидротестостерон; DHT; 17 $\beta$ -гидрокси-5 $\alpha$ -андростан-3-он) относится к конкурентным видам анализа. Процедура анализа соответствует основному принципу радиоиммунного анализа, в котором меченный и немеченый антигены конкурируют за ограниченное количество мест связывания. Концентрация DHT в образце обратно пропорциональна величине меченого 125I DHT, связанного с антителами. Разделение связанного и несвязанного антигенов выполняется путем удаления жидкого содержимого пробирок, Концентрацию DHT определяют методом интерполяции по калибровочной кривой.

Теория и трактовка теста приведены в разделе «APPENDIX».

### ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

#### Общие замечания:

- Для диагностики *in vitro*.
- Флаконы с калибровочными и контрольными пробами следует держать открытыми в течение как можно более короткого промежутка времени с тем, чтобы предотвратить испарение воды.
- Не смешивать реагенты из наборов разных серий.
- Не используйте реагенты после окончания срока годности, указанного на этикетке.
- Анализ калибровочных и исследуемых проб должен проводиться одновременно.
- Анализ рекомендуется проводить в дубликатах.
- Калибраторы и контрольные образцы следует тщательно перемешать, осторожно переворачивая или покачивая флаконы. Не использовать вихревой встряхиватель.

#### Основные правила радиационной безопасности

Получение, использование и транспортировка радиоактивных материалов должны происходить в соответствии с принятыми в данной стране нормами радиационной безопасности и санитарными правилами работы с радиоактивными веществами.

- В лабораториях запрещается принимать пищу, курить, пользоваться косметикой.
- Не пипетировать ртом.
- Используйте перчатки и лабораторный халат во избежание контакта с радиоактивными материалами.
- Любое обращение с радиоактивными веществами осуществляют в подходящем местоположении, вдали от проходов и других оживленных зон.
- Радиоактивные вещества следует хранить с использованием контейнеров в специально отведенных для этого местах.
- Необходимо регистрировать поступление и расход радиоактивных материалов.
- Лабораторное оборудование и посуду следует хранить отдельно, чтобы предотвратить их загрязнение радиоактивными изотопами.
- Любой случай радиоактивного загрязнения или исчезновения радиоактивного материала должен рассматриваться в соответствии с законодательством.
- Утилизация радиоактивных отходов должна осуществляться в соответствии с законодательством.

### Азид натрия

Некоторые компоненты набора содержат азид натрия в качестве консерванта. Вступая в реакцию со свинцом, медью и латунью, азид натрия образует взрывоопасные азиды металлов. Отработанные реагенты следует разбавлять большим количеством водопроводной воды, после чего их можно сливать в канализацию.

### Материал человеческого происхождения

Пробы пациента, а также продукты, полученные из крови, могут обрабатываться в стандартных условиях при минимальном риске с использованием описанной процедуры. Тем не менее, данные продукты, независимо от их происхождения, обработки или предварительной сертификации, следует обрабатывать как потенциально инфекционные в соответствии с универсальными мерами предосторожности и правилами проведения лабораторных и клинических испытаний. Для дезинфекции используйте соответствующее дезинфицирующее средство. Храните и утилизируйте данные материалы и емкости из-под них в соответствии с действующими местными предписаниями и руководствами.

### КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ GHS

Oxidation Solution



H411

Токсично для водных организмов с долгосрочными последствиями.

P273

Не допускать попадания в окружающую среду.

P391

Ликвидация разлива.

Перманганат калия 1 - 5%

Sample Buffer

ОПАСНО



H226

Воспламеняющаяся жидкость и пар.

H314

Вызывает серьезные ожоги кожи и повреждения глаз.

P210

Беречь от вдали от источников тепла, горячих поверхностей и искр. — Не курить.

P280

Надевать защитные перчатки, защитную одежду, средства защиты органов зрения/лица.

P301+P330+P331

ПРИ ПРОГЛАТЫВАНИИ: прополоскать рот, НЕ вызывать рвоту.

P303+P361+P353

ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ (или волосы): промыть кожу водой.

P305+P351+P338

ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: осторожно промывать водой несколько минут. Снять контактные линзы, если они есть и это легко сделать. Продолжить промывание.

P310

Немедленно обратиться в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР или к врачу-специалисту.

Этиловый спирт 10 - 20%  
Каустическая сода 20 - 30%

## НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Помимо стандартного лабораторного оборудования необходимо иметь следующее:

- пробирки 12 x 75 мм или 13 x 100 мм или 16 x 150 мм (стеклянные с крышками),
- штативы для пробирок 12 x 75 мм.
- Деионизированная вода.
- микропипетки (100 мкл, 250 мкл, 400 мкл),
- полуавтоматическая пипетка (500 мкл)
- вихревой смеситель типа vortex
- 5 мл градуированная стеклянная пипетка - **ИСПОЛЬЗОВАТЬ ПРИ ЭКСТРАКЦИИ**,
- органические растворители: н-гексан и этанол (для ВЭЖХ),
- центрифуга с охлаждением (1500x g),
- азот или центрифужный вакуумный испаритель (speed-vac) (для экстракции),
- всриватель ( $\geq 180$  осц/мин)
- штатив из губки или аналогичное устройство для удаления содержимого пробирок
- водоструйный насос
- фильтровальная бумага для просушивания пробирок
- гамма-счетчик для измерения активности <sup>125</sup>I.
- логарифмическая бумага или соответствующее программное обеспечение для компьютера



Паспорт безопасности доступен на сайте  
techdocs.beckmancoulter.com.

## ПОЛУЧЕНИЕ, ОБРАБОТКА, ХРАНЕНИЕ И РАЗВЕДЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

- Рекомендуемые образцы сыворотка или плазма (с ЭДТА).
- Дождитесь полного свертывания образцов крови перед центрифугированием.
- Образцы сыворотки и плазмы можно хранить при 2-8 °C в течение 24 часов. Для более длительного хранения, до 1 года, их необходимо разделить на аликвоты и заморозить при температуре  $<-20$  °C, чтобы избежать повторного замораживания-оттаивания проб. Анализируемые образцы следует размораживать при комнатной температуре.
- Экстрагировать образцы перед исследованием. См. Процедура.
- Если концентрация ДНТ в образце превышает концентрацию максимальной калибровочной пробы, его следует разбавить нулевой калибровочной пробой.
- Было проведено сравнение результатов исследования 19 образцов сыворотки и плазмы (ЭДТА) с использованием набора DSL9600i (диапазон концентраций в сыворотке от 53,75 до 341,5 пг/мл). Получены следующие результаты:

$$[\text{ЭДТА-плазма}] = 0,9592[\text{сыворотка}] + 31,583 R = 0,9783$$

## ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Все реагенты стабильны при 2-8 °C до окончания срока годности набора. Сроки годности, указанные на этикетках флаконов с реагентами, относятся только к их хранению в производственных условиях вплоть до момента комплектирования набора и не распространяются на полученную заказчиком продукцию.

Условия хранения после растворения и разбавления реагентов указаны в соответствующих разделах.

**Пробирки, покрытые антителами к ДНТ: 2 x 50 шт** (готовы к использованию)

Пластиковые пробирки, на внутренней поверхности которых иммобилизованы поликлональные кроличьи иммуноглобулины к ДНТ.

**Метка, 125I-дигидротестостерон: 1 флакон, 55 мл** (лиофилизированный препарат)

На дату изготовления флакон содержит 185 кБк ( $<5$   $\mu\text{Ci}$ ), 125I-ДНТ в буфере с белком (БСА), азидом натрия ( $<0,1\%$ ). Растворить содержимое флакона в 55 мл деионизированной воды. Растворенную метку можно хранить при 2-8 °C в течение 14 дней при условии, что максимальное связывание ( $\%B_0/T$ )  $> 25\%$ .

**Калибровочные пробы: 1 флакон 50 мл (0)** (готов к использованию) + **7 флаконов, (1 - 7)** (лиофилизированные препараты)

Калибровочные пробы содержат ДНТ в диапазоне концентраций от 0 до приблизительно 2 500 пг/мл (0 до приблизительно 8 600 пмоль/л) в буфере с белком (БСА) и азидом натрия ( $<0,1\%$ ). Точные концентрации, указаны на этикетках флаконов. Значения калибровочных проб были получены с помощью сертифицированного справочного материала (Cerilliant). Калибраторы не подвергать экстракции.

**Контрольная сыворотка: 2 флакона (1, 2)** (лиофилизированные)

Флаконы содержат лиофилизированный ДНТ в сыворотке крови человека с азидом натрия ( $<0,1\%$ ). Ожидаемые диапазоны концентраций указаны на дополнительном листке-вкладыше, вложенном в набор. Контрольные сыворотки должны подвергаться экстракции перед проведением анализа (см. Процедура).

**Окислитель: 2 флакона, по 25 мл** (готов к использованию)

Флаконы содержат раствор перманганата калия ( $<5\%$ ) в буфере с азидом натрия ( $<0,1\%$ ).

**Буфер для образцов: 1 флакон 5,5 мл** (готов к использованию)

Флакон содержит буфер с  $<23\%$  этилового спирта и  $<29\%$  гидроксида натрия.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты рассчитывают методом интерполяции по калибровочной кривой, полученной одновременно с анализом неизвестных образцов.

### Калибровочная кривая

Результаты представленные ниже, получены при построении калибровочной кривой в координатах log-lin (сплайн-функция) с соотношением В/Т (%) или В/В<sub>0</sub> (%) по вертикальной оси и концентрацией ДНТ (пг/мл) по горизонтальной оси калибровочного графика. Другие методы обсчета могут давать несколько отличающиеся результаты.

ED50 = 100.7 пг/мл

Общий счет: 57 936 имп./мин.				
Calibrators	ДНТ (пг/мл)	Имп./мин. (n=2)	В/Т (%)	В/В <sub>0</sub> (%)
0	0	37,670	65,0	100
1	24,0	31,164	53,8	82,7
2	48,0	26,403	45,6	70,1
3	96,0	19,356	33,4	51,4
4	192	12,449	21,5	33,0
5	480	6,948	12,0	18,4
6	960	4,570	7,88	12,1
7	2,400	2,514	4,33	6,67

(Пример типичной калибровочной кривой. Не использовать для обсчета результатов.)

### Образцы

Для каждого образца найти на вертикальной оси калибровочного графика значение В/Т (%) или В/В<sub>0</sub> (%), а на горизонтальной оси соответствующую концентрацию ДНТ в пг/мл. Для перевода концентраций из пг/мл в пмоль/л нужно умножить полученный результат на 3.44.

## ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

В каждой лаборатории рекомендуется установить собственные уровни ДНТ, соответствующие нормальным. Результаты ДНТ, полученные при

исследовании здоровых людей представлены в таблице и могут быть использованы как ориентировочные.

	Возраст	n	Медиана (пг/мл)	2,5% Перцентиль (пг/мл)	97,5% Перцентиль (пг/мл)	Диапазон (пг/мл)
Мужчины	20 - 60	119	274,7	109,2	583,1	33,69 - 756,4
Женщины	20 - 60	122	82,81	33,28	196,5	17,67 - 245,8

(более подробная информация приведена в разделе "APPENDIX")

## КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

В соответствии с требованиями Good laboratory practices для контроля качества проводимых исследований следует регулярно использовать контрольные образцы, которые проходят те же стадии анализа, что и анализируемые пробы. Результаты контроля качества рекомендуется обрабатывать с помощью специальных статистических методов.

Отклонение результатов исследования контрольных образцов от заданных значений может свидетельствовать о технических ошибках, неправильной подготовке образца или повреждении реагентов. В случае серьезного повреждения упаковки, или в случае несоответствия полученных результатов аналитическим характеристикам обратитесь, пожалуйста, к вашему дистрибьютору или к нашим специалистам: imunochem@beckman.com или beckman.ru@beckman.com

## ПРОЦЕДУРА

### Подготовка реагентов

Довести все реагенты до комнатной температуры тщательно перемешать, осторожно переворачивая или покачивая флаконы.

### Растворение метки

Растворить метку 55 мл дистиллированной воды. Через 10 минут аккуратно перемешать, избегая образования пены. Хранить при 2-8 °C до 14 дней.

### Растворение калибровочных проб и контрольных сывороток

Растворить лиофилизированные препараты в указанном на этикетке объеме дистиллированной воды. Через 10 минут аккуратно перемешать, избегая образования пены. Хранить при <-20 °C до окончания срока годности набора.

### Экстракция образцов

**Внимание:** Для экстракции необходимо использовать чистые, желательны одноразовые, СТЕКЛЯННЫЕ пробирки и пипетки. Перед использованием довести Окислитель и другие реагенты для экстракции до комнатной температуры (18-25 °C).

Образцы и контрольные сыворотки требуют экстракции. Калибраторы не экстрагируют.

- Пронумеровать по одной пробирке для каждого образца и контроля.
- Внести по 400 мкл образца или контрольной сыворотки в пронумерованные стеклянные пробирки и добавить по 500 мкл Окислителя. Тщательно перемешать (vortex) и инкубировать 15 минут при комнатной температуре (18-25 °C).
- Приготовить смесь для экстракции: 98% н-гексан и 2% этанола
- Используя стеклянную пипетку, в пробирки с окисленными образцами внести по 4.0 мл смеси н-гексан-этанол (98% гексан: 2% этанол). Немедленно перемешать (vortex) каждый образец в течение 1 минуты.
- Внести 50 мкл Буфера для образцов, закрыть пробирки крышками и осторожно перемешать перевернув пробирки 3-4 раза.
- Центрифугировать 15 минут при 1500 X g и при 2-8 °C, чтобы разделить органический и водный слои.
- Перенести 2,5 мл верхнего органического слоя в маркированные чистые стеклянные пробирки и выпарить, используя азот или центрифужный вакуумный испаритель (speed-vac).

Внести в пробирки с сухим остатком по 250 мкл «нулевого» калибратора. Тщательно перемешайте на вихревом смесителе и оставьте при комнатной температуре (18-25 °C), по крайней мере на 1 час.

## ЗАМЕЧАНИЕ:

- НЕ ЭКСТРАГИРОВАТЬ КАЛИБРАТОРЫ
- Используйте стеклянные пробирки 12 x 75 мм или 13 x 100 мм с крышками. Если крышек нет, можно использовать пробирки 16 x 150 мм. После экстракции, пробирки 16 x 150 мм необходимо накрыть алюминиевой фольгой, чтобы предотвратить выпаривание органического растворителя.
- Не рекомендуется использовать липемичные образцы.

## Процедура анализа

Анализ следует проводить в дубликатах.

Стадия 1 Внесение реагентов	Стадия 2 Инкубация	Стадия 3 Измерение результатов
<p>Экстрагировать образцы и контрольные сыворотки как описано в разделе «Процедура».</p> <p>В покрытые антителами пробирки последовательно внести:</p> <p>100 мкл калибровочных проб, контрольных и анализируемых образцов. Затем немедленно 500 мкл метки.*</p> <p>Перемешать.</p>	<p>Закрывать пробирки и инкубировать 2 часа при комнатной температуре (18-25°C) и постоянном встряхивании (≥180 осц./мин.)</p> <p>Удалить содержимое пробирок, (кроме «Т»), одновременно перевернув губчатый штатив над емкостью для радиоактивных отходов.</p>	<p>Внести 3,0 мл деионизированной воды во все пробирки, кроме «Т».</p> <p>Удалить содержимое пробирок, (кроме «Т»), одновременно перевернув губчатый штатив над емкостью для радиоактивных отходов.</p> <p>Резко стряхните пробирки над фильтровальной бумагой для полного удаления жидкости.</p> <p>Осушить на адсорбирующем материале не менее 2 минут. Осторожно вытереть пробирки. Измерить связанную (В) и общую (Т) активность 125I в течение 1 мин.</p>

\*В две дополнительные пробирки внести по 500 мкл метки для оценки общей активности 125I (пробы «Т»).

## ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

(более подробная информация приведена в разделе "APPENDIX")

Репрезентативные данные предоставлены исключительно для пояснений. Показатели, полученные в конкретной лаборатории, могут отличаться.

### Чувствительность

**Аналитическая чувствительность:** 9,14 пг/мл

**Функциональная чувствительность:** 19,63 пг/мл

### Специфичность

Антитела, используемые в данном наборе, обладают высокой специфичностью к DHT. Перекрестная реакция с близкородственными молекулами (андростендион, эстрадиол, тестостерон, итд.) чрезвычайно низкая.

### Воспроизводимость

#### Внутри анализа

Анализ образцов проводили в 25 репликатах в пределах одной серии определений. Коэффициент вариации измеренных уровней DHT в сыворотке крови не превышал 7,9 %.

#### Между анализами

Анализ образцов в дубликатах проводили в 10 различных сериях определений. Коэффициент вариации измеренного уровня фрагмента цитокератина 19 в сыворотке крови не превышал 7,1 %.

## **Точность**

### **Тест на разведение**

Величина «открытия» в серийно разведенных «нулевым» калибратором образцах с высокой концентрацией DHT составила от 80,5 % до 114 %.

### **Тест на открытие стандартной добавки**

В образцы с низкой концентрацией гормона вносили известные количества DHT. Величина «открытия» составила от 88,0 % до 107 %.

**Диапазон определений** (от аналитической чувствительности до значения наивысшей калибровочной пробы): от 9,14 до приблизительно 2500 пг/мл.

## **ОГРАНИЧЕНИЯ**

- Нарушение методики проведения анализа может привести к искажению результатов исследования.

- Результаты определения должны быть интерпретированы в свете общей клинической картины пациента, включая анамнез, данные других тестов и подходящую иную информацию.
  - Избегайте повторного замораживания и размораживания реагентов и образцов.
  - Не используйте сильно гемолизованные, желтушные или липемические образцы.
  - При признаках бактериального загрязнения или повышенной мутности реагента флакон необходимо выбросить.
-

## APPENDIX

### PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Representative data are provided for illustration only. Performance obtained in individual laboratories may vary.

#### Summary and explanation of the test

5 $\alpha$ -Dihydrotestosterone (DHT; 17 $\beta$ -Hydroxy-5 $\alpha$ -androstane-3-one), the most potent naturally-occurring androgen, is produced from testosterone through the action of cholesterone 5 $\alpha$ -reductase. The concentrations of 5 $\alpha$ -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. Most of the residual DHT undergoes intracellular metabolism to 3 $\alpha$ -androstenediol and 3 $\alpha$ -androstenediol glucuronide. Only a small proportion of DHT escapes into the peripheral circulation, where it is present primarily complexed to sex-hormone binding globulin. 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 $\alpha$ -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. Measurement of DHT concentrations can be complicated by antibody cross-reactivity to testosterone. This DHT Radioimmunoassay utilizes a sample oxidation/extraction procedure to remove most of the testosterone, coupled with a relatively specific immunoassay for DHT.

#### Sensitivity

The analytical sensitivity, or minimum detection limit, calculated by the interpolation of the mean minus two standard deviations of 20 replicates of the 0 pg/mL DHT calibrator, is 9.14 pg/mL.

#### Specificity

The cross-reactivity of the DHT antiserum has been measured against the following compounds. The percent cross-reactivity is expressed as the ratio of the DHT concentration to the concentration of the reacting compound at 50% binding of the 0 pg/mL DHT calibrator.

COMPOUND	% CROSS-REACTIVITY
Dihydrotestosterone	100
Androstenedione	1.90
Estradiol	1.41
Testosterone	0.02*
Androstenediol	0.25
Androstenediol Glucuronide	0.19
Androsterone Glucuronide	ND
Dehydroepiandrosterone	ND
Cortisol	ND
11-Deoxycortisol	ND
17 $\alpha$ -OH-Progesterone	ND
Progesterone	ND

\*after extraction, ND - Not detectable (<0.01 %)

#### Precision

##### Intra-assay

The intra-assay precision (after extraction) was determined from the mean of 25 determinations.

Samples	S1	S2	S3
Number of determinations	25	25	25
Mean value, pg/mL	71.47	332.4	843.4
C.V., %	7.89	6.52	4.45

##### Inter-assay

The inter-assay precision (after extraction) was determined from the mean of average duplicates for 10 separate runs.

Samples	S1	S2	S3
Number of determinations	10	10	10
Mean value, pg/mL	54.65	315.7	813.4
C.V., %	5.17	7.08	2.47

#### Accuracy

##### Dilution test

Five human serum samples were diluted with 0 pg/mL DHT calibrator after extraction and assayed.

Sample	Dilution factor	Measured conc. (pg/mL)	Expected conc. (pg/mL)	Ratio (%) Measured/Expected
S1	-	301.2	-	-
	1:2	148.9	150.6	98.87
	1:4	75.46	75.30	100.2
	1:8	42.93	37.65	114.0
S2	-	620.9	-	-
	1:2	268.4	310.5	86.45
	1:4	132.1	155.2	85.12
	1:8	64.20	77.61	82.72
S3	-	409.9	-	-
	1:2	173.2	205.0	84.50
	1:4	86.97	102.5	84.87
	1:8	53.73	51.24	104.9
S4	-	481.9	-	-
	1:2	194.0	240.9	80.50
	1:4	107.8	120.5	89.48
	1:8	49.21	60.23	81.70
S5	-	1,126	-	-
	1:2	561.6	563.0	99.75
	1:4	239.1	281.5	84.94
	1:8	127.0	140.8	90.24
	1:16	64.92	70.38	92.25
	1:32	33.44	35.19	95.03

#### Recovery test

Five serum samples containing different levels of endogenous DHT were spiked with known amounts of DHT after extraction and assayed.

Sample	Endogen. conc. (pg/mL)	Added conc. (pg/mL)	Expected conc. (pg/mL)	Measured conc. (pg/mL)	Ratio (%) Measured/Expected
S1	270.7	119.0	389.8	370.3	95.01
	279.6	409.8	689.4	636.2	92.28
	275.1	806.5	1,082	1,049	97.03
S2	284.8	119.0	403.9	388.8	96.28
	294.2	409.8	704.0	684.1	97.18
	289.4	806.5	1,096	1,153	105.2
S3	371.7	156.3	528.0	501.6	95.00
	390.0	409.8	799.9	854.3	106.8
	383.7	806.5	1,190	1,201	100.9
S4	154.7	80.65	235.3	230.3	97.85
	147.5	192.3	339.8	299.1	88.02
	157.2	409.8	567.0	545.8	96.25
S5	316.8	156.3	473.1	439.1	92.81
	332.4	409.8	742.2	756.2	101.9
	327.0	806.5	1,134	1,158	102.1

#### Expected values

Male Age	n	Median (pg/mL)	2.5 % Percentile (pg/mL)	97.5 % Percentile (pg/mL)	Range (pg/mL)
20 - 30	26	343.0	168.6	691.7	150.7 - 756.0
31 - 40	32	283.2	162.8	596.5	155.0 - 655.0
41 - 50	29	255.6	76.86	440.3	70.62 - 454.4

Male					
Age	n	Median	2.5 % Percentile	97.5 % Percentile	Range
		(pg/mL)	(pg/mL)	(pg/mL)	(pg/mL)
51 - 60	32	228.1	93.45	412.9	33.69 - 515.2
20 - 60	119	274.7	109.2	583.1	33.69 - 756.4

Female					
Age	n	Median	2.5 % Percentile	97.5 % Percentile	Range
		(pg/mL)	(pg/mL)	(pg/mL)	(pg/mL)
20 - 30	30	103.4	46.39	217.0	33.16 - 245.8
31 - 40	31	95.80	46.02	201.1	45.24 - 244.5
41 - 50	32	76.40	37.27	122.3	21.24 - 127.3
51 - 60	29	54.70	18.52	78.55	17.67 - 84.36
20 - 60	122	82.81	33.28	196.5	17.67 - 245.8

### <sup>125</sup>I Characteristics

$$T_{1/2} (^{125}\text{I}) = 1443 \text{ h} = 60.14 \text{ d}$$


<sup>125</sup> I	E (MeV)	%
Y	0.035	
X	0.027	114
	0.032	25


### Symbols Key

**REF** Product Reference / Référence du produit / Produktreferenz / Riferimento prodotto / Número de referencia del producto / Referência do produto / Produktreferens / Κωδικός αναφοράς προϊόντος / 产品参考 / Gaminio nuoroda / Termékszám / Dane referencyjne produktu / Reference k produktu / Referenčné označenie výrobku / 제품 참조 자료 / Ürün Referansı / Ссылка на продукт / Референция за продукт / 產品參考

**IVD** In Vitro Diagnostic / Diagnostic in vitro / In-vitro-Diagnostikum / Diagnostica in vitro / Para diagnóstico in vitro / Diagnóstico in vitro / InVitro-diagnostik / Για διάγνωση in vitro / 体外诊断 / In vitro diagnostika / In vitro diagnosztikai felhasználásra / Diagnostyka in vitro / Diagnostika in vitro / 체외 진단 / In Vitro Diagnostik / Diagnostika in vitro / Ин vitro диагностика / 體外診斷


**CONTENTS** Contents / Contenu / Inhalt / Contenuto / Contenido / Conteúdo / Περιεχόμενο / 组成 / Rinkinio sudėtis / Tartalom / Zawartość / Obsah / Obsah / 내용물 / İçindekiler / Содержание / Съдържание / 目錄


 Manufactured by / Fabriqué par / Hergestellt von / Prodotto da / Fabricado por / Tillverkas av / Κατασκευαστής / 制造商 / Gamintojas / Gyártó: / Producent / Výrobce / Уробца / 제조 / Üretici / Изготовлено / Произведено от / 製造商


 Contains sufficient for <n> tests / Contenu suffisant pour "n" tests / Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen / Contenuto sufficiente per "n" saggi / Contenido suficiente para <n> ensayos / Conteúdo suficiente para "n" ensaios / Rækker till "n" antal tester / Περιεχόμενο επαρκές για "n" εξετάσεις / 含量足够 <n> 次测试 / Turinio pakanka <n> tyrim / <n> teszthez elegendő mennyiséget tartalmaz / Zawartość wystarcza na <n> testów / Lze použít pro <n> testů / Obsah vystačí na <n> testov / <n> 테스트에 대해 충분한 양 포함 <n> sayida test için yeterlidir / Содержит достаточно для количества тестов: <n> / Съдържа достатъчно за <n> теста / 内容物足夠執行 <n> 次测试


**CE** CE Mark / Marquage CE / CE-Kennzeichnung / Marchio CE / Marcado CE / Marcação CE / CE-märkning / Σήμανση CE / CE 标志 / CE ženklas / CE jelzés / Znak CE / Značka CE / Označenie CE / CE 표시 / CE İşareti / Маркировка CE / CE маркировка / CE 標識

**SDS** Safety Data Sheet / Fiche technique santé-sécurité / Sicherheitsdatenblatt / Scheda dati di sicurezza / Hoja de datos de seguridad / Ficha de Dados de Segurança / Säkerhetsdatablad / Φύλλο δεδομένων Ασφάλειας / 安全数据单 / Saugos duomenų lapas / Biztonsági adatlap / Karta Charakterystyki Bezpieczeństwa / Bezpečnostní list / Bezpečnostný list / 안전보건자료 / Güvenlik Bilgi Formu / Паспорт безопасности / Информационен Лист За Безопасност / 安全性資料表

 Consult Instructions for Use / Consultez le mode d'emploi / Siehe Gebrauchsanweisung / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulte las Instrucciones de uso / Instruções de utilização / Konsultera bruksanvisning / Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης / 请参阅使用说明 / Skaitykite naudojimo instrukciją / Olvassa el a használati utasítást / Zapoznać się z instrukcją użycia / Postupujte podle návodu k použití / Prečítajte si návod na použitie / 사용 안내 문의 / Kullanma Talimatına Başvurun / Обратитесь к инструкциям / Вижте Инструкциите за употреба / 請參閱使用說明

 Temperature range(s) / Plage(s) de température / Temperaturbereich(e) / Intervallo/i di temperatura / Intervalo(s) de temperatura / Intervalo(s) de temperatura / Temperaturintervall / Εύρος(-η) θερμοκρασίας / 溫度範圍 / Temperatūros diapazonas (-ai) / Hőmérséklet-tartomány(ok) / Zakres(y) temperatury / Rozsahy teplot / Rozsah(y) teploty / 온도 범위 / Sicaklık aralıkları / Диапазон(-ы) температуры / Температурен(ни) диапазон(и) / 溫度範圍

 Caution / Précaution / Achtung / Attenzione / Precaución / Atenção / Försiktighet / Προσοχή / 注意事项 / Įspėjimas / Figyelem / Uwaga / Urozornění / Urozornenie / 주의 / Dikkat / Внимание / 注意

 Expiration Date / Date D'expiration / Verfallsdatum, Verw. bis: / Data Di Scadenza / Fecha De Caducidad / Data de validade / Utgångsdatum / Ημερομηνία λήξης / 失效日期 / Galiojimo data / Lejárati idő / Data ważności / Datum expirace / Datum expirácie / 만료 날짜 / Son Kulanma Tarihi / Срок годности / Срок на годност / 到期日

**LOT** Lot Number / Numéro de lot / Chargennummer / Numero di lotto / Lote número / Número de lote / Satsnummer / Αριθ. παρτίδας / 批次号 / partijos numeris / Tételszám / Numer serii / Číslo šarže / 로트 번호 / Lot Numarası / Номер партии / Номер на партида / 批號

 Date of Manufacture / Date de Fabrication / Herstellungsdatum / Data di Fabbricazione / Fecha de Fabricación / Data de Fabrico / Produktionsdatum / Ημερομηνία Παραγωγής / 生产日期 / Pagaminimo Data / Gyártás Dátuma / Data Produkcji / Datum Výroby / Datum Výroby / 제조 일자 / Üretim Tarihi / Дата Производства / Дата на Производство / 製造日期





Biohazard / Risque biologique / Biogefährdung / Rischio biologico / Riesgo biológico / Risco biológico / Biologisk fara / Βιολογικός κίνδυνος / 生物危害 / Biologisk fara / Veszélyes biológiai anyag / Zagrożenie biologiczne / Biologické riziko / Biologické riziko / 생물학적 위험 / Biolojik tehlike / Биологическая опасность / Биологична опасност / 生物危害



Radioactive / Radioactif / Radioaktiv / Radioattivo / Radiactivo / Radioactivo / Radioaktivt / Ραδιενεργό / 放射性 / Radioaktyvioji medžiaga / Radioaktiv / Radioaktywny / Radioaktivní / Rádioaktívny / 방사성 / Radyoaktif / Радиоактивный / Радиоактивен / 具放射性

Ag <sup>125</sup>I

Tracer / Traceur / Tracer / Marcato / Trazador / Marcador / Tracer / Ανιχνευτής / 追踪剂 / Atsekamoji medžiaga / Nyomjelző / Znacznik / Radioindikátor / Indikátor (tracer) / 트레이서 / Tracer'lar / метка / Индикатор / 追蹤劑

Ab <sup>125</sup>I

CAL

Calibrator / Calibrateur / Kalibrator / Calibratore / Calibrador / Calibrador / Kalibrator / Βαθμονομητής / 校准品 / Kalibravimo medžiaga / Kalibrátor / Kalibrator / kalibrátor / Kalibrátor / 보정 물질 / Kalibratör / Калибратор / Калибратор / 校正液

CAL 0

CTRL

Control / Contrôle / Kontrolle / Controlla / Control / Controllo / Kontrolle / Μέτρησης / 质控品 / Kontrollinè / Kontroll / Kontrola / Kontrola / Kontrola / 청도관리 / Kontrol / Контроль / Контролна / 质控品

TUBE

Tubes / tubes / Röhrchen / provette / tubos / Tubos de amostra / Provrör / σωληνώρα / 试管 / Mégintuvéliei / Csövek / Probówki / Zkumavky / Skúmavky / 튜브 / Tüpler / пробирки / Bulgarian / 試管

IFU

Instruction for Use / Mode d'emploi / Gebrauchsanweisung / Istruzioni per l'uso / Instrucciones de uso / Instruções de utilização / Bruksanvisning / Οδηγίες χρήσης / 使用说明 / Naudojimo instrukcija / Használati utasítás / Instrukcja użycia / Návod k použití / Návod na použitie / 사용 안내 / Kullanna Talimati / Инструкции / Инструкции за употреба / 使用说明

BUF

Buffer, Tampon, Puffer, Tampone, Tampón, Tampão, Buffert, Ρυθμιστικό διάλυμα, 缓冲液, Buferinis tirpalas, Puffer, Bufor, Pufir, Tlmivý roztok, 완충, Tampon, Буфер, буфер, 緩衝劑

SOLN OX

Oxidation Solution, Solution oxydante, Oxidationslösung, Soluzione di ossidazione, Solución de oxidación, Solução de oxidação, Oxidationslösning, Διάλυμα οξειδωσης, 氧化溶液, Oksidacijos tirpalas, Oxidáló oldat, Roztwór do utleniania, Oxidační činidlo, Oxidačný roztok, 산화 용액, Oksidasyon Çözeltisi, Окисляющий раствор, Разтвор за оксидация, 氧化溶液

DANGER

DANGER / DANGER / GEFAHR / PERICOLO / PELIGRO / PERIGO / FARA / ΚΙΝΔΥΝΟΣ / 危險 / PAVOJUS / VESZÉLY / NIEBEZPIECZEŃSTWO / NEBEZPEČÍ / NEBEZPEČENSTVO / 위험 / ТЕХЛІКЕ / ОПАСНО / ОПАСНОСТ / 危險

Beckman Coulter do Brasil Com. e Imp. de Prod. de Lab. Ltda,  
Calçada Aldebarã, 39, Centro de Apoio 2 - Alphaville,  
CEP 06541-055 - Santana de Parnaíba, SP, Brasil  
Telefone: (11) 4154-8818 - CNPJ: 42.160.812/0001-44



IMMUNOTECH s.r.o., Radiova 1, 102 27 Prague 10, Czech Republic