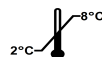


Instructions for use

Androstenediol-Glucoronide ELISA

Please use only the valid version of the Instructions for use provided with the kit

REF**AA E-1500****IVD**

5 α -ANDROSTANE-3 α , 17 β -DIOL GLUCURONIDE (3 α DIOL G) ELISA

English

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

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 or thimerosal are not compatible with this kit, as they may lead to false results.
4. Only Standard A may be used to dilute any high serum samples. The use of any other reagent may lead to false results.
5. The results obtained with this kit should never be used as the sole basis for a clinical diagnosis. For example, the occurrence of heterophilic antibodies in patients regularly exposed to animals or animal products has the potential of causing interferences in immunological tests. Consequently, the clinical diagnosis should include all aspects of a patient's background including the frequency of exposure to animals/products if false results are suspected.

SAFETY CAUTIONS AND WARNINGS POTENTIAL BIOHAZARDOUS MATERIAL

Human serum that may be used in the preparation of the standards and controls has been tested and found to be nonreactive 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. No test method however, 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.

SPECIMEN 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. Microplate reader with a filter set at 450nm and an upper OD limit of 3.0 or greater* (see assay procedure step 10).

REAGENTS PROVIDED

- 1. AA E-0030** **WASH-CONC 10x** **Wash Buffer Concentrate** – requires preparation **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.
- 2. AA E-0055** **SUBSTRATE** **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.

3. AA E-0080 **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.

Hazards identification:



H290 May be corrosive to metals.
H314 Causes severe skin burns and eye damage.

4. Standards and Controls- Ready To Use.

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

Cat. no.	Symbol	Standard	Concentration	Volume/Vial
AA E-1501	STANDARD A	Standard A	0 ng/ml	2.0 ml
AA E-1502	STANDARD B	Standard B	0.25 ng/ml	0.6 ml
AA E-1503	STANDARD C	Standard C	1 ng/ml	0.6 ml
AA E-1504	STANDARD D	Standard D	3 ng/ml	0.6 ml
AA E-1505	STANDARD E	Standard E	10 ng/ml	0.6 ml
AA E-1506	STANDARD F	Standard F	50 ng/ml	0.6 ml
AA E-1551	CONTROL 1	Control 1	Refer to vial labels for expected value and acceptable range!	0.6 ml
AA E-1552	CONTROL 2	Control 2		0.6 ml

Contents: 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.
Storage: Refrigerate at 2 - 8 °C
Stability: 12 months in unopened vials or as indicated on label. Once opened, the standards should be used within 14 days or aliquoted and stored frozen. Avoid multiple freezing and thawing cycles.

5. AA E-1513 **ASSAY-BUFF** **Assay Buffer** - Ready To Use.  Warm to completely dissolve before use.

Contents: One vial 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.

6. AA E-1531 **96** **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.


7. AA E-1540 **CONJUGATE-CONC 50x** **3 α Diol G-Horseradish Peroxidase (HRP) Conjugate Concentrate** - requires preparation **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 12 ml of assay buffer. Discard any that is left over.

ASSAY PROCEDURE

Specimen Pretreatment: **None.**

All reagents must reach room temperature before use. Standards, 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 **3a Diol G-HRP conjugate** and **wash buffer**.
 2. Remove the required number of well strips. Reseal the bag and return any unused strips to the refrigerator.
 3. **Pipette 50 µl** of each **standard, control and specimen sample** into correspondingly labelled wells in duplicate.
 4. Pipette **100 µl** 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 µl 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 µl** of **TMB substrate** into each well at timed intervals.
 8. Incubate the plate on a plate shaker for **10-15 minutes** at **room temperature**.
(or until Standard A attains dark blue colour for desired OD).
 9. Pipette **50 µl** of **stopping solution** into each well at the same timed intervals as in step 7.
 10. Read the plate on a microwell plate reader at **450 nm** within 20 minutes after addition of the stopping solution.
-  If the OD exceeds the upper limit of detection or if a 450nm filter is unavailable, a 405 or 415nm filter may be substituted. The optical densities will be lower, however, this will not affect the results of patient/control samples.

CALCULATIONS

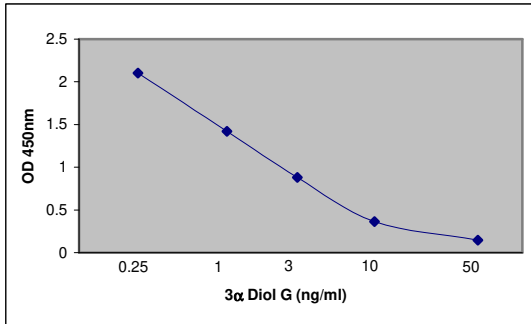
1. Calculate the mean optical density of each standard duplicate.
2. Draw a standard curve on semi-log paper with the mean optical densities on the Y-axis and the standard concentrations on the X-axis. If immunoassay software is being used, a 4-parameter or 5-parameter curve is recommended.
3. Calculate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

TYPICAL TABULATED DATA:

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

TYPICAL STANDARD CURVE

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



PERFORMANCE CHARACTERISTICS

SENSITIVITY

The lower detection limit is calculated from the standard curve by determining the resulting concentration of the mean OD of Standard A (based on 10 replicate analyses) minus 2 SD. Therefore, the sensitivity of the *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 standard 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 3a 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 Standard A. The results (in ng/ml) are tabulated below:

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

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. Jacobi GH, Wilson JD. Formation of 5 α -Androstane-3 α , 17 β -Diol by Normal and Hypertrophic Human Prostate. *J Clin Endocrinol Metab.* 1977; 44(1):107–15.
2. Deslypere JP, 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.* 1982; 54(2):386–91.
3. Moghissi E, et al. Origin of Plasma Androstanediol Glucuronide in Men. *J Clin Endocrinol Metab.* 1984; 59(3):417–21.
4. Scanlon MJ, et al. Serum Androstanediol Glucuronide Concentrations in Normal and Hirsute Women and Patients with Thyroid Dysfunction. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1988; 29(5):529–38.
5. Reiner BJ, et al. Serum 3 α -Androstanediol Glucuronide Measurements in Sexually Mature Women with Congenital Adrenal Hyperplasia During Therapy. *J Clin Endocrinol Metab.* 1989; 69(1):105–9.
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.* 1990; 35(1):133–7.
7. Pang S, et al. 3 α -Androstanediol Glucuronide in Virilizing Congenital Adrenal Hyperplasia: A Useful Serum Metabolic Marker of Integrated Adrenal Androgen Secretion. *J Clin Endocrinol Metab.* 1991; 73(1):166–74.
8. Riddick L, et al. 3 α -Androstanediol Glucuronide in Premature and Normal Pubarche. *J Clin Endocrinol Metab.* 1991; 72(1): 46–50.
9. Check JH, et al. Falsely Elevated Steroidal Assay Levels Related to Heterophile Antibodies Against Various Animal Species. *Gynecol Obstet Invest.* 1995; 40(2):139–40.

Please use only the valid version of the instructions for use provided with the kit

Symbols:

	Storage temperature		Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Expiry date	LOT	Batch code	IVD	For in-vitro diagnostic use only!
	Consult instructions for use	CONT	Content	CE	CE labelled
	Caution	REF	Catalogue number		

VERWENDUNGSZWECK

Für die direkte quantitative Bestimmung von 3 α -Diol-G in Humanserum durch Enzymimmunoassay.
Nur zu *in-vitro*-Diagnosezwecken.

Deutsch

TESTPRINZIP

Das Prinzip des folgenden Enzymimmunoassays folgt dem typischen kompetitiven Bindungsszenario. Konkurrenz um eine begrenzte Anzahl von Antikörperbindungsstellen auf der Mikrotiterplatte entsteht zwischen einem unmarkierten Antigen (in Standards, Kontrollen und Patientenproben vorhanden) und einem enzymmarkierten Antigen (Konjugat). Die Wasch- und Abgießschritte entfernen ungebundenes Material. Nach dem Waschschrift wird das Enzymsubstrat zugegeben. Die enzymatische Reaktion wird durch Zugabe der Stopplösung beendet. Die Extinktion wird mit einem Mikrotiterplattenlesegerät gemessen. Die Intensität der gebildeten Farbe ist umgekehrt proportional zur Konzentration von 3 α -Diol-G in der Probe. Eine Reihe von Standards wird verwendet, um eine Standardkurve zu erstellen, von der die Menge an 3 α -Diol-G in Patientenproben und Kontrollen direkt abgelesen werden kann.

KLINISCHE ANWENDUNGEN

5 α -Androstan-3 α ,17 β -diol-Glucuronid ist ein C₁₉-Steroid und wird als 3 α -Diol-G, 5 α -DiolG oder einfach α -Diol-G abgekürzt. Es wird hauptsächlich als Metabolit von Testosteron und Dihydrotestosteron (DHT) gebildet. Es wird vor allem in peripheren Zielgeweben, wie der Haut, insbesondere um die Haarfollikel herum, erzeugt. Stimulation durch große Mengen von 3 α -Diol-G führt zu übermäßiger Haarbildung, vor allem, wo Haar bei Frauen in der Regel nicht vorhanden ist.

In den letzten Jahren ist das Interesse an der Messung dieses Steroids bei klinischen Forschern, die Frauen mit idiopathischem Hirsutismus untersuchen, gestiegen.

Zu den bekannten steroidal Vorstufen für 3 α -Diol-G gehören Dehydroepiandrosteron (DHEA), Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEAS), Dihydrotestosteron (DHT), Androstendion und Testosteron. Nur für 3 α -Diol-G wurde Anstieg bei Hirsutismus und Sinken unter Behandlung nachgewiesen. Diese Korrelation wurde auch bei Patientinnen mit polyzystischen Ovarien (PCO) nachgewiesen. 3 α -Diol-G-Bestimmungen haben sich daher als nützlicher Indikator für viele Zwecke, einschließlich Überwachung des Fortschritts der Behandlung bei idiopathischem Hirsutismus und Frauen mit PCO erwiesen.

Weiterhin finden sich bei Diabetikern (Männern und Frauen) unter Cyclosporin A-Therapie erhöhte 3 α -Diol-G-Spiegel, eine Nebenwirkung, die zu Haarbildung in vorher haarlosen Bereichen führt.

VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

1. Anwender sollten für den erfolgreichen Einsatz dieses Kits das Protokoll gründlich verstanden haben. Zuverlässige Leistung wird nur durch strenge und sorgfältige Einhaltung der Anleitung erreicht.
2. Kontrollmaterialien oder Serumpools sollten mit hoher und niedriger Konzentration in jeden Lauf zur Beurteilung der Zuverlässigkeit der Ergebnisse einbezogen werden.
3. Wenn Wasser zur Verdünnung oder Rekonstitution zu verwenden ist, ist demineralisiertes oder destilliertes Wasser einzusetzen.
4. Um Kontakt mit potenziell schädlichen Substanzen zu reduzieren, sollten bei der Handhabung der Testreagenzien und Humanproben Handschuhe getragen werden.
5. Alle Reagenzien und Proben sollten vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig, aber gründlich durchmischt werden. Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Reagenzien und Proben.
6. Für jeden Lauf muss eine Standardkurve erstellt werden.
7. Die Kontrollen sollten in jeden Lauf eingeschlossen werden und innerhalb etablierter Vertrauensgrenzen liegen.
8. Unsachgemäße Verfahrenstechniken, unpräzises Pipettieren, unvollständiges Waschen und unsachgemäße Lagerung der Reagenzien können in Frage kommen, wenn die Messwerte für die Kontrollen nicht in den etablierten Bereichen liegen.
9. Beim Lesen der Mikrotiterplatte beeinflussen Blasen in den Wells die Extinktionswerte (ODs). Entfernen Sie vor dem Messschritt jegliche Blasen sorgfältig.
10. Die Substratlösung (TMB) ist lichtempfindlich und sollte bei richtiger Lagerung farblos bleiben. Instabilität und Verunreinigung können an der Entstehung einer blauen Farbe erkannt werden, in welchem Fall die Lösung nicht verwendet werden sollte.
11. Der Assay-Puffer ist lichtempfindlich und sollte in der ursprünglichen dunklen Flasche vor direkter Sonneneinstrahlung geschützt gelagert werden.
12. Beim Dosieren von Substrat und Stopplösung verwenden Sie keine Pipetten, in denen diese Flüssigkeiten in Kontakt mit Metallteilen kommen.
13. Um Kontamination der Reagenzien zu vermeiden, verwenden Sie zur Entnahme aller Reagenzien, Proben, Standards und Kontrollen jeweils eine neue Einweg-Pipettenspitze.
14. Verschiedene Chargen von Kit-Komponenten sind innerhalb eines Tests nicht zu mischen, und keine Komponente darf nach dem Verfallsdatum auf dem Etikett verwendet werden.
15. Kit-Reagenzien müssen gemäß nationalen Vorschriften als gefährlicher Abfall entsorgt werden.

EINSCHRÄNKUNGEN

1. Alle Reagenzien in dem Kit sind für die direkte Bestimmung von 3 α -Diol-G in menschlichem Serum geeicht. Das Kit ist nicht für die Bestimmung von 3 α -Diol-G in Speichel, Plasma oder anderen Proben menschlichen oder tierischen Ursprungs geeicht.
2. Verwenden Sie keine stark hämolysierten, lipämischen, ikterischen oder unsachgemäß gelagerten Seren.
3. Thimerosal enthaltende Proben oder Kontrollseren sind mit diesem Kit nicht kompatibel, da sie zu falschen Ergebnissen führen können.
4. Nur Standard A darf verwendet werden, um Proben mit hoher Serumkonzentration zu verdünnen. Verwendung anderer Reagenzien kann zu falschen Ergebnissen führen.
5. Die mit diesem Kit erhaltenen Ergebnisse sollten niemals als alleinige Grundlage für die klinische Diagnostik verwendet werden. Zum Beispiel hat das Auftreten heterophiler Antikörper bei Patienten, die regelmäßig Kontakt mit Tieren oder Tierprodukten haben, ein Störpotential für immunologische Tests. Daher sollte die klinische Diagnose alle Aspekte des Hintergrunds eines Patienten einschließlich der Häufigkeit seiner Exposition gegenüber Tieren/Tierprodukten berücksichtigen, wenn falsche Ergebnisse vermutet werden.

VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE POTENZIELL INFEKTIÖSES MATERIAL

Humanserum, das zur Herstellung der Standards und Kontrollen verwendet werden kann, wurde auf das Hepatitis B-Oberflächen-Antigen sowie auf Antikörper gegen HCV und HIV getestet und für nichtreaktiv befunden. Jedoch kann keine Testmethode mit absoluter Sicherheit Freiheit von HIV, HCV und Hepatitis-B-Virus oder anderen infektiösen Erregern garantieren. Die Reagenzien sollten als potentielle Biogefährdungen betrachtet und mit den gleichen Vorsichtsmaßnahmen wie jede Blutprobe gehandhabt werden.

CHEMISCHE GEFAHREN

Kontakt mit Reagenzien, die TMB, Wasserstoffperoxid oder Schwefelsäure enthalten, vermeiden. Bei Kontakt mit einem dieser Reagenzien: mit viel Wasser abwaschen. TMB steht im Verdacht, krebserregend zu sein.

PROBENNAHME UND -LAGERUNG

Etwa 0,2 ml Serum ist pro Doppelbestimmung erforderlich. Nehmen Sie 4–5 ml Blut in ein entsprechend gekennzeichnetes Röhrchen auf und lassen es gerinnen. Zentrifugieren Sie und entfernen vorsichtig die Serumschicht. Lagerung bei 4 °C bis zu 24 Stunden oder bei -10 °C oder kälter, wenn die Analysen zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt werden sollen. Betrachten Sie alle Humanproben als potentielle Biogefährdungen und ergreifen geeignete Schutzmaßnahmen beim Umgang.

PROBENVORBEHANDLUNG

Dieses Assay ist ein Direktsystem; keine Probenvorbehandlung ist notwendig.

BENÖTIGTE, ABER NICHT MITGELIEFERTE REAGENZIEN UND INSTRUMENTE

- Präzisionspipetten für 50, 100, 150 und 300 μ l
- Einweg-Pipettenspitzen
- Destilliertes oder demineralisiertes Wasser
- Plattenschüttler
- Mikrotiterplattenlesegerät mit einem 450-nm-Filtersatz und einer oberen OD-Messgrenze von 3.0 oder höher * (siehe Messverfahren – Schritt 10).

MITGELIEFERTE REAGENZIEN

1. AA E-0030

WASH-CONC 10x

Waschpufferkonzentrat – benötigt eine Vorbereitung **X10**

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

Volumen: 50 ml/Flasche

Lagerung: Gekühlt bei 2 - 8 °C

Stabilität: 12 Monate oder gemäß Angabe auf dem Etikett.

Vorbereitung: Vor der Verwendung 1:10 in destilliertem oder demineralisiertem Wasser verdünnen. Wenn die gesamte Platte verwendet werden soll, 50 ml Waschpufferkonzentrat mit 450 ml Wasser verdünnen.

2. AA E-0055

SUBSTRATE

TMB Substrat – Gebrauchsfertig.

Inhalt: Eine Flasche Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid in einem DMF- und DMSO-freien Puffer.

Volumen: 16 ml/Flasche

Lagerung: Gekühlt bei 2 - 8 °C

Stabilität: 12 Monate oder gemäß Angabe auf dem Etikett.

3. AA E-0080 STOP-SOLN **Stopplösung** – Gebrauchsfertig.

Inhalt: Ein Fläschchen 1M Schwefelsäure.
 Volumen: 6 ml/Fläschchen
 Lagerung: Gekühlt bei 2-8 °C
 Stabilität: 12 Monate oder gemäß Angabe auf dem Etikett.
 Mögliche Gefahren:



H290 Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.
 H314 Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.

4. Standards und Kontrollen – Gebrauchsfertig.

Nachfolgend sind ungefähre Konzentrationen angegeben; die genauen Konzentrationen finden sich auf den Etiketten der Fläschchen:

Kat.-Nr.	Zeichen	Standard	Konzentration	Volumen/Fläschchen
AA E-1501	STANDARD A	Standard A	0 ng/ml	2,0 ml
AA E-1502	STANDARD B	Standard B	0,25 ng/ml	0,6 ml
AA E-1503	STANDARD C	Standard C	1 ng/ml	0,6 ml
AA E-1504	STANDARD D	Standard D	3 ng/ml	0,6 ml
AA E-1505	STANDARD E	Standard E	10 ng/ml	0,6 ml
AA E-1506	STANDARD F	Standard F	50 ng/ml	0,6 ml
AA E-1551	CONTROL 1	Kontrolle 1	Siehe Fläschchenetiketten für Erwartungswert und akzeptablen Bereich!	0,6 ml
AA E-1552	CONTROL 2	Kontrolle 2		0,6 ml

Inhalt: 3 α -Diol-G in proteinhaltigem Puffer mit quecksilberfreiem Konservierungsmittel. Hergestellt durch Dotieren von Puffer mit einer definierten Menge 3 α -Diol-G.

Lagerung: Gekühlt bei 2 - 8 °C

Stabilität: 12 Monate im ungeöffneten Fläschchen oder wie auf dem Etikett angegeben. Einmal geöffnet, sollten die Standards innerhalb von 14 Tagen verwendet oder aliquotiert und eingefroren gelagert werden. Mehrfache Einfrier- und Auftauzyklen sind zu vermeiden.

5. AA E-1513 ASSAY-BUFF **Assay-Puffer** – Gebrauchsfertig.

Vor der Verwendung durch Anwärmen vollständig auflösen.

Inhalt: Ein Fläschchen mit proteinhaltigem Puffer mit quecksilberfreiem Konservierungsmittel.
 Volumen: 15 ml/Flasche
 Lagerung: Gekühlt bei 2-8 °C
 Stabilität: 12 Monate oder gemäß Angabe auf dem Etikett.

6. AA E-1531 - 96 **Mikrotiterplatte mit Anti-3 α -Diol-G-Kaninchenantikörper beschichtet - herausbrechbare Wells** - gebrauchsfertig.

Inhalt: Eine 96-Loch-Mikrotiterplatte (12x8), mit polyklonalem Antikörper beschichtet, in einem wiederverschließbaren Beutel mit Trockenmittel.
 Lagerung: Gekühlt bei 2-8 °C
 Stabilität: 12 Monate oder gemäß Angabe auf dem Etikett.


7. AA E-1540 CONJUGATE-CONC 50x **3 α -Diol-G-Meerrettichperoxidase(HRP)-Konjugat-Konzentrat - benötigt eine Vorbereitung X50**

Inhalt: 3 α -Diol-G-HRP-Konjugat in proteinhaltigem Puffer mit quecksilberfreiem Konservierungsmittel.
 Volumen: 300 μ l/Fläschchen
 Lagerung: Gekühlt bei 2-8 °C
 Stabilität: 12 Monate oder gemäß Angabe auf dem Etikett.
 Vorbereitung: Vor der Verwendung 1:50 mit Assay-Puffer verdünnen (z. B. 40 μ l HRP mit 2 ml Assay-Puffer). Wenn die ganze Platte verwendet werden soll, 240 μ l HRP mit 12 ml Assay-Puffer verdünnen. Was übrigbleibt, ist zu entsorgen.

TESTVERFAHREN

Probenvorbehandlung: **Keine.**

Alle Reagenzien müssen vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht werden. Standards, Kontrollen und Proben sollten jeweils doppelt getestet werden. Sobald das Verfahren begonnen wurde, sollten alle Arbeitsschritte ohne Unterbrechung durchgeführt werden.

1. Stellen Sie **Arbeitslösungen** von **3 α -Diol-G-HRP-Konjugat** und **Waschpuffer** her.
 2. Entnehmen Sie die benötigte Anzahl von Mikrotiterstreifen. Verschließen Sie den Beutel und legen alle nicht verwendeten Streifen wieder zurück in den Kühlschrank.
 3. **Pipettieren Sie 50 μ l** jeder **Standard, Kontrolle und Probe** jeweils zweifach in entsprechend markierte Wells.
 4. Pipettieren Sie jeweils **100 μ l** der **Konjugat-Arbeitslösung** in jeden Well.
(Wir empfehlen Verwendung einer Mehrkanalpipette.)
 5. **30 Minuten** bei **Raumtemperatur** auf einem Plattenschüttler (\approx 200 UPM) **inkubieren**.
 6. Waschen Sie die Wells **3x** mit **300 μ l verdünnten Waschpuffers** pro Well und schlagen die Platte fest auf saugfähigem Papier aus, um sicherzustellen, dass sie trocken ist (Verwendung eines Waschautomaten wird empfohlen).
 7. Pipettieren Sie jeweils **150 μ l TMB-Substrat** in definierten Zeitintervallen in die Wells.
 8. **10–15 Minuten** bei **Raumtemperatur** auf einem Plattenschüttler inkubieren.
(oder bis Standard A dunkelblaue Farbe für gewünschte OD erreicht).
 9. Zu den gleichen Zeitintervallen wie in Schritt 7 je **50 μ l Stopplösung** in jeden Well pipettieren.
 10. Messen der Platte auf einem Mikrotiterplattenlesegerät bei **450 nm** innerhalb von 20 Minuten nach der Zugabe der Stopplösung.
-  Wenn die OD die obere Messgrenze überschreitet oder kein 450-nm-Filter verfügbar ist, kann ersatzweise ein 405- oder 415-nm-Filter eingesetzt werden. Die optischen Dichten sind damit niedriger, jedoch hat dies keine Auswirkungen auf die Ergebnisse der Patienten-/Kontrollproben.

BERECHNUNGEN

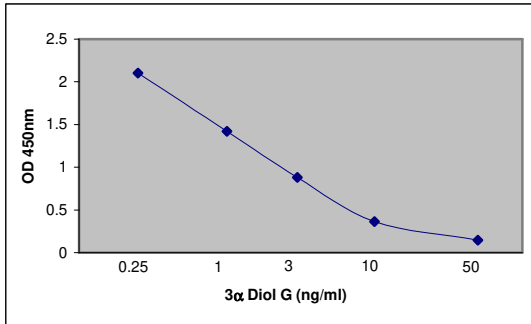
1. Berechnen Sie die mittlere optische Dichte jedes Standard-Duplikats.
2. Zeichnen Sie auf halblogarithmischem Papier eine Standardkurve mit mittlerer optischer Dichten als Y-Achse und Standardkonzentration als X-Achse. Wenn Immunoassay-Software verwendet wird, wird eine 4- oder 5-Parameter-Kurve empfohlen.
3. Berechnen Sie die mittlere optische Dichte jedes unbekanntes Duplikats.
4. Lesen Sie die unbekanntes Werte direkt von der Standardkurve ab.
5. Wenn eine Probe mit mehr als 50 ng/ml gemessen wird, verdünnen Sie sie mit Standard A auf eine Verdünnung von nicht mehr als 1:8. Das erhaltene Ergebnis ist mit dem Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.

TYPISCHE TABELLARISCHE DATEN

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

TYPISCHE STANDARDKURVE

Beispielkurve. **Nicht** zur Ergebnisberechnung verwenden.



LEISTUNGSMERKMALE

EMPFINDLICHKEIT

Die untere Nachweisgrenze ergibt sich aus der Standardkurve durch die Bestimmung der resultierenden Konzentration der mittleren OD der Standard A (basierend auf 10 Analysen) minus 2σ . Daher beträgt die Empfindlichkeit des "Direct 3α-Diol-G ELISA Kit" **0,1 ng/ml**.

SPEZIFITÄT (KREUZREAKTIVITÄT)

Die folgenden Verbindungen wurden mit dem "Direct 3α-Diol-G ELISA Kit" auf Kreuzreaktivität getestet, wobei 100% die Kreuzreaktivität von 3α-Diol-G war.

Steroid	% Kreuzreaktivität
3α-Diol-G	100
Testosteron	0,2
Progesteron	0,16
Androstendion	0,14
Cortisol	0,05

Die folgenden Steroide wurden getestet, aber zeigten weniger als 0,01% Kreuzreaktivität: Corticosteron, Dehydroepiandrosteron, Dihydrotestosteron, Epiandrosteron, 17β-Östradiol und Östron.

REPRODUZIERBARKEIT INNERHALB EINES ASSAYS

Drei Proben wurden jeweils 10-mal mit der gleichen Standardkurve getestet. Die Ergebnisse (in ng/ml) sind im Folgenden dargestellt:

Probe	Mittelwert	StAbw	VK%
1	0,87	0,07	7,8
2	6,86	0,49	7,2
3	21,26	1,29	6,0

REPRODUZIERBARKEIT ZWISCHEN ASSAYS

Drei Proben wurden zehn Mal über einen Zeitraum von vier Wochen untersucht. Die Ergebnisse (in ng/ml) sind im Folgenden dargestellt:

Probe	Mittelwert	StAbw	VK%
1	0,98	0,10	10,4
2	7,05	0,46	6,5
3	20,92	2,26	10,8

WIEDERFINDUNG

Dotierte Proben wurden durch Zugabe von definierten Mengen von 3 α -Diol-G zu drei Patientenserumproben hergestellt. Die Ergebnisse (in ng/ml) sind im Folgenden dargestellt:

Probe	Beob. Resultat	Erw. Resultat	Wiederfindung (%)
1. Undotiert	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. Undotiert	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. Undotiert	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

LINEARITÄT

Drei Patientenserumproben wurden mit Standard A verdünnt. Die Ergebnisse (in ng/ml) sind nachfolgend tabellarisch dargestellt:

Probe	Beob. Resultat	Erw. Resultat	Wiederfindung (%)
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

ERWARTETE STANDARDWERTE

Wie bei allen klinischen Tests sollte jedes Labor Daten sammeln und seinen eigenen Bereich erwarteter Standardwerte erstellen.







Gruppe	Bereich (ng/ml)
Männer	1,53 - 14,82
Prämenopausal	0,22 - 4,64
Postmenopausal	0,61 - 3,71
Frauen(Pubertät)	0,51 - 4,03

LITERATUR

1. Jacobi GH, Wilson JD. Formation of 5 α -Androstane-3 α , 17 β -Diol by Normal and Hypertrophic Human Prostate. *J Clin Endocrinol Metab.* 1977; 44(1):107–15.
2. Deslypere JP, 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.* 1982; 54(2):386–91.
3. Moghissi E, et al. Origin of Plasma Androstanediol Glucuronide in Men. *J Clin Endocrinol Metab.* 1984; 59(3):417–21.
4. Scanlon MJ, et al. Serum Androstanediol Glucuronide Concentrations in Normal and Hirsute Women and Patients with Thyroid Dysfunction. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1988; 29(5):529–38.
5. Reiner BJ, et al. Serum 3 α -Androstanediol Glucuronide Measurements in Sexually Mature Women with Congenital Adrenal Hyperplasia During Therapy. *J Clin Endocrinol Metab.* 1989; 69(1):105–9.
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.* 1990; 35(1):133–7.
7. Pang S, et al. 3 α -Androstanediol Glucuronide in Virilizing Congenital Adrenal Hyperplasia: A Useful Serum Metabolic Marker of Integrated Adrenal Androgen Secretion. *J Clin Endocrinol Metab.* 1991; 73(1):166–74.
8. Riddick L, et al. 3 α -Androstanediol Glucuronide in Premature and Normal Pubarche. *J Clin Endocrinol Metab.* 1991; 72(1): 46–50.
9. Check JH, et al. Falsely Elevated Steroidal Assay Levels Related to Heterophile Antibodies Against Various Animal Species. *Gynecol Obstet Invest.* 1995; 40(2):139–40.

Please use only the valid version of the instructions for use provided with the kit

Symbole:

	Lagertemperatur		Hersteller		Enthält Testmaterial für <n> Teste
	Verwendbar bis	LOT	Chargennummer	IVD	In vitro Diagnostikum
	Vor Gebrauch Packungsbeilage lesen	CONT	Inhalt	CE	CE gekennzeichnet
	Achtung	REF	Katalog-Nummer		