



3 α -Diol Elisa

KAPDB460



3 α -Diol G Elisa

en

For the direct quantitative determination of 3 α Diol G by enzyme immunoassay in human serum.

KAPDB460

IN VITRO DIAGNOSTIC

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 90

INTENDED USE

For the direct quantitative determination of 3 α Diol G by enzyme immunoassay in human serum.

For *in vitro* diagnostic use only.

PRINCIPLE OF THE TEST

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

CLINICAL APPLICATIONS

5 α -Androstane-3 α , 17 β -diol glucuronide is a C19 steroid and is either abbreviated as 3 α Diol G, 5 α Diol G or simply, α Diol G. It is produced mainly as a metabolite of testosterone and dihydrotestosterone (DHT). It is largely produced in target peripheral tissues such as the skin, especially around hair follicles. The stimulation by large amounts of 3 α Diol G leads to excessive hair formation, notably where hair is not normally present in women.

In recent years the interest in the measurement of this steroid has increased among clinical investigators studying women suffering from idiopathic hirsutism.

Among the steroids known to be precursors for 3 α Diol G are dehydroepiandrosterone (DHEA), dehydroepiandrosterone sulphate (DHEAS), dihydrotestosterone (DHT), androstenedione and testosterone. Only 3 α Diol G has been shown to increase with hirsutism and decrease with treatment. This correlation has also been demonstrated in patients with polycystic ovarian syndrome (PCO). 3 α Diol G determinations have therefore proved to be a useful indicator in a variety of ways including monitoring the progress of treatment of idiopathic hirsutism and women with PCO.

Furthermore, diabetic patients (both men and women) under cyclosporine A therapy have shown increased 3 α Diol G levels, a side effect resulting in the appearance of hair in previously hairless areas.

PROCEDURAL CAUTIONS AND WARNINGS

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

13. To prevent contamination of reagents, use a new disposable pipette tip for dispensing each reagent, sample, calibrator and controls.

14. Do not mix various lot numbers of kit components within a test and do not use any component beyond the expiration date printed on the label.

15. Kit reagents must be regarded as hazardous waste and disposed of according to national regulations.

LIMITATIONS

1. All the reagents within the kit are calibrated for the direct determination of 3 α Diol G in human serum. The kit is not calibrated for the determination of 3 α Diol G in saliva, plasma or other specimens of human or animal origin.
2. Do not use grossly hemolyzed, grossly lipemic, icteric or improperly stored serum.
3. Any samples or control sera containing azide are not compatible with this kit, as they may lead to false results.
4. Only calibrator 0 may be used to dilute any high serum samples. The use of any other reagent may lead to false results.
5. The results obtained with this kit should never be used as the sole basis for a clinical diagnosis. For example, the occurrence of heterophilic antibodies in patients regularly exposed to animals or animal products has the potential of causing interferences in immunological tests. Consequently, the clinical diagnosis should include all aspects of a patient's background including the frequency of exposure to animals/products if false results are suspected.

SAFETY CAUTIONS AND WARNINGS

POTENTIAL BIOHAZARDOUS MATERIAL

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

CHEMICAL HAZARDS

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

SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

Approximately 0.2 ml of serum is required per duplicate determination. Collect 4-5 ml of blood into an appropriately labelled tube and allow it to clot. Centrifuge and carefully remove the serum layer. Store at 4°C for up to 24 hours or at -10°C or lower if the analyses are to be done at a later date. Consider all human specimens as possible biohazardous materials and take appropriate precautions when handling.

SERUM PRETREATMENT

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

REAGENTS AND EQUIPMENT NEEDED BUT NOT PROVIDED

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

REAGENTS PROVIDED

11L Rabbit Anti-3 α Diol G Antibody Coated Microwell Plate-Break Apart Wells - Ready To Use.

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

Storage: Refrigerate at 2-8°C

Stability: 12 months or as indicated on label.

Ag	HRP	CONC	3 α Diol G-Horseradish Peroxidase (HRP) Conjugate Concentrate – X50
----	-----	------	--

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

Volume: 300 μ l/vial

Storage: Refrigerate at 2-8°C

Stability: 12 months or as indicated on label.

Preparation: Dilute 1:50 in assay buffer before use (eg. 40 μ l of HRP in 2 ml of assay buffer). If the whole plate is to be used dilute 240 μ l of HRP in 12ml of assay buffer. Discard any that is left over.

CAL	N	3 α Diol G Calibrators - Ready To Use. N = 0 to 5
-----	---	--

Contents: Six vials containing 3 α Diol G in a protein-based buffer with a non-mercury preservative. Prepared by spiking buffer with a defined quantity of 3 α Diol G.

*Listed below are approximate concentrations, please refer to vial labels for exact concentrations.

Calibrator	Concentration	Volume/Vial
Calibrator 0	0 ng/ml	2.0 ml
Calibrator 1	0.25 ng/ml	0.6 ml
Calibrator 2	1 ng/ml	0.6 ml
Calibrator 3	3 ng/ml	0.6 ml
Calibrator 4	10 ng/ml	0.6 ml
Calibrator 5	50 ng/ml	0.6 ml

Storage: Refrigerate at 2-8°C

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

CONTROL	1	CONTROL	2	Controls - Ready To Use.
---------	---	---------	---	--------------------------

Contents: 2 vials containing 3 α Diol G in a protein-based buffer with a non-mercury preservative. Prepared by spiking buffer with a defined quantity of 3 α Diol G. Refer to vial label for expected value and acceptable range.

Volume: 0.6 ml/vial

Storage: Refrigerate at 2-8 °C

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

WASH	SOLN	CONC	Wash Buffer Concentrate - X10
------	------	------	--------------------------------------

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

Volume: 50 ml/bottle

Storage: Refrigerate at 2-8°C

Stability: 12 months or as indicated on label.

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

ASS	BUF	Assay Buffer - Ready To Use*.
-----	-----	-------------------------------

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

Volume: 15 ml/bottle

Storage: Refrigerate at 2-8°C

Stability: 12 months or as indicated on label.

*Warm to completely dissolve before use.

CHROM	TMB	TMB Substrate - Ready To Use.
-------	-----	-------------------------------

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

Volume: 16 ml/bottle

Storage: Refrigerate at 2-8°C

Stability: 12 months or as indicated on label.

STOP	SOLN	Stopping Solution - Ready To Use.
------	------	-----------------------------------

Contents: One vial containing 1M sulfuric acid.

Volume: 6 ml/vial

Storage: Refrigerate at 2-8°C

Stability: 12 months or as indicated on label.

ASSAY PROCEDURE Specimen Pretreatment:

None.

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

1. Prepare working solutions of the 3 α Diol G-HRP conjugate and wash buffer.
2. Remove the required number of microwell strips. Reseal the bag and return any unused strips to the refrigerator.
3. Pipette 50 μ l of each calibrator, controls and specimen sample into correspondingly labelled wells in duplicate.
4. Pipette 100 μ l of the conjugate working solution into each well (We recommend using a multichannel pipette).
5. Incubate on a plate shaker (approximately 200 rpm) for 30 minutes at room temperature.
6. Wash the wells 3 times with 300 μ l of diluted wash buffer per well and tap the plate firmly against absorbent paper to ensure that it is dry (The use of a washer is recommended).
7. Pipette 150 μ l of TMB substrate into each well at timed intervals.
8. Incubate on a plate shaker for 10-15 minutes at room temperature (or until calibrator 0 attains dark blue colour for desired OD).
9. Pipette 50 μ l of stopping solution into each well at the same timed intervals as in step 7.
10. Read the plate on a microwell plate reader at 450 nm withing 20 minutes after addition of the stopping solution.

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

CALCULATIONS

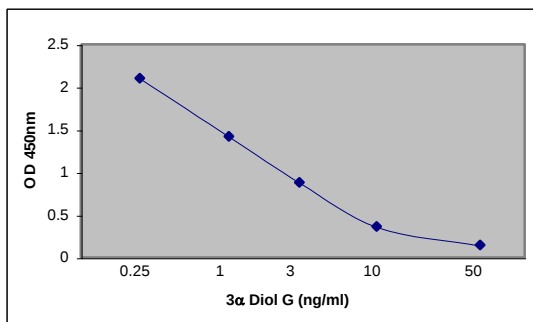
1. Calculate the mean optical density of each calibrator duplicate.
2. Draw a calibration curve on semi-log paper with the mean optical densities on the Y-axis and the calibrator concentrations on the X-axis. If immunoassay software is being used, a 4-parameter curve is recommended.
3. Calculate the mean optical density of each unknown duplicate.
4. Read the values of the unknowns directly off the calibration curve.
5. If a sample reads more than 50 ng/ml then dilute it with calibrator 0 at a dilution of no more than 1:8. The result obtained should be multiplied by the dilution factor.

TYPICAL TABULATED DATA

Calibrator	OD 1	OD 2	Mean OD	Value (ng/ml)
0	2.480	2.474	2.477	0
1	2.102	2.106	2.104	0.25
2	1.428	1.413	1.421	1
3	0.877	0.883	0.880	3
4	0.360	0.368	0.364	10
5	0.147	0.143	0.145	50
Unknown	0.598	0.596	0.597	5.4

TYPICAL CALIBRATION CURVE

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



PERFORMANCE CHARACTERISTICS

SENSITIVITY

The lower detection limit is calculated from the calibration curve by determining the resulting concentration of the mean OD of Calibrator 0 (based on 10 replicate analyses) minus 2 SD. Therefore, the sensitivity of the DIAsource Direct 3α Diol G ELISA kit is **0.1 ng/ml**.

SPECIFICITY (CROSS REACTIVITY)

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

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

The following steroids were tested but cross-reacted at less than 0.01%: Corticosterone, Dehydroepiandrosterone, Dihydrotestosterone, Epiandrosterone, 17β-Estradiol and Estrone.

INTRA-ASSAY PRECISION

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

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

INTER-ASSAY PRECISION

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

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

RECOVERY

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

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

LINEARITY

Three patient serum samples were diluted with calibrator 0. The results (in ng/ml) are tabulated below:

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

EXPECTED NORMAL VALUES

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

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

REFERENCES

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

Revision date : 2015-08-05



3 α -Diol G Elisa

es

Para determinación cuantitativa directa de 3 α Diol G mediante inmunoensayo enzimático en suero humano.

KAPDB460

DIAGNÓSTICO IN VITRO

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 90

USO PREVISTO

Determinación cuantitativa directa de 3 α Diol G mediante inmunoensayo enzimático en suero humano.

Solamente para diagnóstico *in vitro*.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

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

APLICACIONES CLÍNICAS

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

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

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

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

PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS PARA EL PROCEDIMIENTO

1. Los usuarios deben poseer conocimientos avanzados acerca de este protocolo para poder utilizar este kit de forma adecuada. Solo se podrá obtener un rendimiento fiable si se siguen estricta y cuidadosamente las instrucciones suministradas.
2. Los materiales de control o conjunto de sueros deberían incluirse en cada prueba en niveles altos y bajos para comprobar la fiabilidad de los resultados.
3. Cuando se especifique el uso de agua para la dilución o reconstitución, utilice agua desionizada o destilada.
4. Para minimizar la exposición a sustancias potencialmente nocivas se deberán utilizar guantes al manipular los reactivos del kit y las muestras humanas.
5. Todos los reactivos del kit y muestras deberían estar a temperatura ambiente y mezclarse suave pero concienzudamente antes de utilizarse. Evitar la congelación y descongelación repetida de los reactivos y muestras.
6. Se debe establecer una curva calibradora para cada prueba.
7. Se deberían incluir los controles en cada prueba y deberían estar dentro del intervalo de confianza establecido.
8. Si los valores de los ensayos para los controles no reflejan los rangos establecidos podrá deberse a técnicas de procedimiento incorrectas, pipeteo impreciso, lavado incompleto y almacenamiento incorrecto de los reactivos.
9. La presencia de burbujas en los micropocillos podría afectar las densidades ópticas a la hora de leer las microplacas. Elimine cuidadosamente todas las burbujas antes de proceder con la lectura.

10. La solución de sustrato (TMB) es sensible a la luz y debería permanecer incolora siempre y cuando se almacene de forma correcta. Si se volviera de color azul podría deberse a inestabilidad o contaminación. En este caso, la solución no debería ser utilizada.

11. El tampón del ensayo es sensible a la luz y debería almacenarse en su botella oscura original, lejos de la luz directa del sol.

12. No utilice pipetas en las que el líquido pueda entrar en contacto con partes metálicas al dispensar el sustrato y la solución de parada.

13. Para prevenir la contaminación de los reactivos, utilice una punta de pipeta desechable nueva para dispensar cada uno de los reactivos, muestras, patrones o controles.

14. No mezcle componentes de kits con diferente numeración de lote para una prueba y no utilice ningún componente después de la fecha de caducidad impresa en la etiqueta.

15. Los reactivos del kit deben ser tratados como residuos peligrosos y desechados según las normativas locales.

LIMITACIONES

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

PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS DE SEGURIDAD

MATERIAL DE RIESGO BIOLÓGICO POTENCIAL

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

RIESGOS QUÍMICOS

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

OBTENCIÓN DE MUESTRAS Y ALMACENAMIENTO

Se necesita aproximadamente 0,2 ml de suero para cada determinación por duplicado. Recoja 4-5 ml de sangre en un tubo adecuadamente etiquetado y deje que se coagule. Centrifugue la muestra y retire con cuidado la capa de suero. Almacene la muestra a 4 °C y utilícela dentro de las siguientes 24 horas, o a -10 °C o menos en caso de que el análisis se realice en una fecha posterior. Considere todas las muestras humanas como material de riesgo biológico potencial y tome las debidas precauciones al manipularlas.

PRETRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

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

REACTIVOS Y EQUIPAMIENTO NECESARIO PERO NO INCLUIDO

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

REACTIVOS INCLUIDOS



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

Contenido: Una placa de 96 micropocillos (12x8) recubierta de anticuerpos policlonales en una bolsa resellable con desecante.
Almacenamiento: Refrigerar a 2-8 °C
Estabilidad: 12 meses o tal y como se indica en la etiqueta.

Conjugado Concentrado de Peroxidasa de Rábano (HRP) y 3α Diol G - [X50]

Contenido: Conjugado de 3α Diol G y peroxidasa de rábano (HRP) en un tampón de base proteica con un conservante sin mercurio.
Volumen: 300 µl/vial
Almacenamiento: Refrigerar a 2-8 °C
Estabilidad: 12 meses o tal y como se indica en la etiqueta.
Preparación: Diluya en proporción 1:50 en el tampón de ensayo antes de utilizar (por ejemplo, 40 µl de HRP en 2 ml de tampón de ensayo). Si se va a utilizar toda la placa, diluya 240 µl de HRP en 12 ml de tampón de ensayo.
Deseche la cantidad de producto sobrante.

Calibradores 3α Diol G - Listos para Utilizar.

Contenido: Seis viales con 3α Diol G en un tampón de base proteica con un conservante sin mercurio. Preparados por tampón enriquecido con una cantidad definida de 3α Diol G
*A continuación se indican las concentraciones aproximadas. Consulte las etiquetas de los viales para obtener las concentraciones exactas.

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

Almacenamiento: Refrigerar a 2-8 °C
Estabilidad: 12 meses en viales no abiertos o tal y como se indica en la etiqueta. Una vez abiertos, los patrones deberían utilizarse dentro de los siguientes 14 días o separarlas en partes alícuotas y congelarlas. Evite realizar múltiples ciclos de congelado y descongelado.

Controles - Listos para Utilizar.

Contenido: Dos viales con 3α Diol G en un tampón de base proteica con un conservante sin mercurio. Preparados por tampón enriquecido con una cantidad definida de 3α Diol G. Consulte las etiquetas de los viales para averiguar el rango aceptable.
Volumen: 0,6 ml/vial
Almacenamiento: Refrigerar a 2-8 °C
Estabilidad: 12 meses en viales no abiertos o tal y como se indica en la etiqueta. Una vez abiertos, los controles deberían utilizarse dentro de los siguientes 14 días o separarlas en partes alícuotas y congelarlas. Evite realizar múltiples ciclos de congelado y descongelado.

Concentrado de Tampón de Lavado - [X10]

Contenido: Una botella de tampón con un detergente no iónico y un conservante sin mercurio.
Volumen: 50 ml/botella
Almacenamiento: Refrigerar a 2-8 °C
Estabilidad: 12 meses o tal y como se indica en la etiqueta.
Preparación: Diluya en proporción 1:10 en agua destilada o desionizada antes de utilizar. Si se va a utilizar toda la placa, diluya 50 ml de concentrado de tampón de lavado en 450 ml de agua.

ASS	BUF
-----	-----

Tampón de Ensayo - Listo para Utilizar*.

Contenido: Una botella de tampón de base proteica con un conservante sin mercurio.
Volumen: 15 ml/botella
Almacenamiento: Refrigerar a 2-8 °C
Estabilidad: 12 meses o tal y como se indica en la etiqueta.
*Calentar para disolverlo por completo antes de utilizar.

CHROM	TMB
-------	-----

Sustrato TMB - Listo para Utilizar.

Contenido: Una botella de tetrametilbencidina y peróxido de hidrógeno en un tampón sin DMF o DMSO.
Volumen: 16 ml/botella
Almacenamiento: Refrigerar a 2-8 °C
Estabilidad: 12 meses o tal y como se indica en la etiqueta.

STOP	SOLN
------	------

Solución de Parada - Lista para Utilizar.

Contenido: Un vial con ácido sulfúrico 1M.
Volumen: 6 ml/vial
Almacenamiento: Refrigerar a 2-8 °C
Estabilidad: 12 meses o tal y como se indica en la etiqueta.

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

Pretratamiento de las Muestras:

Ninguno.

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

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

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

CÁLCULOS

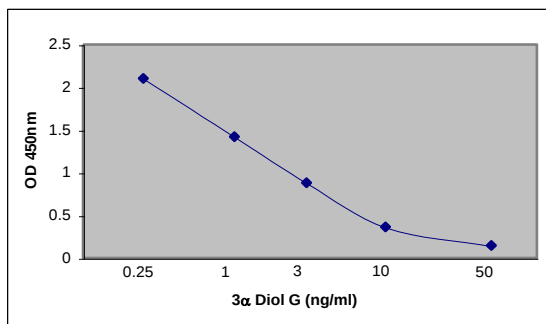
1. Calcule la densidad óptica media de cada uno de los duplicados del calibrador.
2. Dibuje la curva del calibrador en papel semilogarítmico con las densidades ópticas medias en el eje Y y las concentraciones del calibrador en el eje X. En caso de utilizar programa informático de inmunoensayo, se recomienda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

TABLA DE DATOS TÍPICA

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

CURVA DE CALIBRADOR TÍPICA

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



CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

SENSIBILIDAD

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

ESPECIFICIDAD (REACTIVIDAD CRUZADA)

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

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

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

PRECISIÓN INTRAENSAYO

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

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

PRECISIÓN INTERENSAYO

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

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

RECUPERACIÓN

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

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

LINEALIDAD

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

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

VALORES NORMALES ESPERADOS

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

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

REFERENCIAS

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

Revision date : 2015-08-05

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

	Símbolos utilizados
	Consultar las instrucciones de uso
	Limitación de temperatura
	Fecha de caducidad
LOT	Código de lote
REF	Número de catálogo
CONTROL	Control
I V D	Producto sanitario para diagnóstico in vitro
	Fabricante
	Contenido suficiente para <n> ensayos
WASH SOLN CONC	Solución de lavado concentrada
CAL 0	Calibrador cero
CAL N	Calibrador #
CONTROL N	Control #
Ag 125I	Trazador
Ab 125I	Trazador
Ag 125I CONC	Trazador concentrada
Ab 125I CONC	Trazador concentrada
	Tubos
INC BUF	Tampón de incubación
ACETONITRILE	Acetonitrilo
SERUM	Suero
DIL SPE	Diluyente de Muestra
DIL BUF	Tampón de dilución
ANTISERUM	Antisuero
IMMUNOADSORBENT	Inmunoadsorbente
DIL CAL	Diluyente de calibrador
REC SOLN	Solución de Reconstitución
PEG	Glicol Polietileno
EXTR SOLN	Solución de extracción
ELU SOLN	Solución de elución
GEL	Cartuchos Bond Elut Silica
PRE SOLN	Solución de Pre-tratamiento
NEUTR SOLN	Solución de Neutralización
TRACEUR BUF	Tampón de trazador
	Placa de microvaloración
Ab HRP	HRP Conjugado
Ag HRP	HRP Conjugado
Ab HRP CONC	HRP Conjugado concentrada
Ag HRP CONC	HRP Conjugado concentrada
CONJ BUF	Tampón de Conjugado
CHROM TMB CONC	Cromógena TMB concentrada
CHROM TMB	Solución Cromógena TMB
SUB BUF	Tampón de sustrato
STOP SOLN	Solución de Parada
INC SER	Suero de Incubación
BUF	Tampón
Ab AP	AP Conjugado
SUB PNPP	Sustrato PNPP
BIOT CONJ CONC	Concentrado de conjugado de biotina
PREC AGENT	Agente de precipitación
AVID HRP CONC	Concentrado avidina-HRP
ASS BUF	Tampón de ensayo
Ab BIOT	Conjugado de biotina
Ab	Anticuerpo específico
SAV HRP CONC	Estreptavidina-HRP Concentrado
NSB	Unión no específica
2nd Ab	Segundo anticuerpo
ACID BUF	Tampón de Acidificación
DIST	Distribuidor
TRAY	Bandejas de incubación
PMSF	Solución de PMSF
	Proteger de la luz
STRIP	Test Dot
SUB	Sustrato
EXTR SOLN CONC	Concentrado de tampón de extracción
CART	Cartucho
SAV HRP	Estreptavidina HRP
PIPETTE	Pipeta
WASH SOLN	Tampón de lavado