



DHEA

DPC®

Coat-A-Count® DHEA

English

Intended Use: Coat-A-Count DHEA is a solid-phase ^{125}I radioimmunoassay designed for the quantitative measurement of dehydroepiandrosterone (DHEA) in serum. It is intended strictly for *in vitro* diagnostic use.

Catalog Numbers: **TKDH1** (75 tubes), **TKDH2** (150 tubes).

CDC Analyte Identifier Code: **1309**

CDC Test System Identifier Code: **13030**

CLIA Complexity Category: **High**



The 75-tube kit contains less than 5 microcuries (185 kilobecquerels) of radioactive ^{125}I DHEA, and the 150-tube kit contains less than 10 microcuries (370 kilobecquerels).

Summary and Explanation of the Test

Dehydroepiandrosterone (DHEA) is an adrenal steroid which often circulates at an elevated level in cases of abnormal hair growth (hirsutism) and virilization. Its measurement may also be of value in the assessment of adrenarche and delayed puberty.

The DHEA in circulation originates almost entirely from the adrenals. Although produced at a rate only somewhat lower than dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA- SO_4), with which it is peripherally interconvertible, DHEA has a much shorter half-life and so maintains a plasma concentration almost one thousandfold lower. In itself, DHEA is only weakly androgenic, but it can serve as a precursor to more potent androgens.

Plasma levels of DHEA increase steadily from about the seventh year, then gradually decline after the third decade. According to the literature, the upper reference limit for young adults is approximately 10 ng/mL. Like cortisol, DHEA exhibits a diurnal variation, being at its highest in the morning. On the other hand, it shows no significant variation throughout the menstrual cycle. There is a

moderate decrease during pregnancy. Unlike testosterone, DHEA does not circulate bound to sex hormone-binding globulin and therefore is not influenced by alterations in the level of this carrier protein.

Principle of the Procedure

The Coat-A-Count DHEA procedure is a competitive immunoassay based on antibody-coated tubes. Patient samples are first extracted into dichloromethane, evaporated to dryness and resuspended in the zero calibrator. ^{125}I -labeled DHEA then competes with DHEA in the patient extracts for antibody sites. After the tubes are decanted and counted, DHEA concentrations are read directly from a calibration curve.

Reagents to Pipet: 1

Total Incubation Time: 2 Hours

Total Counts at lodination:
approximately 100,000 cpm

Warnings and Precautions

For *in vitro* diagnostic use.

Reagents: Store at 2–8°C in a refrigerator designated for incoming radioactive materials. Dispose of in accordance with applicable laws.

Do not use reagents beyond their expiration dates.

Some components supplied in this kit may contain human source material and/or other potentially hazardous ingredients which necessitate certain precautions.

Follow universal precautions, and handle all components as if capable of transmitting infectious agents. Source materials derived from human blood were tested and found nonreactive for syphilis; for antibodies to HIV 1 and 2; for hepatitis B surface antigen; and for antibodies to hepatitis C.

Sodium azide, at concentrations less than 0.1 g/dL, has been added as a preservative. On disposal, flush with large volumes of water to prevent the buildup of potentially explosive metal azides in lead and copper plumbing.

Water: Use distilled or deionized water.

Radioactivity

A copy of any radioisotope license certificate (Specific or General) issued to a US customer must be on file with Diagnostic Products Corporation before kits or components containing radioactive material can be shipped. These radioactive materials may be acquired by any customer with the appropriate Specific license. Under a General license these radioactive materials may be acquired only by physicians, veterinarians in the practice of veterinary medicine, clinical laboratories and hospitals — and strictly for *in vitro* clinical or laboratory tests not involving external or internal administration of the radioactive material or its radiation to human beings or other animals. Its acquisition, receipt, storage, use, transfer and disposal are all subject to the regulations and a (General or Specific) license of the U.S. Nuclear Regulatory Commission or a State with which the NRC has entered into an agreement for the exercise of regulatory control.

Handle radioactive materials according to the requirements of your General or Specific license. To minimize exposure to radiation, the user should adhere to guidelines set forth in the National Bureau of Standards publication on the *Safe Handling of Radioactive Materials* (Handbook No. 92, issued March 9, 1964) and in subsequent publications issued by State and Federal authorities.

Wipe up spills promptly and decontaminate affected surfaces. Avoid generation of aerosols. Dispose of solid radioactive waste according to license requirements. General licensees (holders of NRC Form 483) may dispose of solid radioactive waste as nonradioactive waste, after removing labeling. Specific licensees (NRC Form 313) should refer to Title 10, Code of Federal Regulations, Part 20. Licensees in Agreement States should refer to the appropriate regulations of their own state. General licensees may dispose of liquid radioactive waste of the type contained in this product through a laboratory sink drain. Licensees must remove or deface labels from empty containers of radioactive materials before disposal of solid waste. Specific licensees

may dispose of small quantities of liquid radioactive waste of the type used in this product through a laboratory sink drain. Refer to the appropriate regulations applicable to your laboratory.

Materials Supplied: Initial Preparation

DHEA Ab-Coated Tubes (TDH1)

Polypropylene tubes coated with antibodies to DHEA and packaged in zip-lock bags. Store refrigerated and protected from moisture, carefully resealing the bags after opening. Stable at 2–8°C until the expiration date marked on the bag. Color: buff.

TKDH1: 75 tubes. **TKDH2:** 150 tubes.

¹²⁵I DHEA (TDH2)

Lyophilized iodinated DHEA. Reconstitute each vial with **80 mL** distilled water. Stable at 2–8°C for 30 days after reconstitution, or until the expiration date marked on the vial. Do not transfer the tracer to a plastic container.

TKDH1: 1 vial. **TKDH2:** 2 vials.

DHEA Buffer (DHC3)

100 mL of buffer, supplied in liquid form, ready to use. It is employed for resuspending the extracts, and also serves as the zero calibrator (Calibrator A). Store the buffer capped. Stable at 2–8°C for 30 days after opening.

TKDH1: 1 vial. **TKDH2:** 1 vial.

DHEA Calibrators (DHC4–9)

One set of six vials, labeled B through G, containing different levels of DHEA in the same matrix used for the DHEA Buffer. Each vial contains 3.0 mL. Stable at 2–8°C for 30 days after opening.

TKDH1: 1 set. **TKDH2:** 1 set.

The calibrators represent, respectively, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10 and 30 nanograms of DHEA per milliliter (ng/mL); equivalently, 1.7, 3.5, 8.7, 17.3, 34.7 and 104 nanomoles per liter (nmol/L). Intermediate calibration points may be obtained by mixing the calibrators in suitable proportions. The life of the calibrators can be extended by freezing. Aliquot, if necessary, in tightly capped silanized glass tubes, to avoid repeated thawing and freezing.

Materials Required But Not Provided

Gamma counter — compatible with standard 12x75 mm tubes

Vortex mixer

Reagent Preparation

Graduated cylinder: 100 mL

Extraction

Glass pipets: 1.0 mL and 6.0 mL

16x125 mm tubes with Teflon-lined caps. The tubes should be made of high-quality borosilicate glass. (Do not use plastic.) To avoid the risk of contamination, use "precleaned" glassware or employ a final rinse with 0.1 N HCl followed by dichloromethane.

Mechanical rotator, capable of 15 to 20 revolutions per minute

Aspirator

Evaporator with fume hood and 37°C heat block or water bath

Compressed nitrogen

Ultrasonic bath

Dichloromethane (methylene chloride) of at least spectrophotometric grade

Radioimmunoassay

Plain 12x75 mm polypropylene tubes — for use as NSB tubes, available from DPC

Micropipets with disposable tips: 200 µL and 1,000 µL.

Waterbath capable of maintaining 37°C — neither an oven nor a heat block is suitable

Foam decanting rack — available from DPC

Logit-log graph paper — available from DPC (catalog number: ZP797)

A tri-level, human serum-based immunoassay control, containing DHEA as one of over 25 assayed constituents, is available from DPC (catalog number: CON6).

Specimen Collection

The patient need not be fasting, and no special preparations are necessary. Collect blood by venipuncture⁶ into plain tubes, and separate the serum from the cells, noting the time of collection.

Before extraction, allow the samples to come to room temperature (15–28°C) and mix by *gentle* swirling or inversion. Aliquot, if necessary, to avoid repeated thawing and freezing. Do *not* attempt to thaw frozen specimens by heating them in a waterbath.

The use of an ultracentrifuge is recommended to clear lipemic samples.

Lipemic samples are unsuitable for use.

Blood collection tubes from different manufacturers may yield differing values, depending on materials and additives, including gel or physical barriers, clot activators and/or anticoagulants. Coat-A-Count DHEA has not been tested with all possible variations of tube types. Consult the section on Alternate Sample Types for details on tubes that have been tested.

Volume Required: 1.0 mL of serum per tube.

Storage: 2 days at 2–8°C or 2 months frozen at –20°C.

Sample Preparation

Caution: Dichloromethane (methylene chloride) is a volatile, flammable organic solvent. Conduct the evaporation step under a fume hood. Avoid open flames and do not pipet by mouth. The dichloromethane must be of at least spectrophotometric grade.

Note that only patient samples and controls require extraction before assay. *Do not extract the calibrators.*

- 1 Label one 16x125 mm glass tube for each patient sample and control.

The tubes should be made of high-quality borosilicate glass. (Do not use plastic.) To avoid the risk of contamination, use "precleaned" glassware or employ a final rinse with 0.1 N HCl followed by dichloromethane.

- 2 Pipet **1.0 mL** of each patient sample and control into the tubes prepared.
- 3 **Extraction:** Add **10 mL** dichloromethane to every tube. Cap securely.
- 4 Mix by inversion using a mechanical rotator for **60 minutes**.

Gentle end-over-end rotation at 15 to 20 revolutions per minute is the preferred method.

- 5** Centrifuge for **5 minutes** at approximately 1500xg to separate the two phases.

Any sample partially emulsified should be shaken vigorously and centrifuged again.

- 6** Remove *most* of the top layer, being careful not to disturb the interface.

Use a water-tap aspirator. (Aspirating all the way to the interface may cause the dichloromethane layer to become contaminated with remains of the serum phase on contact.)

- 7** **Evaporation:** Transfer **6.0 mL** of the lower (dichloromethane) phase to a clean glass tube and evaporate to complete dryness under a gentle stream of nitrogen at 37°C.

- 8** Once dry, resuspend the extracts with **0.6 mL** of DHEA Buffer (Calibrator A). Vortex or sonicate thoroughly. Continue with the radioimmunoassay procedure described below.

The reconstituted extracts may be stored at -20°C. Reconstituted extracts prepared from samples with DHEA concentrations greater than the highest calibrator (30 ng/mL) may be further diluted with the DHEA Buffer before assay.

Radioimmunoassay Procedure

All components must be at room temperature (15–28°C) before use. Calibrators B through G and the DHEA Buffer (Calibrator A) are ready to use. Only patient samples and controls must be subjected to the extraction procedure described above.

- 1** **Plain Tubes:** Label four plain (uncoated) 12×75 mm polypropylene tubes T (total counts) and NSB (nonspecific binding) in duplicate.

Because nonspecific binding in the Coat-A-Count procedure is characteristically low, the NSB tubes may be safely omitted without compromising accuracy or quality control.

Coated Tubes: Label fourteen DHEA Ab-Coated Tubes A (maximum binding) and B

through G in duplicate. Label additional antibody-coated tubes, also in duplicate, for controls and patient samples.

Calibrator	ng/mL	nmol/L
A (MB)	0	0
B	0.5	1.7
C	1.0	3.5
D	2.5	8.7
E	5.0	17.3
F	10	34.7
G	30	104

- 2** Pipet **200 µL** of the zero calibrator A (DHEA Buffer) into the NSB and A tubes, and **200 µL** of each nonzero calibrator into the tubes marked B through G. Pipet **200 µL** of each control and patient sample into the tubes prepared. **Pipet directly to the bottom.**

Reconstituted extracts prepared from samples with DHEA concentrations greater than the highest calibrator (30 ng/mL) may be further diluted with the DHEA Buffer before assay.

It is good practice to use a disposable-tip micropipet, changing the tip between samples, in order to avoid carryover contamination.

- 3** Add **1.0 mL** of ¹²⁵I DHEA to every tube. Vortex.

No more than 10 minutes should elapse during the dispensing of the tracer. Set the T tubes aside for counting at step 6; they require no further processing.

- 4** Incubate for **2 hours at 37°C**.

- 5** Decant thoroughly.

Removing all visible moisture will greatly enhance precision. Using a foam decanting rack, decant the contents of all tubes (except the T tubes) and allow them to drain for 2 or 3 minutes. Then strike the tubes sharply on absorbant paper to shake off all residual droplets.

- 6** Count for **1 minute** in a gamma counter.

Calculation of Results

To obtain results in terms of concentration from a logit-log representation of the calibration curve, first calculate for each pair of tubes the average NSB-corrected counts per minute:

Net Counts = (Average CPM) minus (Average NSB CPM)

Then determine the binding of each pair of tubes as a percent of maximum binding (MB), with the NSB-corrected counts of the A tubes taken as 100%:

Percent Bound = (Net Counts / Net MB Counts) × 100

(The calculation can be simplified by omitting the correction for nonspecific binding; samples within range of the calibrators yield virtually the same results when Percent Bound is calculated directly from Average CPM.)

Using logit-log graph paper, plot Percent Bound on the vertical (probability) axis against Concentration on the horizontal (logarithmic) axis for each of the nonzero calibrators, and draw a straight line approximating the path of these points. Results for the unknowns may then be read from the line by interpolation.

It is good practice to inspect results for agreement within replicates, and to construct a graph of the calibration curve (even if the calculations are handled by computer) as a visual check on the appropriateness of the transformation used and as a way to detect deviant calibration points. We also recommend keeping track of these data reduction parameters:

T = Total Counts (as counts per minute)

%NSB = $100 \times (\text{Average NSB Counts} / \text{Total Counts})$

%MB = $100 \times (\text{Net Counts} / \text{Total Counts})$

And the 20, 50 and 80 percent "intercepts," where

20% = Concentration at 20 Percent Bound, etc.

Note that other approaches, e.g. a sound implementation of the 4-parameter logistic, are also acceptable. See Dudley RA, et al. Guidelines for immunoassay data reduction. Clin Chem 1985;31:1264-71.

Example Run: For illustration only, not for calculating results from another run. (See "Example Run" table.)

Quality Control

Controls or serum pools with at least two DHEA concentration levels — low and high — should routinely be assayed as unknowns.

Report patient results only if the control results for that assay meet your laboratory's established criteria for acceptability.

It is good laboratory practice to record for each assay the lot numbers of the components used, as well as the dates when they were first reconstituted or opened. We also recommend charting control results from day to day — as described, for example, in Westgard JO, et al. A multi-rule chart for quality control. Clin Chem 1981;27:493-501. Note that repeat samples can serve as a valuable additional tool for monitoring interassay precision, and that pairs of control tubes can be spaced throughout the assay to help verify the absence of significant drift.

Solvent Blanks:

For reliable results, the dichloromethane must be of at least spectrophotometric grade and the nitrogen source, if used, must not contaminate the evaporation tubes with oil or moisture. (The use of a trap containing calcium sulfate will help prevent such contamination.) As a check on the purity of these reagents, we recommend periodic use of a "solvent blank." This involves extracting and assaying distilled or sterile water, in the manner prescribed for patient samples, to verify that it yields an apparent DHEA concentration at or below the detection limit.

Expected Values

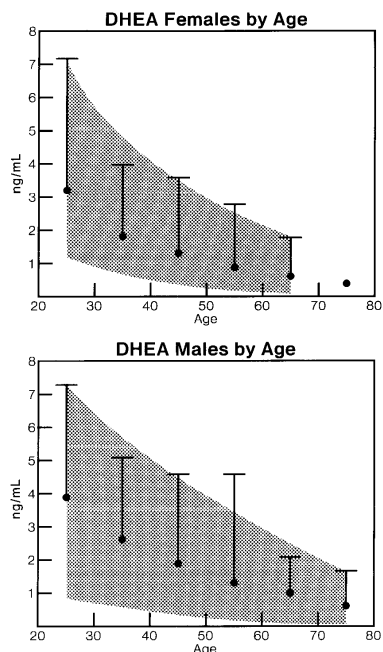
A preliminary reference range study was performed with the Coat-A-Count DHEA procedure on serum samples collected from 33 healthy adult volunteers, including 19 females and 14 males. The results ranged from 0.2 to 9.8 ng/mL with a median value of 2.5 ng/mL. Ninety-one percent of the results were less than 6.0 ng/mL. Note that these results were

obtained for the recommended sample type, namely serum.

A further reference range study was conducted at a large northeastern hospital on 136 women and 155 men, all of known age. The results, broken down by sex and by age, are summarized in the table and graphs below. In the graphs, solid circles depict medians (50th percentiles), while "T" bars depict 95th percentiles. Shading represents a smoothing of the observed 5th and 95th percentiles according to a simple model of the behavior of circulating DHEA as a function of age.

Females				
Age Group	n	5th %ile	50th %ile	95th %ile
10–19	2	—	3.2	—
20–29	23	1.1	1.6	7.2
30–39	29	0.55	1.3	4.0
40–49	29	0.40	0.85	3.6
50–59	18	0.3	0.7	2.8
60–69	21	0.1	0.3	1.8
70–79	8	0.1	0.25	1.5
80–89	6	—	—	—

Males				
Age Group	n	5th %ile	50th %ile	95th %ile
10–19	6	—	1.1	—
20–29	17	1.0	3.9	7.3
30–39	21	0.75	2.6	5.1
40–49	23	0.7	1.9	4.6
50–59	29	0.55	1.7	4.6
60–69	37	0.4	1.0	2.1
70–79	18	0.1	0.6	1.7
80–89	4	—	0.3	—



Consider these limits as *guidelines* only. Each laboratory should establish its own reference ranges.

Performance Data

See Tables and Graphs for data *representative* of the Coat-A-Count DHEA kit's performance. DHEA results in the sections are expressed as nanograms per milliliter (ng/mL). Since the molecular mass of DHEA is 288.4 daltons, to convert to S.I. units — nanomoles per liter (nmol/L) — multiply by 3.467:

Conversion Factor:

ng/mL × 3.467 → nmol/L

Calibration Range: 0.5 – 30 ng/mL
(1.7 – 104 nmol/L.)

Analytical Sensitivity: 0.04 ng/mL.

Intraassay Precision (Within-Run)

Statistics were calculated for samples from the results of 20 pairs of tubes in a single assay. (See "Intraassay Precision" table.)

Interextraction: Statistics were calculated for three samples that were individually extracted twenty times, then assayed by the Coat-A-Count DHEA kit. (See "Interextraction" table.)

Specificity: The kit is highly specific for DHEA, with a relatively low crossreactivity to other naturally occurring steroids or therapeutic drugs that may be present in patient samples. Extracted samples dissolved in the zero calibrator were used for this experiment, with the exception of the starred compounds(*), which were assayed unextracted and dissolved in the zero calibrator. (See "Specificity" table.)

Linearity: Samples were assayed under various dilutions. (See "Linearity" table.)

Recovery 1: Samples spiked 1 to 19 with three DHEA solutions (50, 100 and 200 ng/mL) were assayed. (See "Recovery 1" table.)

Recovery 2: In a similar experiment, three more spiking solutions (D, E and F) were prepared at levels of 100, 200 and 400 ng/mL. Expected values were calculated by adding 95% of the unspiked value to 5% of the spiking solution concentration (5, 10 and 20 ng/mL, respectively). (See "Recovery 2" table.)

Bilirubin: Presence of bilirubin in concentrations up to 200 mg/L has no effect on results, within the precision of the assay.

Lipemia: It has been established that gross hyperchylomicronemia can interfere with some immunoassays. This interference can be avoided by isolating the clear infranatant layer before assay. To accomplish this manually, draw the lipemic sample into a pipet and seal the tip with Parafilm. Let the pipet stand until the lipids float to the top. Then drain and assay the clear layer of serum. Alternatively, an airfuge may be used. (It has not been established whether other types of lipemia also interfere.)

Alternate Sample Type: To assess the effect of alternate sample types, blood was collected from 33 volunteers into plain, heparinized and EDTA vacutainer tubes. All samples were assayed by the Coat-A-Count DHEA procedure, with the following results.

(Heparin) = $0.84 (\text{Serum}) + 1.0 \text{ ng/mL}$
 $r = 0.90$

(EDTA) = $0.92 (\text{Serum}) + 0.2 \text{ ng/mL}$
 $r = 0.95$

Means:
3.8 ng/mL (Heparin)

3.4 ng/mL (Serum)
3.4 ng/mL (EDTA)

The serum values ranged from 0.2 to 13.7 ng/mL. Both heparinized and EDTA plasma showed a variability — that is, discrepancies relative to results on serum samples from the same individuals — greater than the variability observed in the interextraction precision study. On this basis, it is recommended that samples be collected as serum.

Method Comparison: The Coat-A-Count DHEA kit was compared to another commercially available DHEA radioimmunoassay on 90 patient serum samples. The statistics displayed below show good correlation between these two methodologies.

(CAC) = $1.17 (\text{Kit A}) + 0.26 \text{ ng/mL}$
 $r = 0.94$

Means:
2.0 ng/mL (Coat-A-Count)
1.5 ng/mL (Kit A)

Effect of Free Fatty Acid: To investigate the effect of nonesterified fatty acid (NEFA), aliquots of three samples were lyophilized, reconstituted and then assayed by the Coat-A-Count DHEA procedure. Aqueous solutions containing 0, 2.5, 5, and 10 mmol/L of oleic acid were used for the reconstitution step. The results demonstrate that oleic acid — at physiologically high concentrations — does have a significant *in vitro* effect on the procedure.

Protein Effect: To simulate various protein concentrations, experiments were performed in which 1.0 mL aliquots of a stripped healthy human serum pool were freeze-dried and then reconstituted with various volumes of water (0.5, 0.67, 1.0, 1.5, 2.0 mL). Each reconstituted aliquot was then assayed by the Coat-A-Count DHEA procedure. Note that aliquots reconstituted with half the original volume represent an extremely high protein concentration, in the order of 14 g/dL. (The factor to correct for reconstitution volume is tabulated below.) The results indicate that total protein concentrations which are extremely low may have a clinically significant effect on the Coat-A-Count DHEA assay. (See "Protein Effect" table.)

References

1) Cohen HN, et al. Clinical value of adrenal androgen measurement in the diagnosis of delayed puberty. *Lancet* 1981;i:689-92. 2) Erb J, et al. Discrimination between schizophrenic and control subjects by means of plasma dehydroepiandrosterone measurements. *J Clin Endocrinol Metab* 1981;52:181-6. 3) Fiet J, et al. Simultaneous radioimmunoassay of androstenedione, dehydroepiandrosterone and 11- β hydroxyandrostenedione in plasma. *Horm Res* 1980;13:133-49. 4) de Peretti E, Forest M. Unconjugated dehydroepiandrosterone plasma levels in normal subjects from birth to adolescence. *J Clin Endocrinol Metab* 1976;43:982-7. 5) Tourniaire J, Pugeat M. Strategic approach of hyperandrogenism in women. *Horm Res* 1983;18:125-34. 6) National Committee for Clinical Laboratory Standards. Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture: approved standard. 4th ed. NCCLS Document H3-A4, Wayne, PA: NCCLS, 1998.

Technical Assistance

In the United States, contact DPC's Technical Services department.
Tel: 800.372.1782, 310.645.8200
Fax: 310.645.9999. To place an order:
Tel: 800.372.1782. Fax: 800.234.4372.
Outside the United States, contact your National Distributor.

The Quality System of Diagnostic Products Corporation is registered to ISO 13485:2003.

Tables and Graphs

Example Run

Tube ¹	Duplicate CPM ²	Average CPM ³	Net CPM ⁴	Percent Bound ⁵	DHEA ng/mL ⁶
T ⁷	73,741 72,920	73,331			
(NSB) ⁸	431 411	421			
A (MB) ⁹	34,646 34,588	34,617	34,196	100%	0
B	26,323 26,127	26,225	25,804	75.5%	0.5
C	23,907 23,831	23,869	23,448	68.6%	1
D	19,613 19,552	19,583	19,162	56.0%	2.5
E	16,557 16,556	16,557	16,136	47.2%	5
F	12,823 12,805	12,814	12,393	36.2%	10
G	8,270 8,240	8,255	7,834	22.9%	30
Unknowns: ¹⁰					
X1	23,522 23,019	23,271	22,850	66.8%	1.1
X2	17,590 17,461	17,526	17,105	50.0%	3.8
X3	13,439 13,410	13,425	13,004	38.0%	9.0

Quality Control Parameters:¹¹

T⁷ = 73,331 cpm

%NSB⁸ = 0.6%

%MB⁹ = 47%

20% Intercept¹² = 42.84 ng/mL

50% Intercept = 3.82 ng/mL

80% Intercept = 0.34 ng/mL

Intraassay Precision (ng/mL)

	Mean ¹	SD ²	CV ³
1	1.3	0.14	10.8%
2	2.6	0.17	6.5%
3	9.6	0.50	5.2%

Interextraction (ng/mL)

	Mean ¹	SD ²	CV ³
1	1.2	0.14	11.7%
2	2.8	0.22	7.9%
3	12.6	0.71	5.6%

Specificity

Compound ¹	% Cross reactivity ²
DHEA	(100%)
DHEA-SO ₄	0.066%
Aldosterone	ND
5 α -Androstan-3 α ,17 β -diol*	0.43%
5 β -Androstan-3 α ,17-diol	0.046%
5 α -Androstan-3,17-dione*	0.97%
5 β -Androstan-3,17-dione	0.13%
Δ^5 -Androsten-3 β ,17-diol	6.13%
Androstenedione*	2.18%
Androsterone	0.70%
Corticosterone	ND
Cortisol	ND
Cortisone	ND
Danazol	0.003%
11-Deoxycortisol*	ND
Dexamethasone	0.005%
5 α -Dihydrotestosterone*	0.26%
5(10)-Estron-17 α -ethynyl-17 β -ol-3-one	0.009%
Δ^4 -Estron-17 α -methyl-17 β -ol-3-one	0.17%
Estrone	0.88%
Ethisterone	0.01%
11 β -Hydroxyandrostenedione	0.02%
19-Hydroxyandrostenedione	0.16%
11-Ketotestosterone	0.003%
Norethindrone	0.01%
Norethinodrel	0.009%
Prednisone	ND
Progesterone	0.05%
Spironolactone	0.016%
Triamcinolone	ND
Testosterone	1.07%

ND: not detectable³**Linearity (ng/mL)**

	Dilution ¹	Observed ²	Expected ³	%O/E ⁴
1	4 in 4 ⁵	6.0	—	—
	3 in 4	4.1	4.5	91%
	2 in 4	2.7	3.0	90%
	1 in 4	1.2	1.5	80%
2	4 in 4	11.3	—	—
	3 in 4	8.8	8.5	104%
	2 in 4	5.1	5.7	89%
3	4 in 4	11.8	—	—
	3 in 4	9.5	8.9	107%
	2 in 4	5.6	5.9	95%
4	4 in 4	12.7	—	—
	3 in 4	10.2	9.5	107%
	2 in 4	5.5	6.3	87%
	1 in 4	3.1	3.2	97%
5	4 in 4	19.0	—	—
	3 in 4	13.8	14.3	97%
	2 in 4	9.1	9.5	96%
6	4 in 4	21.4	—	—
	3 in 4	15.8	16.1	98%
	2 in 4	10.7	10.7	100%

Recovery 1

	Solution ¹	Observed ²	Expected ³	%O/E ⁴
1	—	0.0	—	—
	A	2.5	2.5	100%
	B	4.9	5.0	98%
	C	10.5	10.0	105%
2	—	0.0	—	—
	A	2.5	2.5	100%
	B	5.2	5.0	104%
	C	10.5	10.0	105%

Recovery 2

	Solution ¹	Observed ²	Expected ³	%O/E ⁴
3	—	1.7	—	—
	D	6.3	6.6	95%
	E	11.3	11.6	97%
	F	21.4	21.6	99%
4	—	2.4	—	—
	D	7.5	7.3	103%
	E	11.8	12.3	96%
	F	22.4	22.3	100%

Protein Effect

Expt. ¹	Factor ²	Approx. g/dL ³	Observed ⁴	Expected ⁵	% O/E ⁶
1	2.00×	~ 14.0	5.5	5.6	98%
	1.50×	~ 10.5	4.6	4.2	110%
	1.00×	~ 7.0	2.8	—	(100%)
	0.67×	~ 4.7	2.2	1.9	116%
	0.50×	~ 3.5	1.2	1.4	86%
2	2.00×	~ 14.0	9.2	9.6	96%
	1.50×	~ 10.5	7.8	7.2	108%
	1.00×	~ 7.0	4.8	—	(100%)
	0.67×	~ 4.7	3.4	3.2	106%
	0.50×	~ 3.5	2.2	2.4	92%

Deutsch. Example Run: ¹Röhrchen, ²Duplikat CPM, ³Mittelwert CPM, ⁴Netto CPM, ⁵Prozent Bindung, ⁶Ca. DHEA, ng/mL, ⁷Total, ⁸%NSB, ⁹%MB, ¹⁰Unbekannt, ¹¹Qualitätskontrollparameter, ¹²20% Intercept.
Intraassay Precision: ¹Mittelwert, ²SD (Standardabweichung), ³CV (Variationskoeffizient). **Interextraction:** ¹Mittelwert, ²SD (Standardabweichung), ³CV (Variationskoeffizient). **Linearity:** ¹Verdünnung, ²Beobachtet (B), ³Erwartet (E), ⁴% B/E, ⁵4 in 4. **Recovery:** ¹Lösung, ²Beobachtet (B), ³Erwartet (E), ⁴% B/E. **Specificity:** ¹Verbindung, ²% Kreuzreaktivität, ³NN: Nicht nachweisbar. **Protein Effect:** ¹Experiment, ²Faktor, ³Gemessene Konzentration, ⁴Beobachtet (B), ⁵Erwartet (E), ⁶% B/E.

Español. Example Run: ¹Tubo, ²Duplicado CPM, ³Media CPM, ⁴CPM Netas, ⁵Porcentaje de unión, ⁶DHEA, aprox., ng/mL, ⁷Total, ⁸%NSB, ⁹%MB, ¹⁰Desconocido, ¹¹Parámetros del control de calidad, ¹²Corte al 20%. **Intraassay Precision:** ¹Media, ²DS, ³CV. **Interextraction:** ¹Media, ²DS, ³CV. **Linearity:** ¹Dilución, ²Observado (O), ³Esperado (E), ⁴%O/E, ⁵4 en 4. **Recovery:** ¹Solución, ²Observado (O),

³Esperado (E), ⁴%O/E. **Specificity:** ¹Compuesto, ²% Reacción cruzada, ³ND: no detectable. **Protein Effect:** ¹Experimento, ²Factor, ³Concentración aparente, ⁴Observado (O), ⁵Esperado (E), ⁶%O/E.

Français. Example Run: ¹Tube, ²Duplicate CPM, ³CPM moyen, CPM corrigé, ⁵Pourcentage lié, ⁶Approx. DHEA, ng/mL, ⁷Total, ⁸%NSB, ⁹%MB, ¹⁰Patients, ¹¹Paramètres Contrôle de Qualité, ¹²20% Intercept. **Intraassay Precision:** ¹Moyenne, ²SD, ³CV. **Interextraction:** ¹Moyenne, ²SD, ³CV. **Linearity:** ¹Dilution, ²Observé (O), ³Attendu (A), ⁴%O/A, ⁵4 dans 4. **Recovery:** ¹Solution, ²Observé (O), ³Attendu (A), ⁴%O/A. **Specificity:** ¹Composé, ²Réaction croisée%, ³ND: non détectable. **Protein Effect:** ¹Test, ²Facteur, ³Concentration apparente, ⁴Observé (O), ⁵Attendu (A), ⁶%O/A.

Italiano. Example Run: ¹Provetta, ²CPM in duplicato, ³CPM Medio, ⁴CPM Netti, ⁵Percentuale di Legato, ⁶Appross. DHEA, ng/mL, ⁷Totale, ⁸%NSB, ⁹%MB, ¹⁰Campioni Non Noti, ¹¹Parametri per il Controllo di Qualità, ¹²Intercetta al 20%. **Intraassay Precision:** ¹Media, ²SD (Deviazione Standard), ³CV (Coefficiente di Variazione). **Interextraction:** ¹Media, ²SD (Deviazione Standard), ³CV (Coefficiente di Variazione). **Linearity:** ¹Diluizione, ²Osservato (O), ³Atteso (A), ⁴%O/A, ⁵4 in 4. **Recovery:** ¹Soluzione, ²Osservato (O), ³Atteso (A), ⁴%O/A. **Specificity:** ¹Composto, ²Percentuale di Crossreattività, ³ND: non determinabile. **Protein Effect:** ¹Esperimento, ²Fattore, ³Concentrazione apparente, ⁴Osservato (O), ⁵Atteso (A), ⁶%O/A.

Português Example Run: ¹Tubo, ²Duplicado CPM, ³Média de CPM, ⁴Net CPM, ⁵Percentagem de Ligação, ⁶Aprox. DHEA, ng/mL, ⁷Total, ⁸%NSB, ⁹%MB, ¹⁰Amostras desconhecidas, ¹¹Parâmetros do controle de qualidade, ¹²20% Intercepção. **Intraassay Precision:** ¹Média, ²Desvio padrão, ³Coefficiente de variação. **Interextraction:** ¹Média, ²Desvio padrão, ³Coefficiente de variação. **Linearity:** ¹Diluição, ²Observado (O), ³Esperado (E), ⁴%O/E, ⁵4 em 4. **Recovery:** ¹Solução, ²Observado (O), ³Esperado (E), ⁴%O/E. **Specificity:** ¹Composto, ²Percentagem de reação cruzada, ³ND: não detectável. **Protein Effect:** ¹Experiência, ²Fator, ³Apparent Concentration, ⁴Observado (O), ⁵Esperado (E), ⁶%O/E.

Deutsch

Coat-A-Count DHEA

Anwendung: Festphasen Radioimmunoassay (beschichtete Röhrchen) zur quantitativen Bestimmung des Dehydroepiandrosteron (DHEA) im

Serum. Der Test ist ausschließlich in der *In-Vitro*-Diagnostik einzusetzen.

Artikelnummern: **TKDH1** (75 Tests),
TKDH2 (150 Tests).



Die Packung mit 75 Röhrchen enthält weniger als 5 Microcurie (185 Kilobecquerel) an radioaktivem ¹²⁵I-markiertem DHEA; die Packung mit 150 Röhrchen enthält weniger als 10 Microcurie (370 Kilobecquerel).

Klinische Relevanz

Das Dehydroepiandrosteron (DHEA) ist ein adrenales Steroid, das in Fällen von abnormalen Haarwuchs (Hirsutismus) und Vermännlichung in erhöhten Spiegeln im Blutstrom vorliegt. Seine Bestimmung ist ebenso von Bedeutung in der Beurteilung der Adrenarche und einer verzögerten Pubertät.

Das DHEA wird nahezu ausschließlich in den Nebennieren produziert. Obwohl die Produktionsrate nur ein wenig unterhalb derer von Dehydroepiandrosteron-Sulfat (DHEA-SO₄) liegt, in welches es peripher reversiv umwandelbar ist, hat es eine viel geringere Halbwertszeit und liegt so in tausendfach geringerer Konzentration im Plasma vor. DHEA selbst ist ein schwaches Androgen, es kann aber in stärker wirkende Androgene umgewandelt werden.

Die Plasmaspiegel von DHEA erhöhen sich ständig vom 7. Lebensjahr an, nach dem 3. Lebensjahrzehnt verringern sich die Plasmawerte allmählich. In der Literatur werden als obere Grenze des Referenzbereiches annähernd 10 ng/ml für junge Erwachsene angegeben. Wie Cortisol, zeigt das DHEA tageszeitliche Schwankungen mit dem Höhepunkt am Morgen. Andererseits zeigt es während der Menstruation keine signifikanten Schwankungen und während der Schwangerschaft eine moderate Abnahme. Gegenüber Testosteron zirkuliert DHEA nicht an Sexualhormon-bindendem Globulin, weshalb es nicht von Konzentrationsveränderungen dieses Transportproteins beeinflusst wird.

Methodik

Das Coat-A-Count DHEA Verfahren ist ein kompetitiver Immunoassay basierend auf

Antikörper-beschichteten Röhrchen. Patientenproben werden zuerst in Dichlormethan extrahiert, die Extrakte getrocknet und dann im 0-Standard resuspendiert. ¹²⁵I-markiertes DHEA konkurriert anschließend mit dem DHEA in dem Patientenextrakt um die Antikörperbindung. Nachdem die Röhrchen dekantiert und gemessen wurden, lässt sich die DHEA-Konzentration direkt von einer Standardkurve ablesen.

Zu pipettierende Reagenzien: 1

Testdauer: 2 Stunden

Totalaktivität zum Zeitpunkt der

Markierung: ca. 100 000 cpm

Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Zur *In-vitro*-Diagnostik.

Reagenzien: Die Packung mit den Reagenzien sollte bei 2–8°C in einem Kühlschrank gelagert werden, der für radioaktives Material ausgewiesen ist. Die Entsorgung muss nach den jeweils gültigen Gesetzen erfolgen.

Die Reagenzien dürfen nur bis zum Verfallsdatum verwendet werden.

Einige Komponenten des Testbestecks können Material humanen Ursprungs und/oder in anderer Weise gefährliche Inhaltsstoffe enthalten, die es unbedingt notwendig machen die folgenden Vorsichtsmaßnahmen einzuhalten.

Die generell geltenden Vorsichtsmaßnahmen sind einzuhalten und alle Komponenten als potenziell infektiös zu behandeln. Alle aus menschlichem Blut gewonnenen Materialien wurden auf Syphilis, Antikörper gegen HIV-1 und HIV-2, Hepatitis-B-Oberflächenantigen und Hepatitis-C-Antikörper untersucht und negativ befundet.

Bestimmten Komponenten wurde Natriumazid (<0,1 g/dl) hinzugefügt. Um die Bildung von explosiven Metallaziden in Blei- und Kupferrohren zu vermeiden, sollten die Reagenzien nur zusammen mit großen Wassermengen in die Kanalisation gespült werden.

Wasser: Destilliertes bzw. deionisiertes Wasser benutzen.

Radioaktivität

Der Umgang mit radioaktivem Material ist in Deutschland genehmigungspflichtig. Deshalb muss der DPC eine Kopie der aktuellen gültigen Umgangsgenehmigung des Kunden vorliegen, bevor radioaktive Reagenzien versendet werden dürfen. Die Strahlenschutzverordnung ist zu beachten.

Das radioaktive Material ist gemäß der jeweiligen Umgangsgenehmigung zu handhaben.

Die Strahlenexposition ist zu minimieren. Spritzer sind sofort aufzuwischen und die betroffene Oberfläche zu dekontaminieren. Aerosolbildung ist zu vermeiden. Flüssiger und fester radioaktiver Abfall sind unter Beachtung der gültigen Richtlinien zu entsorgen.

Bestandteile der Testpackung: Vorbereitung

DHEA Antikörper-beschichtete Röhrchen (TDH1)

Polypropylen-Röhrchen beschichtet mit Antikörpern gegen DHEA, verpackt in wiederverschließbaren Plastikbeuteln. Kühl lagern, vor Feuchtigkeit schützen und nach dem Öffnen wieder sorgfältig verschließen. Lagerung bei 2–8°C bis zum Verfallsdatum. Farbe: lederfarben.

TKDH1: 75 Röhrchen.

TKDH2: 150 Röhrchen.

¹²⁵I DHEA (TDH2)

Lyophilisiert, jodiertes DHEA. Jede Flasche mit **80 ml** destilliertem Wasser rekonstituieren. Lagerung bei 2–8°C. Haltbar bis 30 Tage nach der Rekonstitution oder bis zum Verfallsdatum auf der Flasche. Nicht in einen Plastikbehälter geben.

TKDH1: 1 Flasche. **TKDH2:** 2 Flaschen.

DHEA Puffer (DHC3)

100 ml Puffer, geliefert in flüssiger Form, gebrauchsfertig. Er ist zur Resuspension der Extrakte zu verwenden und dient zugleich als 0-Standard (Standard A). Den Puffer verschlossen lagern. Bei 2–8°C für 30 Tage nach dem Öffnen haltbar.

TKDH1: 1 Flasche. **TKDH2:** 1 Flasche.

DHEA Standards (DHC4–9)

Ein Set mit 6 Flaschen, B – G, mit verschiedenen DHEA Konzentrationen in

der gleichen Matrix, wie im DHEA Puffer verwendet. Jede Flasche enthält 3,0 ml. Bei 2–8°C für 30 Tage nach dem Öffnen haltbar.

TKDH1: 1 Set. **TKDH2:** 1 Set.

Die nicht 0-Standards haben DHEA Werte von 0,5/ 1,0/ 2,5/ 5,0/ 10 und 30 ng/ml; bzw. 1,7/ 3,5/ 8,7/ 17,3/ 34,7 und

104 nmol/l. Weitere

Standardkurvenpunkte können durch Mischen der Standards hergestellt werden. Die Haltbarkeit der Standards kann durch Einfrieren verlängert werden. Bei Bedarf, in festverschlossene silikonisierte Glasröhrchen portionieren, um wiederholtes Einfrieren und Auftauen zu vermeiden.

Erforderliche Laborgeräte und Hilfsmittel

Gammacounter – kompatibel mit 12x75 mm Röhrchen

Wirbelmischer

Reagenzienvorbereitung

Messzylinder: 100 ml

Extraktion

Glaspipetten: 1,0 ml und 6,0 ml

16x125 mm Röhrchen, entsprechende Deckel mit Teflon-Dichtung. Die Röhrchen sollten aus qualitativ hochwertigem Borsilikat-Glas bestehen. (Kein Plastik verwenden.) Um das Risiko einer Kontamination zu vermeiden, sollten nur „vorgereinigte“ Glasgeräte benutzt werden oder eine abschließende Spülung mit 0,1 N HCl gefolgt von Dichlormethan angewendet werden.

Mechanischer Rotator, 15 bis 20 Umdrehungen pro Minute

Absaugeinrichtung

Verdampfer mit Abzug und ein 37°C Heizblock oder Wasserbad

Flüssiger Stickstoff

Ultraschallbad

Dichlormethan (Methylenchlorid) reinst (zur Analyse)

Radioimmunoassay

Unbeschichtete 12x75 mm Polypropylen-Röhrchen – für NSB Röhrchen, erhältlich bei DPC

Mikropipette: 200 µl und 1 000 µl.

Wasserbad — für Inkubation bei 37°C. Heizblock oder Ofen dürfen nicht verwendet werden.

Dekantierständer – erhältlich bei DPC
Logit-Log-Papier – erhältlich bei DPC
(Artikelnummer: ZP797)

DPC Immunoassay-Kontrolle (> 25 Parameter, 3 Konzentrationen)
(Artikelnummer: CON6).

Probengewinnung

Es ist keine besondere Vorbereitung der Patienten nötig. Blutentnahme durch Venenpunktion⁶ in unbeschichtete Röhrchen, Trennung des Serums oder Plasma von den Blutzellen, Abnahmezeitpunkt notieren.

Der Einsatz einer Ultrazentrifuge wird zur Klärung von lipämischen Proben empfohlen.

Lipämische Proben dürfen nicht verwendet werden.

Vor der Extraktion alle Proben auf Raumtemperatur (15–28°C) bringen und durch vorsichtiges Umdrehen oder Wirbeln mischen. Um wiederholtes Einfrieren und Auftauen zu vermeiden bei Bedarf portionieren. Gefrorene Proben dürfen *nicht* durch Erhitzen im Wasserbad aufgetaut werden.

Blutentnahmeröhrchen von verschiedenen Herstellern können differierende Werte verursachen. Dies hängt von den verwendeten Materialien und Additiven (Gel oder physische Trennbarrieren, Gerinnungsaktivatoren und /oder Antikoagulantien) ab. Coat-A-Count DHEA sind nicht mit allen möglichen Röhrchenvariationen ausgetestet worden. Details der getesteten Röhrchenarten sind dem Kapitel "Alternative Probenarten" zu entnehmen.

Erforderliche Menge: 1,0 ml Serum pro Röhrchen.

Lagerung: 2 Tage bei 2–8°C, oder 2 Monate eingefroren bei –20°C.

Probenvorbereitung

Achtung: Dichlormethan (Methylenchlorid) ist ein flüchtiges, leicht entflammbares organisches Lösungsmittel. Das Eindampfen ist unter einem Abzug durchzuführen. Offenes Feuer und das Pipettieren mit dem Mund ist zu

vermeiden. Das Dichlormethan sollte reinst sein (zur Analyse).

Bitte Beachten Sie, dass nur bei Patientenproben und Kontrollen eine Extraktion vor dem Testansatz erforderlich ist.

Keine Extraktion der Kalibratoren!

- 1 Je 1 16x125 mm Glasröhrchen für jede Patientenprobe und Kontrolle beschriften.

Die Röhrchen sollten aus qualitativ hochwertigem Borsilikat-Glas bestehen. (Kein Plastik verwenden.) Um das Risiko einer Kontamination zu vermeiden, sollten nur „vorgereinigte“ Glasgeräte benutzt werden oder eine abschließende Spülung mit 0,1 N HCl gefolgt von Dichlormethan angewendet werden.

- 2 **1,0 ml** von jeder Patientenprobe und Kontrolle in die vorbereiteten Röhrchen pipettieren.

- 3 **Extraktion: 10 ml** Dichlormethan in jedes Röhrchen hinzufügen. Sicher verschließen.

- 4 Mit Hilfe eines mechanischen Rotator für **60 Minuten** mischen.

Eine vorsichtige „über Kopf“ Drehung bei 15 bis 20 Umdrehungen pro Minute ist die Methode der Wahl.

- 5 Für **5 Minuten** bei ca. 1500xg zentrifugieren, um die 2 Phasen zu trennen.

Proben, die danach eine Emulsion zeigen, sollten gut geschüttelt (Wirbelmischer) und erneut zentrifugiert werden

- 6 Die obere wässrige Schicht vorsichtig mit einer Wasserstrahlpumpe entfernen, ohne die Zwischenschicht zu zerstören

Durchstoßen bis in die untere Schicht kann eine Kontamination der Dichlormethan-Schicht mit Resten der Serum-Schicht verursachen.

- 7 **Verdampfen:** Überführung von **6,0 ml** der unteren Schicht (Dichlormethan) in ein gereinigtes Glasröhrchen und Verdampfung bis zur kompletten Trocknung unter vorsichtigem Zufluss von Stickstoff vorsichtig bei 37°C.

- 8 Nach der Trocknung wird der Extrakt mit **0,6 ml** DHEA Puffer (Standard A)

resuspendiert. Mittels Wirbelmischer oder Ultraschallbad vollständig mischen. Fortsetzung des RIA Verfahrens wie unten beschrieben.

Die rekonstituierten Extrakte können bei -20°C gelagert werden. Rekonstituierte Extrakte, die aus Proben mit DHEA Konzentrationen oberhalb des höchsten Standards (30 ng/ml) stammen, können vor der Bestimmung mit dem DHEA Puffer weiter verdünnt werden.

Testansatz und Durchführung

Alle Testkomponenten vor Testbeginn auf Raumtemperatur ($15-28^{\circ}\text{C}$) bringen. Standards B – G und der DHEA Puffer (Standard A) sind gebrauchsfertig. Nur Patientenproben und Kontrollen müssen der oben beschriebenen Extraktion unterzogen werden.

- 1 Unbeschichtete Röhrchen:** Jeweils 2 unbeschichtete 12x75 mm Polypropylen-Röhrchen mit T (Totalaktivität) und NSB (unspezifische Bindung) beschriften.

Da die unspezifische Bindung im Coat-A-Count RIA normalerweise niedrig ist, hat sie keinen signifikanten Einfluss auf die Messwerte. Es kann deshalb auch auf das Mitführen der NSB-Röhrchen verzichtet werden.

Beschichtete Röhrchen: Jeweils 2 Antikörper-beschichtete DHEA Röhrchen mit A (maximale Bindung, 0-Standard) und von B bis G beschriften. Jeweils 2 weitere Antikörper-beschichtete Röhrchen für Kontrollen und Patientenproben beschriften.

Standard	ng/ml	nmol/l
A (MB)	0	0
B	0,5	1,7
C	1,0	3,5
D	2,5	8,7
E	5,0	17,3
F	10	34,7
G	30	104

- 2 200 μl** des 0-Standards A (DHEA Puffer) in die NSB und A Röhrchen pipettieren und **200 μl** der nicht 0-Standards in die B – G Röhrchen pipettieren. **200 μl** der Kontrollen und

Patientenproben in die vorbereiteten Röhrchen pipettieren. **Direkt auf den Boden des Röhrchens pipettieren.**

Rekonstituierte Extrakte, die aus Proben mit DHEA Konzentrationen oberhalb des höchsten Standards (30 ng/ml), können vor der Bestimmung mit dem DHEA Puffer weiter verdünnt werden.

Es ist gute Laborpraxis Pipetten mit Einmalspitzen zu verwenden und die Spitze von Probe zu Probe zu wechseln, um Verschleppung zu vermeiden.

- 3 1,0 ml ^{125}I DHEA** in jedes Röhrchen hinzufügen. Mischen.

Das Verteilen des Tracers sollte nicht länger als 10 Minuten dauern. Die T-Röhrchen bis zur Messung (siehe Schritt 6) beiseite stellen; sie bedürfen keiner weiteren Behandlung.

- 4 Für 2 Stunden bei 37°C** inkubieren.

- 5 Vollständig dekantieren.**

Vollständiges Entfernen der Flüssigkeit verbessert die Präzision deutlich. Mit Hilfe eines Dekantierständers alle Röhrchen (außer die T-Röhrchen) dekantieren oder absaugen und 2–3 Minuten umgedreht stehen lassen. Anschließend werden die Röhrchen kräftig auf Fließpapier ausgeklopft, um alle restlichen Tröpfchen zu entfernen.

- 6 Alle Röhrchen 1 Minute** im Gamma-Counter messen.

Berechnung der Ergebnisse

Um die Konzentrationen aus der Logit-Log Darstellung der Standardkurve abzulesen werden zunächst der Mittelwert der zwei Röhrchen, bereinigt um den Mittelwert der NSB Counts pro Minute (cpm), berechnet:

Netto Counts = (Mittelwert CPM) minus (Mittelwert **NSB** CPM)

Anschließend wird die Bindung jedes Röhrchenpaars als Prozent der Maximalbindung (MB, B0) bestimmt. Hierzu werden die mittleren CPM des A-Standards, korrigiert um die mittlere NSB, als 100% gesetzt:

Prozentbindung = (Netto Counts / Netto **MB** Counts) $\times$ 100

(Die Berechnung kann durch Weglassen der Korrektur um die NSB vereinfacht werden. Für Proben innerhalb des Standardbereichs werden nahezu identische Konzentrationen berechnet, wenn B/B0 direkt aus den CPM ermittelt wird.)

Die so ermittelten B/B0 aller Standards, außer des 0-Standards, werden auf der y-Achse auf Logit-Log Papier gegen die Konzentration auf der x-Achse (logarithmisch) aufgetragen. Die Punkte werden mit bestmöglicher Annäherung durch eine gerade Linie verbunden. Die Ergebnisse der unbekannten Proben können dann durch Interpolation an der Kurve abgelesen werden.

Es ist gute Laborpraxis die Ergebnisse der Doppelbestimmung auf Übereinstimmung zu prüfen und eine Grafik der Standardkurve darzustellen (auch wenn die eigentliche Berechnung durch ein Computerprogramm erfolgt), um visuell zu prüfen, ob für die Standardkurve die geeignete Transformation verwendet wurde, und um eventuell abweichende Standardkurvenpunkte zu entdecken. Es wird weiterhin empfohlen, folgende Parameter der Berechnung zu protokollieren:

T = Totalaktivität (als Counts pro Minute)

%NSB = $100 \times (\text{Mittelwert NSB Counts} / \text{Total Counts})$

%MB = $100 \times (\text{Netto Counts} / \text{Total Counts})$

und die 20, 50 und 80 Prozent "intercepts," wobei

20% = Konzentration bei 20 Prozent Bindung, etc.

Bitte beachten Sie, dass auch andere Auswertungen z. B. nach der 4-Parameter-Logistik akzeptabel sind. Siehe: Dudley RA, et al. Guidelines for immunoassay data reduction. Clin Chem 1985;31:1264-71.

Auswertebeispiel: Dieses Beispiel dient nur zur Veranschaulichung und ist nicht dazu geeignet Werte aus einem anderen Testansatz damit zu ermitteln. (siehe Tabelle "Example Run").

Qualitätskontrolle

Es wird empfohlen Kontrollen mit mindestens 2 DHEA Konzentrationen

(niedrig und hoch) routinemäßig als unbekannte Proben einzusetzen.

Patientenergebnisse dürfen nur dann freigegeben werden, wenn die laborspezifischen Akzeptanzkriterien erfüllt sind. Hierzu sind die jeweils gültigen Richtlinien zu berücksichtigen.

Es ist gute Laborpraxis die Chargennummern, sowie das Datum der ersten Öffnung bzw. Rekonstitution der verwendeten Komponenten zu protokollieren. Die wiederholte Messung von Proben kann bei der Beurteilung der Interassay Präzision hilfreich sein. Der Einsatz von Kontrollprobenpaaren an unterschiedlichen Positionen des Testansatzes ist hilfreich, um einen eventuellen Drift zu erkennen.

Lösungsmittel Blank:

Um exakte Resultate zu erzielen, sollte das Dichlormethan mindestens den Reinheitsgrad "Für die Spektroskopie" haben. Der zum Begasen verwendete Stickstoff darf die Proben nicht mit Öl oder Feuchtigkeit kontaminieren. (Die Verwendung einer Calciumsulfat-Falle hilft, solche Kontaminationen zu vermeiden.) Es wird empfohlen mit einem „Lösungsmittel-Blank“ die Reinheit der verwendeten Reagenzien routinemäßig zu überprüfen. Hierzu wird destilliertes oder steriles Wasser in der für Patientenproben beschriebenen Extraktionsprozedur eingesetzt. Die in den so behandelten Proben gemessene DHEA Konzentration muss faktisch 0 sein und damit unterhalb der unteren Nachweisgrenze des Assays gemessen werden.

Referenzwerte

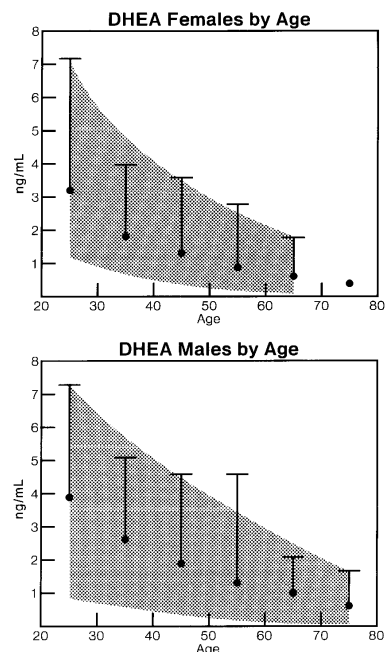
Mit dem Coat-A-Count DHEA Verfahren wurde eine vorläufige Referenzbereich-Studie mit 33 Gesunden, darunter 19 Frauen und 14 Männer, durchgeführt. Die Ergebnisse reichen von 0,2 bis 9,8 ng/ml mit einem Median von 2,5 ng/ml. 91% der Ergebnisse lagen unterhalb von 6,0 ng/ml. Es ist hierbei zu beachten, dass diese Ergebnisse mit dem empfohlenen Probentyp Serum gewonnen wurden.

Eine weitere Studie wurde mit 136 Frauen und 155 Männern bekannten Alters an einem großen Krankenhaus durchgeführt. Die Ergebnisse, um Geschlecht und Alter korrigiert, sind der Tabelle und Grafik

dargestellt (s.u.). In den Grafiken bilden die Kreise den Median (50.%ile) ab, während die „T“-Balken die 95. %tile abbilden. Die Schattierung repräsentiert eine Glättung der beobachteten 5. und 95. %tile, entsprechend einem einfachen Verhaltensmodell des DHEA im Blutstrom als eine Funktion des Alters.

Frauen				
Altersgruppe	n	5. %ile	50. %ile	95. %ile
10–19	2	—	3,2	—
20–29	23	1,1	1,6	7,2
30–39	29	0,55	1,3	4,0
40–49	29	0,40	0,85	3,6
50–59	18	0,3	0,7	2,8
60–69	21	0,1	0,3	1,8
70–79	8	0,1	0,25	1,5
80–89	6	—	—	—

Männer				
Altersgruppe	n	5. %ile	50. %ile	95. %ile
10–19	6	—	1,1	—
20–29	17	1,0	3,9	7,3
30–39	21	0,75	2,6	5,1
40–49	23	0,7	1,9	4,6
50–59	29	0,55	1,7	4,6
60–69	37	0,4	1,0	2,1
70–79	18	0,1	0,6	1,7
80–89	4	—	0,3	—



DHEA Females by Age: DHEA, Frauen nach Alter. DHEA Males by Age: DHEA, Männer nach Alter.

Diese Grenzwerte sind *lediglich als Richtlinien* aufzufassen. Jedes Labor sollte seine eigenen Referenzbereiche etablieren.

Leistungsdaten

Im folgenden Abschnitt werden repräsentative Leistungsdaten des DHEA Coat-A-Count RIA gezeigt. Die Ergebnisse sind in ng/ml angegeben. Seitdem die Molekulare Masse des DHEA von 288,4 Daltons bekannt ist, erfolgt die Umrechnung in S.I. Einheiten (nmol/l) durch Multiplikation mit 3,467:

Umrechnungsfaktor:

ng/ml $\times$ 3,467 $\rightarrow$ nmol/l

Messbereich: 0,5 – 30 ng/ml

(1,7 – 104 nmol/l)

Analytische Sensitivität: 0,04 ng/ml

Intraassay Precision (Within-Run)

Statistische Berechnung der Ergebnisse von Proben, die in 20 Röhrchenpaaren in einem Ansatz gemessen wurden. (Siehe Tabelle „Intraassay-Precision“.)

Interextraktion: Statistische Berechnung von 3 Proben, welche jeweils 20 mal extrahiert und dann mit dem Coat-A-Count DHEA Verfahren bestimmt wurden (Siehe Tabelle "Interextraktion").

Spezifität: Das Verfahren ist hochspezifisch mit relativ niedrigen Kreuzreaktivitäten zu anderen natürlich vorkommenden Steroiden oder therapeutischen Medikamenten. In diesem Experiment wurden extrahierte Proben, im 0-Standard gelöst, verwendet, mit Ausnahme der gekennzeichneten Präparate (*), welche unextrahiert und in 0-Standard gelöst bestimmt wurden. (siehe Tabelle „Spezifität“.)

Linearität: Proben wurden in verschiedenen Verdünnungen getestet. (Siehe Tabelle "Linearity".)

Wiederfindung 1: Proben wurden 1:19 mit 3 DHEA Lösungen (50, 100 und 200 ng/ml) versetzt und gemessen. (Siehe Tabelle "Recovery 1".)

Wiederfindung 2: In einem Experiment, wurden 3 weitere Lösungen (D, E und F) mit Konzentrationen von 100, 200 und 400 ng/ml vorbereitet. Die erwarteten Werte wurden errechnet, indem 95% der Werte aus den versetzten Proben zu 5% der zugesetzten Lösung gerechnet wurden (entsprechend 5, 10 und 20 ng/ml). (Siehe Tabelle "Recovery 2".)

Bilirubin: Bilirubin hat in Konzentrationen bis zu 200 mg/l keinen Einfluss auf die Ergebnisse, der größer als die Impräzision des Assays selbst ist.

Lipämie: Es wurde nachgewiesen, dass eine deutliche Chylomikronämie einige Immunoassays stören kann. Diese Störung kann vermieden werden, indem die klare Zwischenschicht vor der Bestimmung entfernt wird. Um dies manuell zu erreichen, wird die lipämische Probe in eine Pipette gezogen und Spitze mit Parafilm abgedichtet. Nun die Pipette stehen lassen, bis sich die Lipide oben absetzen. Anschließend kann man die klare Schicht abfließen lassen und untersuchen. Alternativ kann eine Ultrazentrifugation erfolgen. (Ein störender Einfluss anderer Typen von Lipämie ist nicht bekannt)

Alternativer Probentyp: Um die Auswirkungen von verschiedenen Probenarten zu untersuchen, wurde Blut

von 33 Freiwilligen in Röhrchen ohne Additiva, in Heparin- und EDTA-Vacutainer-Röhrchen gesammelt. Alle Proben wurden mit dem Coat-A-Count DHEA Assay mit den nachfolgend aufgeführten Ergebnissen bestimmt.

(Heparin) = $0,84 \text{ (Serum)} + 1,0 \text{ ng/ml}$
 $r = 0,90$

(EDTA) = $0,92 \text{ (Serum)} + 0,2 \text{ ng/ml}$
 $r = 0,95$

Mittelwerte:
3,8 ng/ml (Heparin)
3,4 ng/ml (Serum)
3,4 ng/ml (EDTA)

Die Serumwerte lagen bei 0,2 bis 13,7 ng/ml. Beide, Heparin und EDTA Plasma, zeigten eine Variabilität – d. h. Diskrepanzen bezogen auf Ergebnisse in Serumproben von den gleichen Personen – die größer als die Variabilität war, die in einer Interextraktions-Präzisionsstudie beobachtet wurde. Basierend auf dieser Beobachtung, wird empfohlen für diesen Assay Serum zu verwenden.

Methodenvergleich: Das Coat-A-Count DHEA Testbesteck wurde mit einem anderen kommerziell erhältlichen DHEA Radioimmunoassay anhand von 90 Patientenseren verglichen. Die Statistiken unterhalb zeigen eine gute Korrelation zwischen den beiden Methoden.

(CAC) = $1,17 \text{ (Kit A)} + 0,26 \text{ ng/ml}$
 $r = 0,94$

Mittelwerte:
2,0 ng/ml (Coat-A-Count)
1,5 ng/ml (Kit A)

Einfluss von freien Fettsäuren: Um den Effekt von nicht-veresterten Fettsäuren(NEFA) zu testen, wurden Aliquots von 3 Proben lyophilisiert, wieder rekonstituiert und dann im Coat-A-Count DHEA –RIA getestet. Wässrige Lösungen, die 0, 2,5, 5, und 10 mmol/L Ölsäure enthielten wurden für die Rekonstitution verwendet. Die Ergebnisse zeigen, dass Ölsäure – in physiologisch hohen Konzentrationen – einen signifikanten *in vitro* Effekt bei diesem Verfahren aufweist.

Protein-Einfluss: Um unterschiedliche Proteinkonzentrationen zu simulieren, wurden 1,0 ml Portionen eines Humanserum-Pools gefriergetrocknet und anschließend in unterschiedlichen Volumina Wasser (0,5/ 0,67/ 1,0/ 1,5 und 2 ml) rekonstituiert. Jede rekonstituierte Portion wurde im DHEA Coat-A-Count RIA

gemessen. Es ist zu beachten, dass Portionen, die mit der Hälfte des Originalvolumens aufgelöst wurden, eine extrem hohe Proteinkonzentration, in der Größenordnung von 14 g/dl, aufweisen. (Der Korrekturfaktor für das Rekonstitutionsvolumen ist unten tabellarisch aufgeführt). Die Ergebnisse zeigen, dass sehr geringe Proteinkonzentrationen einen signifikanten Einfluss auf die Coat-A-Count DHEA Bestimmung haben können. (siehe Tabelle „Protein-Einfluss“.)

Anwendungsberatung

Bei Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihre DPC Niederlassung.

Das Qualitätssystem der Diagnostic Products Corporation ist nach ISO 13485:2003 registriert.

Español

Coat-A-Count DHEA

Utilidad del análisis: Coat-A-Count DHEA es un radioinmunoensayo diseñado para la determinación cuantitativa de dehidroepiandrosterona (DHEA) en suero. Está diseñado estrictamente para uso diagnóstico *in vitro*.

Referencia: **TKDH1** (75 tubos), **TKDH2** (150 tubos).



El estuche de 75 tubos contiene menos de 5 microcurios (185 kilobecquerelios) de ¹²⁵I DHEA, y el estuche de 150 tubos contiene menos de 10 microcurios (370 kilobecquerelios).

Resumen y Explicación del Test

La dehidroepiandrosterona (DHEA) es un esteroide adrenal que a menudo circula a una concentración elevada en los casos de crecimiento anormal del vello corporal (hirsutismo) y en la virilización. Su medición también puede ser útil en la evaluación de la adrenarquía y la pubertad retrasada.

La DHEA en la circulación se origina casi completamente de las glándulas suprarrenales. Si bien es producida a una tasa un poco menor que el sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEA-SO₄), con

la cual es periféricamente interconvertible, la DHEA tiene una vida útil mucho más corta y su concentración en plasma es casi mil veces menor. En sí misma, la DHEA sólo es débilmente androgénica, pero puede servir como un precursor de andrógenos más potentes.

Los niveles plasmáticos de DHEA aumentan en forma constante desde aproximadamente el séptimo año de vida, y luego declinan gradualmente después de los treinta años. De acuerdo con la literatura, el límite de referencia superior para los adultos jóvenes es de aproximadamente 10 ng/ml. Al igual que el cortisol, la DHEA exhibe variaciones diurnas, con una concentración mayor por la mañana. Por otra parte, no muestra una variación significativa durante el ciclo menstrual, y hay una disminución moderada durante el embarazo. A diferencia de la testosterona, la DHEA no circula unida a la globulina que se une a la hormona sexual, y por lo tanto no está influenciada por las alteraciones en el nivel de esta proteína transportadora.

Principio del análisis

El procedimiento Coat-A-Count DHEA es un inmunoensayo competitivo basado en tubos recubiertos con anticuerpos. Las muestras de los pacientes primero se extraen con diclorometano, se evaporan hasta estar secas y se resuspenden en el calibrador cero. La DHEA marcada con ¹²⁵I compete con la DHEA de los extractos del paciente por los sitios de unión en los anticuerpos. Después de decantar y contar los tubos, las concentraciones de DHEA se leen directamente de una curva de calibración.

Reactivos a pipetear: 1

Tiempo total de incubación: 2 horas

Cuentas totales en la iodización: aproximadamente 100 000 cpm

Advertencias y precauciones

Para uso diagnóstico *in vitro*.

Reactivos: Almacenar a 2–8°C en una cámara preparada para almacenar material radiactivo. Desechar de acuerdo a la legislación en vigor.

No usar los reactivos después de su fecha de caducidad.

Algunos componentes suministrados en el kit pueden contener material de origen humano y/o otros componentes potencialmente peligrosos que necesitan ciertas precauciones.

Siga las precauciones universales y manipule todos los componentes como si fueran capaces de transmitir agentes infecciosos. Los materiales derivados de sangre humana han sido analizados y son negativos para sífilis; para anticuerpos frente al VIH 1 y 2; para el antígeno de superficie de hepatitis B y para los anticuerpos de hepatitis C.

Se ha usado Azida sódica, en concentraciones menores de 0,1 g/dl, como conservante. Para su eliminación, lavar con grandes cantidades de agua para evitar la constitución de residuos de azidas metálicas, potencialmente explosivas, en las cañerías de cobre y plomo.

Agua: Usar agua destilada o desionizada.

Radiactividad

Una copia de cualquier certificado de licencia de radioisótopos (específico o general) emitido a la aduana de los EE.UU. se registrará en los ficheros de Diagnostic Products Corporation antes de que se puedan enviar kits o componentes conteniendo material radiactivo. Estos materiales radiactivos pueden adquirirse por cualquier cliente con la licencia específica apropiada. Con una licencia general, estos materiales radiactivos pueden adquirirse solo por médicos, veterinarios en la práctica de la medicina veterinaria, laboratorios clínicos y hospitales — y estrictamente para la clínica *in vitro* o tests de laboratorio que no conlleven la administración interna o externa de material radiactivo o su radiación a humanos u otros animales. Su adquisición, recepción, almacenaje, uso, transferencia y desecho están regulados y se expenderá una licencia (general o específica) de la Comisión Nuclear de EE.UU. o de un Estado con el NRC para su consiguiente control.

Manejar los materiales radiactivos de acuerdo a los requerimientos de su licencia general o específica. Para minimizar la exposición a la radiación, el usuario debe adherirse al cuarto conjunto de guías publicadas por el National

Bureau of Standards con el nombre *Safe Handling of Radioactive Materials* (Handbook No. 92, issued March 9, 1964) y en las consiguientes publicaciones de las autoridades Federales o Estatales.

Limpiar y descontaminar rápidamente las superficies afectadas. Evitar la generación de aerosoles. Eliminar los residuos sólidos radiactivos de acuerdo con los requerimientos de su licencia. Licencias generales (NRC Form 483) pueden eliminar sus residuos sólidos radiactivos como residuos no radiactivos, después de retirar las etiquetas. Licencias específicas (NRC Form 313) se deben referir al Título 10, Código de Regulaciones Federales, Parte 20. Las licencias en Estados Asociados deben referirse a las normativas de su correspondiente Estado. Licencias generales pueden eliminar sus residuos líquidos radiactivos contenidos en este tipo de productos como cualquier otro material líquido, quitando las etiquetas de los contenedores y procesándolos como residuos sólidos. Licencias específicas pueden eliminar pequeñas cantidades de residuos líquidos radiactivos contenidos en este tipo de productos como cualquier otro material líquido. Refiérase a la normativa aplicable a su laboratorio.

Materiales Suministrados: Preparación Inicial

Tubos Recubiertos de DHEA Ab (TDH1)

Tubos de polipropileno recubiertos con anticuerpos de DHEA y envasados en bolsas con cierre. Almacenar refrigerados y protegidos de la condensación, cerrando cuidadosamente las bolsas después de su uso. Estable a 2–8°C hasta la fecha de caducidad impresa en la bolsa. Color: beige.

TKDH1: 75 tubos. **TKDH2:** 150 tubos.

¹²⁵**I DHEA (TDH2)**

DHEA yodada liofilizada. Reconstituir cada frasco con **80 ml** de agua destilada. Estable a 2–8°C durante 30 días después de reconstituir o hasta la fecha de caducidad señalada en el frasco. No transfiera el trazador a un depósito de plástico.

TKDH1: 1 vial. **TKDH2:** 2 viales.

Solución Amortiguadora DHEA (DHC3)

100 ml de solución amortiguadora suministrada en forma líquida y lista para usar. Se la emplea para resuspender los extractos y también sirve como calibrador cero (Calibrador A). Guardar la solución amortiguadora tapada. Estable a 2–8°C durante 30 días después de su apertura.

TKDH1: 1 vial. TKDH2: 1 vial.

Calibradores DHEA (DHC4–9)

Un juego de seis viales, marcados B a G, con distintos niveles de DHEA en la misma matriz utilizada para la solución amortiguadora DHEA. Cada vial contiene 3,0 ml. Estables a 2–8°C durante 30 días después de su apertura.

TKDH1: 1 juego. TKDH2: 1 juego.

Los calibradores representan, respectivamente, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10 y 30 nanogramos de DHEA por mililitro (ng/ml); equivalentemente 1,7, 3,5, 8,7, 17,3, 34,7 y 104 nanomoles por litro (nmol/l). Los puntos de calibración intermedios se pueden obtener mezclando los calibradores en las proporciones adecuadas. La vida de los calibradores se puede extender por congelación. Si es necesario, alicuotar en tubos de *vidrio* siliconados y bien tapados para evitar descongelar y congelar en forma repetida.

Materiales Requeridos pero no suministrados

Contador Gamma – compatible con tubos de 12 x 75 mm.

Vortex

Preparación de los Reactivos

Probeta graduada para 100 ml

Extracción

Pipetas de vidrio: 1,0 ml y 6,0 ml

Tubos de 16 x 125 mm con tapas forradas con Teflón. Los tubos deberán ser de vidrio de borosilicato de alta calidad. (No usar plástico). Para evitar el riesgo de contaminación, usar material de vidrio “prelavado” o dar un enjuague final con HCl 0,1 N seguido por diclorometano.

Rotador mecánico, capaz de generar 15–20 revoluciones por minuto.

Aspirador

Evaporador con campana para gases y bloque calefactor o baño de agua a 37°C.

Nitrógeno comprimido

Baño ultrasónico

Diclorometano (cloruro de metileno) de por lo menos calidad espectrofotométrica.

Radioinmunoanálisis

Tubos de polipropileno limpios de 12 x 75 mm – para usar como tubos NSB, disponibles en DPC.

Micropipetas con puntas desechables: 200 µl y 1 000 µl.

Baño María – capaz de mantener 37°C – Ni un horno o parrilla son apropiados.

Gradilla de espuma – disponible en DPC

Papel para gráficos Logit-log — disponible en DPC (Referencia: ZP797)

Control de tres niveles con base de suero humano de tres niveles, que contiene DHEA junto con más de otros 25 analitos (Referencia: CON6), disponible en DPC.

Recogida de la muestra

El paciente no necesita estar en ayunas así como tampoco cualquier otro tipo de preparación. Recoger la sangre por venipunción^o en tubos no tratados, y separar el suero de las células registrando la hora en que se tomó la muestra.

Antes de la extracción, permitir que las muestras lleguen a temperatura ambiente (15–28°C), y mezclar con movimientos circulares o por inversión *suave*. Alicuotar, si es necesario, para evitar la repetición de congelación y descongelación. *No* intentar la descongelación de muestras congeladas calentándolas en un baño de agua.

Se recomienda el uso de una ultracentrífuga para aclarar las muestras lipémicas.

No se debe usar muestras lipémicas.

Los tubos para recoger sangre de distintos fabricantes pueden producir valores diferentes, dependiendo del material del tubo y de los aditivos, incluyendo barreras de gel o barreras físicas, activadores de la coagulación y/o anticoagulantes. El DHEA Coat-A-Count no ha sido analizado con todos los distintos tipos de tubos. Para obtener detalles sobre los tipos tubos que se han

analizado, consulte la sección de Tipos de Muestras Alternativos.

Volumen requerido: 1,0 ml suero por tubo.

Conservación: 2 días a 2–8°C o 2 meses congelado a –20°C.

Preparación de la muestra

Cuidado: El diclorometano (cloruro de metileno) es un solvente orgánico inflamable y volátil. Realizar el paso de evaporación debajo de una campana para gases. Evitar la exposición a flama y no pipetear con la boca. El diclorometano debe ser por lo menos de calidad espectrofotométrica.

Note que sólo las muestras de pacientes y los controles requieren extracción antes del ensayo. *No extraiga los calibradores.*

- 1 Marque un tubo de vidrio de 16 x 125 mm para cada muestra de paciente y control.

Los tubos deberán ser de vidrio de borosilicato de alta calidad. (No usar plástico). Para evitar el riesgo de contaminación, usar material de vidrio “prelavado” o dar un enjuague final con HCl 0,1 N seguido por diclorometano.
- 2 Pipetear **1,0 ml** de cada muestra del paciente y control en los tubos preparados.
- 3 **Extracción:** Añadir **10 ml** de diclorometano a cada tubo. Tapar bien.
- 4 Mezclar por inversión, usando un rotador mecánico durante **60 minutos**.

El método preferido es la rotación suave a 15–20 revoluciones por minuto.
- 5 Centrifugar durante **5 minutos** a 1500 xg aproximadamente para separar las dos fases.

Se deberá agitar vigorosamente y centrifugar nuevamente cualquier muestra que esté parcialmente emulsificada.
- 6 Quitar la *mayor* parte de la capa superior, teniendo cuidado de no interferir con la interfase.

Utilizar un aspirador de agua corriente. (Si se aspira toda la capa

superior hasta la interfase, la capa de diclorometano puede contaminarse con material de la fase sérica con la que está en contacto).

- 7 **Evaporación:** Transferir **6,0 ml** de la fase inferior (diclorometano) a un tubo de vidrio limpio y evaporar bajo un chorro suave de nitrógeno a 37°C hasta que esté totalmente seco.
- 8 Una vez secos, resuspender los extractos con **0,6 ml** de solución amortiguadora DHEA (Calibrador A). Mezclar en Vortex o sonicar completamente. Continuar con el procedimiento de radioinmunoensayo descrito a continuación.

Los extractos reconstituidos pueden guardarse a –20°C. Los extractos reconstituidos preparados de muestras con concentraciones de DHEA mayores que la del calibrador más alto (30 ng/ml), se pueden diluir aún más con la solución amortiguadora DHEA antes del ensayo.

Procedimiento del Radioinmunoanálisis

Todos los componentes deben llevarse a temperatura ambiente (15–28°C) antes de su uso. Los calibradores B a G y la Solución Amortiguadora DHEA (Calibrador A) están listos para usar. Solo las muestras de pacientes y los controles deben someterse al procedimiento de extracción descrito anteriormente.

- 1 **Tubos de ensayo:** Marcar cuatro tubos de ensayo de polipropileno (sin recubrir) 12 x 75 mm. Tubos T (cuentas totales) y NSB (unión no específica), por duplicado.

Al ser la unión no específica en el ensayo Coat-A-Count característicamente baja, los tubos NSB pueden ser omitidos sin comprometer la precisión y el control de calidad del ensayo.

Tubos recubiertos: Marcar catorce tubos recubiertos con anticuerpo anti-DHEA: A (máxima unión) y B a G por duplicado. Marcar tubos adicionales recubiertos con anticuerpo, también por duplicado, para los controles y las muestras de pacientes.

Calibrador	ng/ml	nmol/l
A (MB)	0	0
B	0,5	1,7
C	1,0	3,5
D	2,5	8,7
E	5,0	17,3
F	10	34,7
G	30	104

- 2** Pipetear **200 µl** del calibrador cero A (Solución Amortiguadora DHEA) en los tubos NSB y A, y **200 µl** de cada calibrador no cero en los tubos marcados B a F. Pipetear **200 µl** de cada control y muestra del paciente en los tubos preparados. **Pipetear directamente en el fondo del tubo.**

Los extractos reconstituidos preparados de muestras con concentraciones de DHEA mayores que la del calibrador más alto (30 ng/ml) pueden ser diluidos aún más con la Solución Amortiguadora DHEA antes del ensayo.

Es una buena práctica el uso de micropipetas con punta desechables, cambiando las puntas entre las muestras, para evitar la contaminación por arrastre.

- 3** Añadir **1,0 ml** de ^{125}I DHEA a todos los tubos. Mezclar en el Vortex.
No se debe tardar más de 10 minutos durante la dispensación del trazador. Dejar los tubos T a un lado para su conteo (paso 6); no requieren más procesamiento posterior.
- 4** Incubar durante **2 horas a 37°C.**
- 5** Decantar.
Eliminar toda la humedad visible para mejorar la precisión. Decantar el contenido de todos los tubos (excepto los tubos T) y dejar escurrir durante 2 o 3 minutos. Golpear los tubos contra papel absorbente para eliminar las gotas residuales.
- 6** Contar durante **1 minuto** en un contador gamma.

Cálculo de resultados

Para obtener resultados en términos de concentración a partir de una representación logit-log de la curva de

calibración, primero hay que calcular para cada pareja de tubos las cuentas medias por minuto corregidas con el NSB:

Cuentas netas = (Media CPM) menos (Media **NSB** CPM)

Entonces, determinar la unión de cada pareja de tubos como un porcentaje de la unión máxima (MB), tomando las cuentas corregidas con el NSB de los tubos A como 100%:

Porcentaje de Unión = (Cuentas netas / Cuentas **MB** netas) × 100

(El cálculo puede simplificarse omitiendo la corrección de las uniones no específicas; las muestras dentro del rango de calibración van a dar virtualmente el mismo resultado cuando el porcentaje de unión es calculado directamente a partir de la media de las CPM).

Usando papel gráfico logit-log, representar el porcentaje de unión en el eje vertical frente a la concentración en el eje horizontal (logarítmico) para cada calibrador no cero y trazar la línea que pase por esos puntos aproximadamente. Los resultados de las muestras pueden ser leídos en la curva por interpolación.

Es una buena práctica inspeccionar los resultados para comprobar la concordancia entre los replicados, y realizar una gráfica de la curva de calibración (aunque los cálculos se realicen por ordenador) para ver la transformación más apropiada a usar y las posibles desviaciones en los puntos de calibración. También, recomendamos mantener un registro de los siguientes parámetros de la reducción de datos:

T = Cuentas totales (como cuentas por minuto)

%NSB = $100 \times (\text{Media cuentas NSB} / \text{cuentas totales})$

%MB = $100 \times (\text{Cuentas netas} / \text{Cuentas totales})$

Y los cortes 20, 50 y 80 por ciento, donde

20% = Concentración al 20 por ciento de unión, etc.

Otras aproximaciones, por ejemplo, logística 4-parámetros, también son aceptables. Ver Dudley RA, et al. "Guidelines for immunoassay data reduction". Clin Chem 1985;31:1264-71.

Ejemplo: Sólo como ilustración, no se puede utilizar para calcular resultados. (Ver la tabla "Example Run").

Control de Calidad

Los controles o pools de suero con cuando menos dos concentraciones de DHEA – baja y alta – deberán sujetarse a ensayo rutinariamente como incógnitos.

Informar los resultados de los pacientes sólo si los resultados de los controles para este ensayo están dentro de los criterios de aceptabilidad establecidos por su laboratorio.

Es una buena práctica de laboratorio registrar para cada ensayo los números de lote de los componentes usados, así como las fechas en las que fueron abiertos por primera vez y reconstituidos. También recomendamos el uso de gráficos diarios de los controles — como se describe, por ejemplo, en Westgard JO, et al. A multi-rule chart for quality control. Clin Chem 1981;27:493-501. Las muestras repetidas pueden servir como una herramienta de valor adicional para monitorizar la precisión interensayo, y las parejas de los tubos del control pueden espaciarse a lo largo de la tanda de ensayo para verificar la ausencia de deriva significativa.

Blancos del solvente:

Para que los resultados sean confiables, el diclorometano debe ser para uso espectrofotométrico y la fuente de nitrógeno, de usarse, no debe contaminar los tubos de evaporación con aceite o humedad. (El uso de una trampa con sulfato de calcio ayudará a evitar dicha contaminación). Como un control de la pureza de estos reactivos, recomendamos el uso periódico de un "blanco de solvente". Esto implica extraer y analizar agua destilada o estéril, de la manera indicada para las muestras de los pacientes, para verificar que dé una concentración aparente de DHEA igual o por debajo del límite de detección del análisis.

Valores esperados

Se realizó un estudio preliminar del intervalo de referencia con el procedimiento Coat-A-Count DHEA en muestras de suero de 33 voluntarios

adultos sanos, incluidos 14 mujeres y 14 hombres. Los resultados variaron de 0,2 a 9,8 ng/ml, con un valor medio de 2,5 ng/ml. El noventa y un por ciento de los resultados fueron más bajos de 6,0 ng/ml. Note que estos resultados se obtuvieron para el tipo recomendado de muestra, concretamente suero.

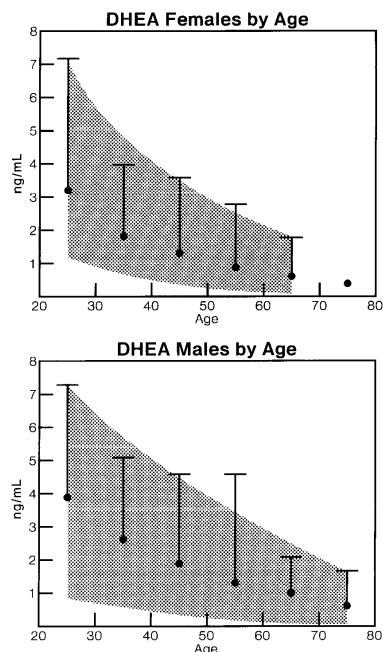
Otro estudio del intervalo de referencia se realizó en un hospital del noroeste en 136 mujeres y 155 hombres, todos de edad conocida. Los resultados, divididos por sexo y edad, se resumen en la tabla y los gráficos que se dan a continuación. En los gráficos, los círculos llenos representan las medianas (percentilos 50), mientras que las barras "T" representan percentilos 95. El área sombreada representa un alisamiento de los percentilos 5 y 95 observados de acuerdo a un modelo simple del comportamiento de la DHEA circulante en función de la edad.

Mujeres

Grupo de edad	n	percentil o 5	percentil o 50	percentil o 95
10–19	2	—	3,2	—
20–29	23	1,1	1,6	7,2
30–39	29	0,55	1,3	4,0
40–49	29	0,40	0,85	3,6
50–59	18	0,3	0,7	2,8
60–69	21	0,1	0,3	1,8
70–79	8	0,1	0,25	1,5
80–89	6	—	—	—

Hombres

Grupo de edad	n	percentil o 5	percentil o 50	percentil o 95
10–19	6	—	1,1	—
20–29	17	1,0	3,9	7,3
30–39	21	0,75	2,6	5,1
40–49	23	0,7	1,9	4,6
50–59	29	0,55	1,7	4,6
60–69	37	0,4	1,0	2,1
70–79	18	0,1	0,6	1,7
80–89	4	—	0,3	—



DHEA Mujeres según edad. DHEA Males by Age: DHEA Varones según edad.

Estos límites han de considerarse *sólo como una guía*. Cada laboratorio deberá establecer sus propios intervalos de referencia.

Características analíticas

Para obtener datos *representativos* del rendimiento del kit Coat-A-Count DHEA, ver la sección Tablas y Gráficos. Los resultados de DHEA en las secciones de abajo están expresados en nanogramos por mililitro (ng/ml). Debido a que el peso molecular de la DHEA es 288,4 daltons, para convertir a unidades S.I. – nanomoles por litro (nmol/l) – multiplicar por 3,467:

Factor de Conversión:

ng/ml $\times$ 3,467 $\rightarrow$ nmol/l

Intervalo de calibración: 0,5 – 30 ng/ml (1,7 – 104 nmol/l)

Sensibilidad analítica: 0,04 ng/ml

Precisión intraensayo (dentro de una tanda): Las estadísticas se calcularon para las muestras a partir de los resultados de 20 pares de tubos en una

tanda. (Ver la tabla "Intraassay Precision").

Interextracción: Se calcularon valores estadísticos para tres muestras que fueron extraídas individualmente veinte veces y luego analizadas con el kit Coat-A-Count DHEA. (Ver la tabla de "Interextraction").

Especificidad: El kit es altamente específico para DHEA, con una reactividad cruzada extremadamente baja para otros esteroides naturales o fármacos terapéuticos que pueden estar presentes en las muestras de los pacientes. Para este experimento, se utilizaron muestras extraídas disueltas en el calibrador cero, con la excepción de los compuestos marcados con asterisco (*), los cuales se analizaron sin extraer y disueltos en el calibrador cero. (Ver la tabla "Specificity" para resultados representativos).

Linealidad: Las muestras fueron analizadas con varias diluciones. (Ver La tabla "Linearity").

Recuperación 1: Se han analizado las muestras cargadas 1 a 19 con tres soluciones de DHEA (50, 100 y 200 ng/ml) (Ver la tabla "Recovery 1" para resultados representativos).

Recuperación 2: En un experimento similar, se prepararon otras tres soluciones de carga (D, E y F) con niveles de 100, 200 y 400 ng/ml. Los valores esperados se calcularon añadiendo 95% del valor no cargado a 5% de la concentración de la solución cargada (5, 10 y 20 ng/ml, respectivamente). (Ver la tabla "Recovery 2").

Bilirrubina: La presencia de bilirrubina, en concentraciones de hasta 200 mg/l, no tiene ningún efecto sobre los resultados en términos de precisión.

Lipemia: Se ha establecido que la hiperquilomicronemia importante puede interferir con algunos inmunoanálisis. Esta interferencia se puede evitar aislando la capa de sobrenadante transparente antes del análisis. Para hacer esto manualmente, aspirar la muestra lipémica en una pipeta y sellar la punta con Parafilm. Dejar la pipeta en posición vertical hasta que los lípidos floten hacia arriba. Luego drenar y analizar la capa transparente del suero. Como alternativa se

puede utilizar una ultracentrífuga Airfuge. (No se ha establecido si otros tipos de lipemia también interfieren).

Tipo de Muestra Alternativa: para evaluar el efecto de los diferentes tipos de muestras alternativos, se recogió sangre de 33 voluntarios en tubos normales, tubos con Heparina y tubos vacutainer con EDTA. Todas las muestras fueron analizadas con el procedimiento DHEA Coat-A-Count, con los siguientes resultados.

(Heparina) = 0,84 (Suero) + 1,0 ng/ml
 $r = 0,90$

(EDTA) = 0,92 (Suero) + 0,2 ng/ml
 $r = 0,95$

Medias:
3,8 ng/ml (Heparina)
3,4 ng/ml (Suero)
3,4 ng/ml (EDTA)

Los valores en suero variaron de 0,2 a 13,7 ng/ml. Tanto el plasma heparinizado como el plasma con EDTA mostraron variabilidad —es decir, discrepancias relativas a los resultados en las muestras de suero de algunos individuos— mayor que la variabilidad observada en el estudio de precisión de interextracción. Sobre esta base, se recomienda utilizar muestras de suero.

Comparación de los métodos: Se comparó el kit Coat-A-Count DHEA con otro radioinmunoensayo para DHEA comercialmente disponible en 90 muestras de suero de pacientes. Los valores estadísticos que se muestran a continuación muestran una buena correlación entre estas dos metodologías.

(CAC) = 1,17 (Kit A) + 0,26 ng/ml
 $r = 0,94$

Medias:
2,0 ng/ml (Coat-A-Count)
1,5 ng/ml (Kit A)

Efecto de un ácido graso libre: Para investigar el efecto de un ácido graso no esterificado (NEFA), tres muestras fueron liofilizadas, reconstituidas y luego analizadas con el procedimiento Coat-A-Count DHEA. Para el paso de reconstitución se utilizaron soluciones acuosas conteniendo 0, 2,5, 5, y 10 mmol/l de ácido oleico. Los resultados demuestran que el ácido oleico, a concentraciones fisiológicamente altas, no tiene un efecto significativo sobre el procedimiento *in vitro*.

Efecto de las proteínas: Para simular distintas concentraciones de proteínas, se realizaron experimentos en los cuales alícuotas de 1,0 ml de un pool de sueros humanos sanos se secaron y congelaron y luego se reconstituyeron con distintos volúmenes de agua (0,5, 0,67, 1,0, 1,5 y 2 ml). Luego se analizó cada alícuota reconstituida mediante el procedimiento Coat-A-Count DHEA. Observe que las alícuotas reconstituidas con la mitad del volumen original representan una concentración de proteínas extremadamente alta, del orden de 14 g/dl. (A continuación se tabula el factor para corregir el volumen de reconstitución). Los resultados indican que las concentraciones de proteína total, las cuales son extremadamente bajas, pueden tener un efecto clínicamente significativo sobre el análisis Coat-A-Count DHEA. (Ver La tabla "Protein Effect")

Asistencia técnica

Póngase en contacto con el distribuidor nacional.

El Sistema de Calidad de Diagnostic Products Corporation está registrado para la ISO 13485:2003.

Français

Coat-A-Count DHEA

Domaine d'utilisation: La technique Coat-A-Count DHEA est un dosage radioimmunologique pour la mesure quantitative de la déhydroépiandrostérone (DHEA) dans le sérum. Réservé à un usage diagnostique *in vitro*.

Référence catalogue : **TKDH1** (75 tubes), **TKDH2** (150 tubes).



Le coffret de 75 tubes contient moins de 5 micro curies (185 kilobecquerels) de DHEA, marquée à l'iode 125 et le coffret de 150 tubes, moins de 10 micro curies (370 kilobecquerels).

Introduction

La déhydroépiandrostérone (DHEA) est un stéroïde surrénalien dont le dosage est important pour la recherche d'un

développement anormal du système pileux (hirsutisme) ou de virilisation chez la femme. Ce dosage peut aussi avoir un intérêt pour apprécier l'adrénarchie et une puberté retardée.

L'origine essentielle de la DHEA circulante est le cortex surrénalien. Bien que produit en quantité légèrement inférieure au sulfate de DHEA, avec lequel il est interconvertible dans le sang périphérique, la DHEA a une durée de demi vie beaucoup plus courte et circule à un taux plasmatique presque mille fois plus bas. En tant que telle la DHEA est faiblement androgénique mais elle peut être métabolisée en androgènes plus puissants tels l'androsténone et la testostérone.

Les taux de DHEA augmentent régulièrement à partir de la septième année de vie puis baissent peu à peu à partir de trente ans. Selon la littérature, la limite supérieure de normalité pour de jeunes adultes se situe vers 10 ng/ml. Comme le cortisol, la DHEA montre un cycle nyctéméral, dont le pic de libération est le matin. Par ailleurs, on n'observe pas de variations significatives au cours du cycle menstruel. Pendant la grossesse, ses taux sont légèrement diminués. Contrairement à la testostérone, la DHEA ne se lie pas à la SHBG (TeBG) circulante et ses taux ne sont pas influencés par des modifications de concentration de cette protéine de transport.

Principe du test

Le dosage Coat-A-Count DHEA est un dosage radioimmunologique par compétition, en phase solide. Les échantillons sont d'abord extraits par le dichlorométhane, les extraits sont évaporés à sec puis repris avec le standard zéro du coffret. Au cours de l'incubation, il y a compétition entre la DHEA marquée à l'iode 125 et la DHEA contenue dans l'extrait plasmatique, vis-à-vis des sites de l'anticorps. L'anticorps étant fixé sur la paroi des tubes en polypropylène, après incubation, il suffit d'éliminer le surnageant par décantation pour isoler facilement la fraction radioactive liée à l'anticorps. Le tube est ensuite compté sur un compteur gamma. Les cpm étant inversement proportionnels à la concentration de DHEA présente

dans l'échantillon qui sera déterminée à l'aide d'une courbe standard.

Réactifs à distribuer: 1

Temps d'incubation totale : 2 heures

Activité totale en début de marquage :
environ 100 000 cpm

Précautions d'emploi

Réservé à un usage diagnostique *in vitro*.

Réactifs : Conserver à +2/+8°C dans un réfrigérateur autorisé à recevoir du matériel radioactif. Éliminer les déchets conformément aux lois en vigueur.

Ne pas utiliser les réactifs au delà de leur date d'expiration.

Certains composants fournis avec ce coffret peuvent contenir des agents humains et/ou d'autres éléments potentiellement infectieux qui nécessitent certaines précautions.

Respecter les précautions d'emploi et manipuler tous les composants du coffret comme des produits potentiellement infectieux. Les réactifs dérivés de produits humains et utilisés dans ce coffret ont subi un test sérologique pour la Syphilis et des tests de dépistage pour les anticorps anti-VIH1 et 2, anti-HCV et pour l'antigène de surface de l'hépatite B, qui se sont tous avérés négatifs.

De l'azide de sodium à des concentrations inférieures à 0,1 g/dl a été ajouté comme conservateur ; lors de l'élimination, l'évacuer avec de grandes quantités d'eau pour éviter une accumulation d'azides métalliques explosifs dans les canalisations.

Eau : utiliser de l'eau distillée ou désionisée.

Radioactivité

Ce coffret de réactif est réservé à l'usage *in vitro* (Autorisation DGSNR).

Règles de base de protection contre les rayonnements ionisants et précautions d'emploi.

Ce produit radioactif ne peut être reçu, acheté, détenu ou utilisé que par des personnes autorisées à cette fin et dans des laboratoires dotés de cette autorisation. Cette solution ne peut en aucun cas être administrée à l'homme ou aux animaux. Respecter impérativement

les dates de péremption indiquées sur l'emballage extérieur et sur les étiquettes des différents réactifs du coffret. Tous les réactifs, dont les tubes revêtus d'anticorps, doivent être conservés à $+4/+8^{\circ}\text{C}$ dans leur conditionnement d'origine avant d'être utilisés. L'achat, la possession, l'utilisation et l'échange de matières radioactives sont soumis aux réglementations en vigueur dans le pays de l'utilisateur. Les règles de base de protection contre les rayonnements ionisants doivent être respectées selon des procédures en vigueur. Ne pas pipeter des solutions radioactives avec la bouche. Eviter le contact direct avec la peau ou les muqueuses de tout produit radioactif en utilisant des blouses et gants de protection. Toute manipulation de matières radioactives se fera dans un local ad hoc 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 contamination ou perte de substance radioactive devra être réglée selon les procédures établies. Toute mise aux déchets de matière radioactive se fera en accord avec les réglementations en vigueur. Ne pas manger, ni boire, ni fumer, ni appliquer des cosmétiques dans les laboratoires où des produits radioactifs sont utilisés. Les réactifs radioactifs ne peuvent être vendus qu'à des personnes habilitées à manipuler des substances radioactives.

Matériel fourni Préparation Initiale

Tubes revêtus d'anticorps anti-DHEA (TDH1)

Tubes en polypropylène revêtus d'anticorps anti- DHEA dans des sachets à glissière. Les conserver réfrigérés et protégés de l'humidité, bien refermer les sachets après utilisation. Stable à $+2/+8^{\circ}\text{C}$ jusqu'à la date d'expiration notée sur le sachet. Couleur: chamois.

TKDH1: 75 tubes. **TKDH2:** 150 tubes.

DHEA marquée à l'iode 125 (TDS2)

DHEA marquée à l'iode 125 avec des conservateurs fournie sous forme lyophilisée, reconstituer chaque flacon avec **80 ml** d'eau distillée. Stable à $+2/+8^{\circ}\text{C}$ pendant 30 jours après reconstitution, ou jusqu'à la date d'expiration notée sur le flacon.

Ne pas transférer le traceur dans un récipient en plastique.

TKDH1: 1 flacon. **TKDH2:** 2 flacons.

Tampon DHEA (DHC3)

100 ml de tampon fourni prêt à l'emploi, utilisé pour reprendre les extraits et comme standard zéro (standard A). Conserver bouché, stable 30 jours après ouverture à $+2/+8^{\circ}\text{C}$.

TKDH1: 1 flacon. **TKDH2:** 1 flacon.

Standards DHEA (DHC4-9)

6 standards étiquetés de B à G, sous forme liquide prêts à l'emploi dans la même matrice que le tampon DHEA, chaque flacon contient 3,0 ml. Stable à $+2/+8^{\circ}\text{C}$ pendant 30 jours après ouverture.

TKDH1: 1 jeu. **TKDH2:** 1 jeu.

Les standards contiennent respectivement, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10 et 30 nanogrammes de DHEA par millilitre (ng/ml); équivalent à 1,7, 3,5, 8,7, 17,3, 34,7 et 104 nanomoles par litre (nmol/l). Des points intermédiaires peuvent être obtenus en mélangeant des standards dans des proportions compatibles. Il est possible d'augmenter la durée de vie des standards en les congelant (-20°C). Aliquoter, dans des tubes de verre bien bouchés, afin d'éviter de répéter les cycles congélation / décongélation.

Matériel requis mais non fourni

Compteur Gamma – permettant l'utilisation de tubes standards 12x75 mm
Agitateur de type Vortex

Préparation des réactifs

Eprouvette graduée : 100 ml

Extraction

Pipettes de verre: 1,0 ml et 6,0 ml

Tubes de 16x125 mm avec capuchons de Teflon à visser. Ces tubes doivent être en borosilicate de haute qualité, *ne pas utiliser de plastique*. Pour éviter toute

contamination, utiliser de la verrerie pré-rincée ou rincer avec de l'acide HCL 0,1 N suivi de dichlorométhane.

Agitateur rotatif mécanique permettant de 15 à 20 révolutions par minute

Aspiration (trompe à eau)

Evaporateur avec hotte d'aspiration et bloc chauffant ou bain marie

Azote Comprimé

Bain à ultra sons

Dichlorométhane (CH₂Cl₂) pureté spectrophotométrique

Dosage radioimmunologique

Tubes secs en polypropylène 12x75 mm – à utiliser comme les tubes LNS, disponibles chez DPC

Micropipettes: 200 µl et 1 000 µl.

Bain-marie pouvant maintenir une température d'incubation de 37°C. Ni étuve ni bloc chauffant ne sont adaptés à ce dosage.

Un portoir de décantation – disponible chez DPC.

Papier graphe Logit-log– disponibles chez DPC (Référence catalogue : ZP797)

Un contrôle immunodosage, à base de sérum humain, à trois niveaux de concentration, contenant de la DHEA (parmi plus de 25 constituants dosables), est disponible chez DPC (Référence catalogue : CON6).

Recueil des échantillons

Le patient n'a pas besoin d'être à jeun et aucune préparation spéciale n'est requise. Prélever le sang par ponction veineuse⁶ sur tubes secs (sans anticoagulant) et séparer le sérum des cellules. Noter l'heure de prélèvement.

Avant extraction, laisser les échantillons revenir à température ambiante (15–28°C), mélanger doucement par rotations ou retournements. Aliquoter, si nécessaire, afin d'éviter de répéter les cycles congélation / décongélation. *Ne pas* tenter de décongeler les spécimens congelés à l'aide d'un bain marie.

Il est recommandé de clarifier les échantillons hyperlipémiques par ultracentrifugation.

Des échantillons lipémiques ne sont pas acceptables pour ce dosage.

Des tubes pour prélèvements sanguins provenant de fabricants différents peuvent donner des résultats différents, selon les matériaux et additifs utilisés, y compris gels ou barrières physiques, activateurs de la coagulation et/ou anticoagulants. Le coffret DHEA Coat-A-Count n'a pas été testé sur tous les types de tubes possibles. Veuillez consulter le chapitre intitulé Autres Types d'Échantillons pour plus de renseignements sur les tubes qui ont été évalués.

Volume nécessaire : 1,0 ml de sérum par tube.

Conservation: 2 jours à +2/+8° C ou 2 mois à –20°C.

Extraction des échantillons

Attention: le dichlorométhane est un solvant volatil et inflammable : mener l'évaporation sous une hotte aspirante, éviter des flammes nues, ne pas pipeter à la bouche. Le dichlorométhane doit être de pureté spectrophotométrique.

Seuls les sérums des patients et contrôles demandent une extraction : *ne pas extraire les standards du coffret.*

- 1 Marquer un tube en verre 16x125 mm pour chaque patient et contrôle.

Ces tubes doivent être en borosilicates de haute qualité (pas de tube en plastique!) Rincer la verrerie utilisée par une solution HCL 0,1 N puis par du dichlorométhane.

- 2 Pipeter **1,0 ml** de chaque sérum de patient et sérum de contrôle dans les tubes préparés.

- 3 **Extraction:** Ajouter **10 ml** de dichlorométhane à chaque tube. Fermer hermétiquement.

- 4 Mélanger par inversion sur un agitateur rotatif mécanique pendant **60 minutes**.

Un retournement lent à 15 – 20 révolutions par minute est la technique recommandée.

- 5 Centrifuger **5 minutes** à approx. 1500xg pour séparer les deux phases.

Tout échantillon partiellement émulsifié sera agité vigoureusement puis de nouveau centrifugé.

- 6 Eliminer le maximum de la phase supérieure sans troubler l'interface.

Utiliser une trompe à eau. (Aspirer de manière continue jusqu'au niveau de la phase de dichlorométhane pour éviter sa contamination au contact de résidus de la phase sérique.)

- 7 **Evaporation:** Transférer **6,0 ml** de la phase inférieure (dichlorométhane) dans un tube propre en verre et évaporer à sec sous un courant d'azote modéré à 37°C.

- 8 Reprendre les extraits secs avec **0,6 ml** du tampon DHEA (Standard A). Agiter et dissoudre au vortex ou par sonication. Continuer le radio immunodosage selon le protocole décrit ci-après.

Les extraits reconstitués peuvent être conservés à -20°C. Pour des échantillons de patients supposés contenir plus de 30 ng/ml, les extraits pourront être dilués avec le même tampon DHEA avant analyse.

Protocole de dosage

Tous les composants doivent être à température ambiante avant leur utilisation (15–28°C). Tous les standards B à G et tampon DHEA (standard A) sont prêts à l'emploi, seuls les sérums de patients et les contrôles subissent l'extraction précédemment décrite.

- 1 **Tubes secs :** Etiqueter deux séries de tubes (non revêtus) en polypropylène 12x75 mm tubes T et LNS (Liaison non spécifique) en duplicate.

La valeur du LNS dans la technique Coat-A-Count étant très faible, elle peut être négligée sans que la précision ou le contrôle de qualité ne soient modifiés.

Tubes revêtus d'anticorps: Etiqueter 14 tubes revêtus d'anticorps anti-DHEA, A (liaison maximale) et de B à G, en duplicate. Etiqueter les tubes revêtus d'anticorps anti-DHEA supplémentaires, également en duplicate, pour les contrôles et les échantillons patients.

Standards	ng/ml	nmol/l
A (LM)	0	0
B	0,5	1,7
C	1,0	3,5
D	2,5	8,7
E	5,0	17,3
F	10	34,7
G	30	104

- 2 Pipeter **200 µl** du standard zéro A (Tampon DHEA) dans les tubes LNS et A (liaison maximale LM), et **200 µl** des standards B à G dans les tubes correspondants. Pipeter **200 µl** de chaque extrait reconstitué des patients et contrôles dans les tubes marqués. **Pipeter directement au fond du tube.**

Les extraits reconstitués préparés à partir d'échantillons ayant des concentrations de DHEA plus élevées que le standard le plus haut (30 ng/ml) doivent être dilués davantage avec le tampon DHEA avant le dosage.

Il est bon d'utiliser des embouts de micropipettes jetables, de changer d'embout entre les échantillons de manière à éviter toute contamination.

- 3 Ajouter **1,0 ml** de DHEA marquée à l'iode 125 dans chaque tube. Vortexer.

Le temps d'addition du traceur ne doit pas dépasser 10 minutes. Les tubes T peuvent être mis de côté jusqu'au comptage (étape 6); ils n'ont pas d'autre traitement.

- 4 Incuber 2 heures à 37°C.

- 5 Décanner complètement.

Éliminer toute trace d'humidité pour améliorer la précision du dosage. À l'aide d'un portoir de décantation, décanter ou aspirer le contenu de tous les tubes (excepté les tubes T) et laisser les tubes retournés pendant 2 ou 3 minutes. Puis appliquer les fortement sur du papier absorbant afin d'éliminer les gouttelettes résiduelles.

- 6 Compter **1 minute** dans un compteur gamma.

Calcul des Résultats

Afin d'obtenir des résultats en concentrations à partir d'une

représentation logit-log de la courbe de calibration, calculer pour chaque doublet de tubes les coups corrigés: moyenne cpm-moyenne des cpm du NSB:

CPM corrigés = (Moyenne cpm) moins (Moyenne cpm **LNS**)

Puis déterminer pour chaque doublet la capacité de liaison en pourcentage de liaison maximale (LM), corrigée des cpm dus au LNS des tubes A tubes considérés à 100%:

% liaison = (cpm corrigés / cpm corrigés **LM**) × 100

(Le calcul peut être simplifié en négligeant la correction due au LNS. Les échantillons dans la gamme d'étalonnage donnent des résultats pratiquement identiques quand la capacité de liaison est calculée directement à partir de la moyenne des CPM.)

En utilisant un papier logit-log, on porte en ordonnée les pourcentages de liaison en fonction des concentrations des standards qui ne sont pas à zéro, en abscisse. On trace une ligne droite passant approximativement par ces points. Les concentrations des échantillons inconnus sont déterminées par interpolation sur la courbe standard.

Il est bon de vérifier les doublets et de construire une représentation graphique de la courbe d'étalonnage (même si celle-ci est faite par ordinateur) avec les différentes valeurs de façon à visualiser le meilleur tracé et c'est une façon de détecter les points déviants. Nous recommandons aussi de suivre les paramètres suivants :

T = Activité totale (cpm)

%LNS = $100 \times (\text{Moyenne des cpm du LNS} / \text{cpm Totaux})$

%LM = $100 \times (\text{cpm corrigés} / \text{cpm totaux})$

Et les intercepts à 20, 50 et 80 % avec

20% = Concentration à 20% de liaison, etc.

Note: d'autres approches sont possibles comme l'intégration de paramètres 4-p logistique. Se rapporter à Dudley RA, et al. Guidelines for immunoassay data reduction. Clin Chem 1985;31:1264-71.

Exemple de série : A titre d'exemple uniquement, et non pour calculer des

résultats provenant d'une autre série. (Voir le tableau « Example Run ».)

Contrôle de Qualité

Les contrôles (ou pools de sérums) avec au moins deux taux de concentration de DHEA – haut et bas – doivent être dosés en routine comme des échantillons inconnus.

Les résultats de patient ne doivent être validés que si les résultats des contrôles correspondent aux critères d'acceptation établis par votre laboratoire.

Il est bon d'enregistrer pour chaque dosage les numéros de lots des composants utilisés ainsi que la date à laquelle ils ont été reconstitués ou ouverts. Nous recommandons également de noter jour après jour les résultats des contrôles – comme décrit par exemple dans Westgard JO, et al. A multi-rule chart for quality control. Clin Chem 1981;27:493-501. Noter qu'un redosage d'échantillon peut être précieux pour suivre la précision inter essai, et que les doublets de tubes contrôle peuvent être espacés de façon à vérifier l'absence de dérive significative.

Blanc de solvant:

Pour garantir des résultats fiables, il est impératif d'utiliser du dichlorométhane au moins de pureté spectrophotométrique et une source d'azote ne risquant pas de contaminer les tubes à évaporer avec de l'eau ou de l'huile, à cet effet l'usage d'un piège à sulfate de calcium est recommandé. Pour un contrôle de la pureté de ces réactifs, nous recommandons la détermination périodique d'un « blanc de solvant » par extraction puis dosage d'un échantillon d'eau distillée ou stérile dans une procédure identique à celle des échantillons patients afin de vérifier que l'on obtient une valeur de DHEA proche ou en dessous de la limite de détection.

Valeurs de référence

Une première étude des valeurs de référence a été réalisée sur 33 sérums d'adultes volontaires incluant 19 femmes et 14 hommes avec le coffret Coat-A-Count DHEA : les résultats de 0,2 à 9,8 ng/ml présentaient une médiane à 2,5 ng/ml, 91% des résultats se situaient sous 6,0 ng/ml. Tous ces résultats étaient

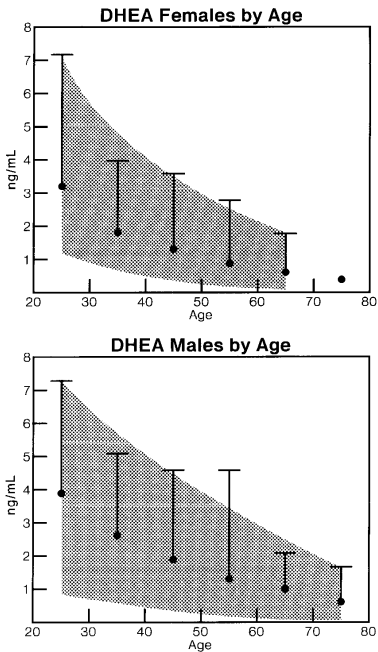
obtenus sur du sérum, type d'échantillon recommandé.

Une autre étude conduite dans un grand hôpital du nord ouest des U.S.A. sur 136 femmes et 155 hommes d'âge connu, a fourni des valeurs normales par sexe et par âge : voir les graphiques ci-après : les cercles pleins indiquent les 50 percentiles, alors que les barres en "T" représentent les 95^{èmes} percentiles.

La zone foncée les valeurs entre les 5 et 95 percentiles de DHEA circulante d'une courbe lissée en fonction de l'âge.

Femmes				
Age (décade)	n	5th %ile	50th %ile	95th %ile
10-19	2	—	3,2	—
20-29	23	1,1	1,6	7,2
30-39	29	0,55	1,3	4,0
40-49	29	0,40	0,85	3,6
50-59	18	0,3	0,7	2,8
60-69	21	0,1	0,3	1,8
70-79	8	0,1	0,25	1,5
80-89	6	—	—	—

Hommes				
Age (décade)	n	5th %ile	50th %ile	95th %ile
10-19	6	—	1,1	—
20-29	17	1,0	3,9	7,3
30-39	21	0,75	2,6	5,1
40-49	23	0,7	1,9	4,6
50-59	29	0,55	1,7	4,6
60-69	37	0,4	1,0	2,1
70-79	18	0,1	0,6	1,7
80-89	4	—	0,3	—



DHEA Females by Age: DHEA selon l'âge chez la femme. DHEA Males by Age: DHEA selon l'âge chez l'homme.

Utiliser ces valeurs à titre indicatif uniquement. Chaque laboratoire devra établir ses propres valeurs de référence.

Performances du test

Se reporter aux tableaux et graphiques pour obtenir les données représentatives du coffret Coat-A-Count DHEA. Les résultats sont exprimés en nanogrammes de DHEA par millilitre (ng/ml). Le poids moléculaire de la DHEA étant de 288,4 daltons, la conversion de ng/ml en nanomoles par litre (nmol/l) se fait par le facteur 3,467:

Facteur de conversion :

$$\text{ng/ml} \times 3,467 \rightarrow \text{nmol/l}$$

Intervalle de linéarité : 0,5 – 30 ng/ml
(1,7 – 104 nmol/l)

Sensibilité analytique : 0,04 ng/ml

Précision intra-dosage (au sein d'une même série) : Les résultats ont été calculés pour chacun des échantillons à partir des résultats de 20 tubes en duplicate dans une même série. (Voir le tableau "Intraassay Precision")

Précision inter extraction: 3 échantillons sont extraits individuellement 20 fois puis dosés avec le coffret Coat-A-Count DHEA kit. (Voir le tableau "Interextraction".)

Spécificité : L'antisérum utilisé dans la technique Coat-A-Count DHEA est très spécifique de la DHEA. Il présente de très faibles réactions croisées avec les composés pouvant se trouver dans les échantillons des patients, stéroïdes ou médicaments. Des extraits d'échantillons repris dans le standard zéro ont été utilisés pour ces déterminations de réactions croisées sauf pour les composés marqués d'un astérisque(*) dosés sans extraction dissous dans le standard zéro. (Voir le tableau « Specificity ».)

Test de dilution : Des échantillons ont été dosés à différentes concentrations. (Se reporter au tableau "Linearity".)

Test de récupération 1 : Des échantillons chargés dans un rapport de 1 à 19 avec 3 solutions de DHEA (50, 100 et 200 ng/ml. (Voir le tableau "Recovery 1".)

Test de récupération 2: Dans un test similaire, 3 autres solutions de surcharge (D, E et F) sont préparées avec des concentrations de DHEA à 100, 200 et 400 ng/ml. 95% de l'échantillon testé est ajouté à 5% de ces solutions de surcharge soit une addition de 5, 10 et 20 ng/ml. (Voir les résultats au tableau "Recovery 2")

Bilirubine : La présence de bilirubine ne présente aucun effet sur les résultats ni sur la précision du dosage si la concentration ne dépasse pas 200 mg/l.

Lipémie : Il a été démontré qu'une hyperchylomicronémie peut interférer avec certains immunodosages. Cette interférence peut être évitée par traitement préalable par un clarifiant. Pour effectuer cette opération manuellement, mettre les échantillons lipémiques dans une pipette et sceller les embouts avec du film plastique. Laisser reposer la pipette jusqu'à ce que les lipides reposent à la surface. Egoutter et doser la partie claire du sérum. Alternativement, une pompe à vide peut être utilisée. (Il n'a pas été établi si d'autres types de lipémie peuvent également interférer.)

Autres types d'échantillons: pour estimer l'effet de l'utilisation de différents types d'échantillons, 33 volontaires ont été

prélevés sur tubes secs, héparinés et sur tubes vacutainer EDTA. Tous les échantillons ont été dosés avec le protocole Coat-A-Count DHEA et ont donné les résultats suivants.

(Hépariné) = 0,84 (Sérum) + 1,0 ng/ml
 $r = 0,90$

(EDTA) = 0,92 (Sérum) + 0,2 ng/ml
 $r = 0,95$

Moyennes :
3,8 ng/ml (Hépariné)
3,4 ng/ml (Sérum)
3,4 ng/ml (EDTA)

Pour les échantillons sériques, le domaine de mesure est de 0,2 à 13,7 ng/ml. Les plasmas hépariné et EDTA ont présenté des variabilités — des discordances par rapport aux résultats des échantillons sériques de mêmes individus — plus importantes que la variabilité trouvée sur l'étude de précision des interextractions. Sur ces bases, il est recommandé de prélever des échantillons sériques.

Comparaison de méthodes: la méthode Coat-A-Count DHEA a été comparée à un autre dosage radioimmunologique commercial (kit A) sur 90 sérums de patients, les résultats démontrent une bonne corrélation entre les deux techniques :

(CAC) = 1,17 (Kit A) + 0,26 ng/ml
 $r = 0,94$

Moyennes :
2,0 ng/ml (Coat-A-Count)
1,5 ng/ml (Kit A)

Effet des Acides Gras Libres: Pour rechercher les effets de acides gras non estérifiés (NEFA), des aliquotes de 3 échantillons ont été lyophilisées, reconstituées et enfin dosées avec la procédure Coat-A-Count DHEA. Des solutions aqueuses contenant 0, 2,5, 5, et 10 mmol/L d'acide oléique ont été utilisées lors de l'étape de reconstitution. Les résultats démontrent que l'acide oléique— à fortes concentrations physiologiques — a un effet significatif in vitro sur le dosage.

Effet des protéines: Pour simuler différentes concentrations en protéines, des expériences ont été effectuées en reconstituant des aliquotes de 1 ml de sérums humains lyophilisés avec différents volumes d'eau (0,5, 0,67, 1,0, 1,5 et 2 ml). Chaque aliquote reconstitué a été dosé à l'aide de la méthode Coat-A-Count DHEA. La reconstitution

des aliquotes, avec seulement la moitié du volume original, a conduit à une concentration protéique extrêmement haute, de l'ordre de 14 g/dl. (les facteurs de correction liés au volume de reconstitution sont indiqués) Les résultats montrent, que des taux très faibles de protéines totales peuvent avoir un effet significatif sur ce dosage Coat-A-Count DHEA. (Voir le tableau "Protein Effect".)

Assistance technique

Contacter votre distributeur national. En France distribué par DPC France 90 bd National 92257 La Garenne-Colombes.

Le système d'assurance qualité de DPC est certifié ISO 13485 (2003).

Italiano

Coat-A-Count DHEA

Uso: Il Dosaggio Coat-A-Count DHEA è un radioimmunosaggio in fase solida marcato con I^{125} per la determinazione quantitativa del deidroepiandrosterone nel siero (DHEA). A solo uso diagnostico *in vitro*.

Codice: **TKDH1** (75 provette), **TKDH2** (150 provette).



Il kit da 75 determinazioni contiene meno di 5 microcurie (185 kilobecquerel) di DHEA marcato con I^{125} , ed il kit da 150 determinazioni contiene meno di 10 microcurie (370 kilobecquerel).

Riassunto e Spiegazione del Test

Il Deidroepiandrosterone (DHEA) è uno steroide surrenalico che circola spesso ad un livello elevato in casi di crescita anomala dei peli (irsutismo) e virilizzazione. La sua determinazione può anche essere un valido strumento nella determinazione dell'adrenarca e della pubertà ritardata.

Il DHEA nel circolo ha origine quasi interamente nei surreni. Benché prodotto ad un livello solo in alcuni casi inferiore al deidroepiandrosterone solfato (DHEA-SO₄), con il quale è interconvertibile a livello periferico, il DHEA ha un'emivita più

corta e così mantiene una concentrazione plasmatica circa 100 volte inferiore. Di per se stesso il DHEA è solo un debole androgenico, ma può servire come precursore per androgeni più potenti.

I livelli plasmatici del DHEA aumentano costantemente dall'età di 7 anni, quindi declinano gradualmente dopo i 30 anni. Secondo quanto contenuto in letteratura, il limite superiore di riferimento per i giovani è circa 10 ng/mL. Come il cortisolo, il DHEA presenta una variazione diurna, che è massima la mattina. D'altro canto, non presenta nessuna variazione significativa durante il ciclo mestruale. Si verifica una moderata diminuzione durante la gravidanza. A differenza del testosterone, il DHEA non circola legato alla globulina legante gli ormoni sessuali e quindi non viene influenzato dalle alterazioni nel livello di questo carrier delle proteine.

Principio del Dosaggio

Il Dosaggio Coat-A-Count DHEA è un immunodosaggio competitivo basato su provette coattate con anticorpo. I campioni sono inizialmente estratti in diclorometano, evaporati completamente e risospesi nel calibratore zero. Il DHEA marcato con I^{125} compete con il DHEA presente negli estratti del paziente per i siti anticorpali. Dopo che le provette sono decantate e contate le concentrazioni di DHEA vengono lette direttamente dalla curva di calibrazione.

Reagenti da Dispensare: 1

Tempo Totale di Incubazione: 2 ore

Conte Totali alla iodinazione:
circa 100 000 cpm.

Avvertenze e Precauzioni

Ad uso diagnostico *in vitro*.

Reagenti: Conservare a 2–8°C in un frigorifero appositamente destinato al materiale radioattivo. Eliminare secondo le normative di legge vigenti.

Non utilizzare reagenti oltre la data di scadenza.

Alcuni componenti forniti in questo kit possono contenere materiale di origine umana e/o altri ingredienti potenzialmente pericolosi che necessitano di precauzioni di utilizzo.

Seguire le precauzioni universali, e manipolare tutti i componenti come se potessero trasmettere agenti infettivi. Sono stati dosati i materiali di origine umana e sono stati trovati non reattivi per la Sifilide; per gli Anticorpi Anti-HIV 1 e 2; per l'Antigene di Superficie dell'Epatite B; e per gli Anticorpi Anti-Epatite C.

E' stata aggiunta Sodio Azide a concentrazioni inferiori a 0,1 g/dL come conservante. Al momento dell'eliminazione, irrorare con molta acqua per evitare la formazione di azidi metalliche potenzialmente esplosive nelle tubature di piombo e di rame.

Acqua: Utilizzare solo acqua distillata o deionizzata.

Radioattività

Una copia di tutti i certificati di Autorizzazione per radioisotopi (Specifica o Generica) rilasciata ad un cliente americano deve essere conservata in file presso la Diagnostic Products Corporation prima che i kit o i componenti contenenti materiale radioattivo possano essere spediti. Questi materiali radioattivi possono essere acquisiti da qualsivoglia cliente in possesso dell'Autorizzazione Specifica. Con l'Autorizzazione Generica questi materiali radioattivi possono essere acquistati solo da medici, veterinari che esercitano la professione, laboratori clinici ed ospedalieri – e solo per l'esecuzione di test clinici o di laboratorio in vitro che non implicino somministrazione interna o esterna del materiale radioattivo o delle sue radiazioni alle persone o animali. La sua acquisizione, ricevimento, conservazione, utilizzo, trasferimento ed eliminazione sono soggette a regolamentazioni e ad Autorizzazione (Generica o Specifica) della Commissione Statunitense per il Nucleare o dello Stato con il quale l'NRC abbia stipulato un accordo per l'esercizio del controllo regolatorio.

Manipolare i materiali radioattivi secondo quanto previsto dall'Autorizzazione Generica o Specifica. Per minimizzare l'esposizione alle radiazioni, l'utilizzatore deve attenersi alle linee guida stabilite dal National Bureau of Standards publication su *"Safe Handling of Radioactive Materials"* *"Norme per una corretta manipolazione dei Materiali Radioattivi"*. (Guida N° 92, pubblicata il 9

Marzo 1964) e successive edizioni pubblicate dallo Stato e dalle Autorità Federali.

Assorbire immediatamente le fuoriuscite e decontaminare le superfici contaminate. Evitare la formazione di aerosol. Eliminare i rifiuti solidi radioattivi secondo quanto previsto dall'Autorizzazione. Le licenze generiche (possessori di NRC Form 483) possono eliminare i rifiuti radioattivi solidi come non radioattivi, dopo aver rimosso l'etichetta. I detentori di autorizzazioni specifiche (NRC Form 313) devono fare riferimento al Titolo 10, Codice delle Regolamentazioni Federali Parte 20. I detentori di Autorizzazioni negli Stati che hanno stipulato un accordo con l'NRC dovrebbero far riferimento alle regolamentazioni idonee dei loro stati. I detentori di Autorizzazioni Generali possono eliminare i rifiuti radioattivi liquidi del tipo contenuto in questo prodotto attraverso il lavello del laboratorio. I detentori di autorizzazione devono eliminare o rendere illeggibili le etichette dei contenitori vuoti di materiali radioattivi prima di eliminare i rifiuti solidi. I detentori di autorizzazioni specifiche possono eliminare piccoli quantitativi di rifiuti radioattivi liquidi del tipo utilizzato in questo prodotto attraverso il lavello del laboratorio. Fare riferimento alle regolamentazioni appropriate applicabili al Vostro laboratorio.

Materiali Forniti: Preparazione Iniziale

Provette Coattate con un Anticorpo DHEA (TDH1)

Provette di polipropilene coattate con anticorpi anti-DHEA e confezionate in buste a cerniera. Conservarle refrigerate al riparo dall'umidità, richiudendole dopo l'utilizzo. Stabili a 2–8°C fino alla data di scadenza indicata sulla confezione.

Colore: camoscio.

TKDH1: 75 provette. **TKDH2:** 150 provette

DHEA marcato con I¹²⁵ (TDH2)

DHEA liofilo iodinato. Ricostituire ciascun flacone con **80 mL** di acqua distillata. Stabile a 2–8°C per 30 giorni dopo la ricostituzione, o fino alla data di scadenza indicata sulla provetta. Non trasferire il tracciante in un contenitore di plastica.

TKDH1: 1 flacone. **TKDH2:** 2 flaconi.

Tampone DHEA (DHC3)

100 mL di un tampone, fornito in forma liquida, pronto all'uso. Viene utilizzato per risospendere gli estratti e serve anche come calibratore zero (Calibratore A). Conservare il tampone sigillato. Stabile a 2–8°C per 30 giorni dopo l'apertura.

TKDH1: 1 flacone. **TKDH2:** 1 flacone.

Calibratori DHEA (DHC4–9)

Un set di sei flaconi, etichettati dalla B alla G, contenente diversi livelli di DHEA nella stessa matrice utilizzata nel Tampone DHEA. Ciascun flacone contiene 3,0 mL. Stabile a 2–8°C per 30 giorni dopo l'apertura.

TKDH1: 1 set. **TKDH2:** 1 set.

I calibratori rappresentano, rispettivamente, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10 e 30 nanogrammi di DHEA per millilitro (ng/mL); equivalenti a 1,7, 3,5, 8,7, 17,3, 34,7 e 104 nonomoli per litro (nmol/L). I punti intermedi della calibrazione possono essere ottenuti mescolando i calibratori in proporzioni idonee. La vita dei calibratori può essere estesa congelandoli.

Aliquotare, se necessario in provette silanizzate ben sigillate, per evitare cicli ripetuti di congelamento e scongelamento.

Materiali Richiesti Ma Non Forniti

Gamma counter — compatibile con provette standard da 12x75 mm.

Vortex mixer.

Preparazione dei Reagenti

Cilindro graduato: 100 mL.

Estrazione

Pipette di vetro: 1,0 mL e 6,0 mL.

Provette da 16x125 mm con tappi di Teflon. Le provette dovrebbero essere fatte di vetro borosilicato ad elevata qualità (non utilizzare plastica). Per evitare il rischio di contaminazione, utilizzare materiale in vetro "prelavato" o utilizzare un risciacquo finale con 0,1 N HCl seguito da diclorometano.

Rotatore meccanico, in grado di effettuare da 15 a 20 rivoluzioni al minuto.

Aspiratore.

Evaporatore con cappa e piastra riscaldata o bagnetto termostato a 37°C.

Nitrogeno compresso.

Bagnetto ad ultrasuoni.

Diclorometano (cloruro di metilene) almeno a gradiente spettrofotometrico.

Radioimmunosaggio

Provette semplici di polipropilene da 12x75 mm — da utilizzarsi come provette NSB, disponibili presso DPC.

Micropipette con puntali monouso: 200 µL e 1 000 µL.

Bagnetto termostato in grado di mantenere una temperatura di 37°C — non utilizzare né forno né piastra riscaldata.

Foam per la decantazione — disponibile presso DPC

Carta per grafici logit-log — disponibile presso DPC (Codice: ZP797).

Un controllo per immunodosaggi a tre livelli basato su siero umano, contenente DHEA tra gli altri oltre 25 costituenti dosati, disponibile presso DPC (Codice: CON6).

Prelievo dei Campioni

Non è necessario che il paziente sia a digiuno, non sono necessarie preparazioni particolari. Prelevare il sangue⁶ in provette semplici, e separare il siero dalle cellule, annotando l'ora del prelievo.

Prima dell'estrazione, consentire ai campioni di raggiungere temperatura ambiente (15–28°C) e mescolare capovolgendo la provetta. Aliquotare, se necessario per evitare cicli ripetuti di congelamento e scongelamento. *Non tentare* di scongelare i campioni congelati riscaldandoli in un bagnetto termostato.

Si consiglia l'utilizzo di un'ultracentrifuga per schiarire i campioni lipemici.

I campioni lipemici non possono essere utilizzati.

Provette per il prelievo di sangue di produttori diversi possono dare valori differenti, a seconda dei materiali e degli additivi usati, incluso gel o barriere fisiche, attivatori di coaguli e/o anticoagulanti.

L'Coat-A-Count DHEA non è stato verificato con tutte le possibili variazioni di tipi di provette. Consultare la sezione riguardante Campioni Alternativi per dettagli sulle provette testate.

Volume Richiesto: 1,0 mL di siero per provetta.

Conservazione: 2 giorni a 2–8°C, o 2 mesi congelato a –20°C.

Preparazione dei Campioni

Attenzione: Il diclorometano (cloruro di metilene) è un solvente organico volatile ed infiammabile. Effettuare l'evaporazione sotto cappa. Evitare le fiamme e non pipettare con la bocca. Il diclorometano deve essere almeno a gradiente spettrofotometrico.

Attenzione: solo i campioni dei pazienti ed i controlli richiedono l'estrazione prima del dosaggio. *Non estrarre i calibratori.*

- 1 Etichettare una provetta di vetro da 16x125 mm per ciascun campione e controllo.

Le provette devono essere fatte di vetro borosilicato di qualità elevata. (Non utilizzare la plastica.) evitare il rischio di contaminazione, utilizzare vetro "prelavato" o risciacquare alla fine con 0,1 N HCl seguito da diclorometano.

- 2 Dispensare **1,0 mL** di ciascun campione e controllo nelle provette preparate.

- 3 **Estrazione:** Aggiungere **10 mL** di diclorometano ad ogni provetta. Sigillare.

- 4 Mescolare capovolgendo utilizzando un rotatore meccanico per **60 minuti**.

Il metodo di riferimento suggerisce di effettuare da 15 a 20 rivoluzioni al minuto.

- 5 Centrifugare per **5 minuti** a circa 1500xg per separare le due fasi.

Qualsiasi campione parzialmente emulsionato dovrebbe essere nuovamente vigorosamente centrifugato.

- 6 Eliminare la *maggior parte* dello strato soprastante, facendo attenzione a non disturbare l'interfaccia.

Utilizzare un aspiratore d'acqua. (L'aspirazione fino all'interfaccia potrà causare una contaminazione dello strato di diclorometano della fase sierica a contatto)

- 7 **Evaporazione:** Trasferire **6,0 mL** della fase inferiore (diclorometano) ad una provetta di vetro pulita e far

evaporare completamente sotto un leggero getto di nitrogeno a 37°C.

- 8 Una volta evaporato, risospendere gli estratti con **0,6 mL** di Tampone DHEA (Calibratore A). Vortexare o sonicare completamente. Continuare con il radioimmunosaggio di seguito descritto.

Gli estratti ricostituiti possono essere conservati a –20°C. Gli estratti ricostituiti da campioni con concentrazioni di DHEA superiori al calibratore maggiore (30 ng/mL) possono essere ulteriormente diluiti con il Tampone DHEA prima del dosaggio.

Dosaggio Radioimmunologico

Tutti i componenti devono essere portati a temperatura ambiente (15–28°C) prima dell'utilizzo. I calibratori dalla B alla G ed il Tampone DHEA (Calibratore A) sono pronti all'uso. Solo i campioni ed i controlli devono essere soggetti alla procedura di estrazione sopra descritta.

- 1 **Provette Semplici:** Etichettare quattro provette 12x75 mm di polipropilene semplici (non coattate) T (conte totali) ed NSB (legame non specifico) in duplicato.

Poiché il legame non specifico nel Dosaggio Coat-A-Count è caratteristicamente basso, le provette NSB possono essere omesse senza compromettere l'accuratezza o il controllo di qualità.

Provette Coattate: Etichettare con A quattordici Provette Coattate con un Anticorpo (legame massimo) e dalla B alla G in duplicato. Etichettare ulteriori provette coattate con un anticorpo, anch'esse in duplicato per i controlli ed i campioni.

Calibratori	ng/mL	nmol/L
A (MB)	0	0
B	0,5	1,7
C	1,0	3,5
D	2,5	8,7
E	5,0	17,3
F	10	34,7
G	30	104

- 2 Dispensare **200 µL** del calibratore zero A (Tampone DHEA) nelle provette NSB ed A, e **200 µL** di ciascuno dei calibratori non zero nelle provette dalla B alla G. Dispensare **200 µL** di ciascun controllo e campione nelle provette preparate. **Pipettare direttamente al fondo.**

Gli estratti ricostituiti preparati da campioni con concentrazioni di DHEA superiori al calibratore più elevato (30 ng/mL) possono essere ulteriormente diluiti con il Tampone DHEA prima del dosaggio.

Si consiglia di utilizzare un puntale monouso, cambiando il puntale tra un campione e l'altro, per evitare la contaminazione da carryover.

- 3 Aggiungere **1,0 mL** di DHEA marcato con I^{125} ad ogni provetta. Vortexare.
Non devono passare più di 10 minuti nella dispensazione del tracciante. Mettere da parte le provette T per la conta (al punto 6); non sono necessari ulteriori passaggi.
- 4 Incubare per **2 ore a 37°C**.
- 5 Decantare completamente.
Rimuovere tutta l'umidità visibile aumentando così la precisione. Utilizzando un foam per la decantazione, decantare il contenuto di tutte le provette (ad eccezione delle provette T e fare in modo che si asciugino per 2 o 3 minuti. Tamponarle su carta assorbente per eliminare completamente i liquidi.
- 6 Contare per **1 minuto** in un gamma counter.

Calcolo dei Risultati

Per ottenere i risultati in termini di concentrazione da una rappresentazione logit-log della curva di calibrazione, calcolare inizialmente per ogni coppia di provette le conte medie al minuto corrette con NSB:

Conte Nette = (Media dei CPM) Meno (Media CPM **NSB**)

Quindi determinare il legame di ogni coppia di provette come percentuale del legame massimo (MB), con le conte corrette-NSB delle provette A prese al 100%:

Percentuale di Legato = (Conte Nette / Conte Nette **MB**) × 100

(Il calcolo può essere semplificato omettendo la correzione per il legame non specifico; i campioni entro il range dei calibratori danno virtualmente gli stessi risultati quando la Percentuale di Legato viene calcolata direttamente dai CPM Medi).

Utilizzando la carta logit-log, tracciare la Percentuale di Legato sull'asse verticale (probabilità) verso la Concentrazione sull'asse orizzontale (logaritmica) per ciascuno dei calibratori non zero e tracciare una linea retta approssimativamente lungo il tracciato di questi punti. I risultati per i campioni non noti possono essere letti dalla retta attraverso interpolazione.

Si consiglia di visionare i risultati per stabilire la correlazione entro i replicati e tracciare un grafico della curva di calibrazione (anche se i calcoli vengono effettuati dal computer) per visualizzare l'appropriatezza della trasformazione utilizzata e per individuare i punti devianti all'interno della calibrazione. Consigliamo anche di mantenere una rintracciabilità dei parametri utilizzati per la riduzione dei dati:

T = Conte Totali (conte al minuto)

%NSB = $100 \times (\text{Conte NSB Medie} / \text{Conte Totali})$

%MB = $100 \times (\text{Conte Nette} / \text{Conte Totali})$

E le "intercette" al 20, 50 ed 80%, dove

20% = Concentrazione al 20% di Legato ecc.

Nota: sono accettabili anche altri tipi di approccio, quali: l'implementazione della logistica a 4 parametri. Vedi Dudley Ra et al. Guidelines for immunoassay data Reduction. Clin Chem 1985;31:1264-71.

Seduta Esemplificativa: a solo scopo illustrativo e non per calcolare i risultati di un'altra seduta. (vedi tabella "Example Run").

Controllo di Qualità

Dovrebbero essere routinariamente dosati come campioni non noti controlli o pool di sieri con almeno due livelli di concentrazione di DHEA, basso ed alto.

Riportare i risultati dei pazienti solo se i risultati dei controlli sono conformi ai criteri di accettabilità del Vostro laboratorio.

Si consiglia per ogni dosaggio di annotare i numeri di lotto dei componenti utilizzati, le date di ricostituzione o di apertura. Si consiglia anche di tracciare i grafici dei risultati dei controlli giorno dopo giorno – come descritto, ad esempio, in Westgard JO, et al. A multi-rule chart for quality control. Clin Chem 1981;27:493-501. Campioni ripetuti possono servire come ulteriore strumento per monitorare la precisione inter-dosaggio; coppie di campioni intervallate lungo tutto il dosaggio possono essere d'aiuto nel verificare l'assenza di deviazioni significative.

Bianchi Solventi:

Per risultati affidabili, il diclorometano deve essere almeno a gradiente spettrofotometrico e la sorgente di nitrogene, se utilizzata, non deve contaminare l'evaporazione delle provette con olio o umidità. (L'utilizzo di una trappola contenente solfato di calcio è d'aiuto nell'evitare tale contaminazione). Come verifica della purezza di questi reagenti, consigliamo l'utilizzo periodico di un "bianco solvente". Ciò comporta l'estrazione ed il dosaggio di acqua distillata o sterile nel modo descritto per i campioni a verificare che produca una concentrazione apparente di DHEA che sia uguale o inferiore al limite di rilevazione.

Valori Attesi

Uno studio sul range preliminare di riferimento è stato effettuato con il dosaggio Coat-A-Count DHEA su campioni di siero prelevati da 33 volontari adulti incluse 19 donne e 14 uomini. I risultati presentavano un range da 0,2 a 9,8 ng/mL con un valore mediano di 2,5 ng/mL. Il 91% dei risultati erano inferiori a 6,0 ng/mL. Attenzione questi risultati sono stati ottenuti per il tipo di campione consigliato, cioè siero.

E' stato condotto un ulteriore studio sul range di riferimento presso un grosso ospedale nel nord-est degli Stati Uniti su 136 donne e 155 uomini di età nota. I risultati, suddivisi per sesso ed età sono riassunti nella tabella e nei grafici di seguito riportati. Nei grafici, i cerchi pieni

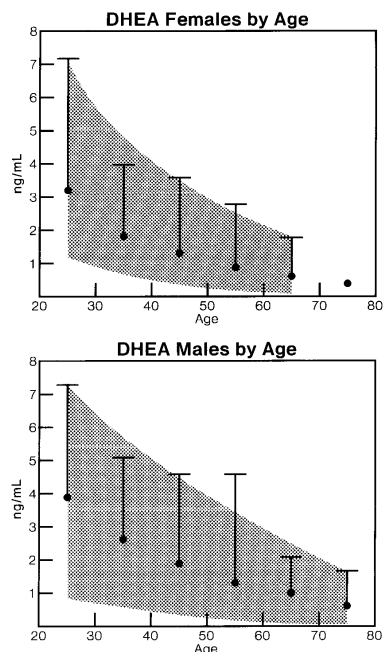
indicano le mediane (50° percentile), mentre le barre a "T" indicano i 95° percentili. L'ombreggiatura rappresenta una perequazione del 5° e 95° percentile secondo un semplice modello di andamento del DHEA in circolo in funzione dell'età.

Femmine

Età	N	5°%ile	50° %ile	95°%ile
10–19	2	—	3,2	—
20–29	23	1,1	1,6	7,2
30–39	29	0,55	1,3	4,0
40–49	29	0,40	0,85	3,6
50–59	18	0,3	0,7	2,8
60–69	21	0,1	0,3	1,8
70–79	8	0,1	0,25	1,5
80–89	6	—	—	—

Maschi

Età	n	5°%ile	50°%ile	95°%ile
10–19	6	—	1,1	—
20–29	17	1,0	3,9	7,3
30–39	21	0,75	2,6	5,1
40–49	23	0,7	1,9	4,6
50–59	29	0,55	1,7	4,6
60–69	37	0,4	1,0	2,1
70–79	18	0,1	0,6	1,7
80–89	4	—	0,3	—



DHEA Females by Age: DHEA Femmine divise per Et . DHEA Males by Age: DHEA Maschi divisi per et .

Considerare questi limiti *soltanto come linee guida*. Ogni laboratorio dovrebbe stabilire i propri range di riferimento.

Prestazioni del Dosaggio

Vedi Tabelle e Grafici per dati *representativi* delle prestazioni del dosaggio Coat-A-Count DHEA. I risultati del DHEA nelle sezioni di cui di seguito sono espresse in nanogrammi per millilitro (ng/mL). Poich  la massa molecolare del DHEA   288,4 dalton, per convertirlo in unit  S.I. — nanomoli per litro (nmol/L) — moltiplicare per 3,467:

Fattore di Conversione:

ng/mL $\times$ 3,467 $\rightarrow$ nmol/L.

Range di Calibrazione: 0,5 – 30 ng/mL (1,7 – 104 nmol/L)

Sensibilit  Analitica: 0,04 ng/mL.

Precisione Intra-Dosaggio (All'interno della stessa seduta) Sono state calcolate statistiche per campioni dai risultati di 20 coppie di provette in un unico dosaggio. (Vedi tabella "Intra-Assay Precision".)

Interestrazione: Sono state calcolate statistiche per tre campioni che sono stati estratti individualmente venti volte, quindi dosati con il kit Coat-A-Count DHEA (Vedi tabella "Interextraction")

Specificit : Il kit   altamente specifico per il DHEA con una crossreattivit  relativamente bassa verso altri steroidi presenti in natura o farmaci che possano essere presenti nei campioni. I campioni estratti dissolti nel calibratore zero sono stati utilizzati per questo esperimento eccetto i composti contrassegnati dall'asterisco (*) che sono stati dosati non estratti e dissolti nel calibratore zero. (Vedi tabella "Specificity".)

Linearit : I campioni sono stati dosati a varie diluizioni. (Vedi tabella "Linearity".)

Recupero 1: I campioni sono stati diluiti 1:19 con tre soluzioni di DHEA (50, 100 e 200 ng/mL). (Vedi tabella "Recovery 1".)

Recupero 2: in un esperimento simile, tre soluzioni ulteriormente diluite (D, E ed F) sono state preparate a livelli di 100, 200 e 400 ng/mL. I valori attesi sono stati calcolati aggiungendo il 95% della concentrazione del valore non diluito al 5% della concentrazione di soluzione diluita. (5, 10 e 20 ng/mL, rispettivamente). (Vedi tabella "Recovery 2").

Bilirubina: La presenza di bilirubina in concentrazioni fino a 200 mg/L non ha nessun effetto sui risultati entro il range di precisione del dosaggio.

Lipemia: E' stato stabilito che una grossolana iperchilomicronemia pu  interferire con alcuni immunodosaggi. Questa interferenza pu  essere evitata isolando lo strato infranatante chiaro prima del dosaggio. Per eseguire questa operazione manualmente, acquisire il campione lipemico con una pipetta e sigillare il puntale con Parafilm. Lasciar riposare la pipetta finch  il liquido non affiori in superficie. Quindi asciugare e dosare lo strato chiaro del siero. In alternativa, pu  essere utilizzata una centrifuga ad aria. (Non   stato stabilito se altri tipi di lipemia interferiscano).

Tipo di Campione Alternativo: Per determinare l'effetto di campioni alternativi,   stato prelevato del sangue da 33 volontari in provette semplici, eparinizzate e EDTA vacutainer. Tutti i campioni si sono analizzati mediante il

procedimento di DHEA dell'Coat-A-Count, con i risultati seguenti.

(Eparina) = 0,84 (Siero) + 1,0 ng/mL
 $r = 0,90$

(EDTA) = 0,92 (Siero) + 0,2 ng/mL
 $r = 0,95$

Valore medio:

3,8 ng/mL (Eparina)

3,4 ng/mL (Siero)

3,4 ng/mL (EDTA)

I valori di siero avevano un range da 0,2 a 13,7 ng/mL. Sia i campioni eparinizzati che di plasma EDTA hanno presentato una variabilità — cioè — discrepanze relative ai risultati sui campioni di siero degli stessi individui — superiori alla variabilità osservata nello studio di precisione inter-estrazione. Su questa base, si consiglia di prelevare campioni di siero.

Comparazione di Metodi: Il kit

Coat-A-Count DHEA è stato comparato ad un altro radioimmunosaggio per il DHEA disponibile in commercio su 90 campioni di siero. Le statistiche di seguito illustrate mostrano una buona correlazione tra queste due metodologie.

(CAC) = 1,17 (Kit A) + 0,26 ng/mL
 $r = 0,94$

Valore Medio:

2,0 ng/mL (Coat-A-Count)

1,5 ng/mL (Kit A)

Effetto degli Acidi Grassi Liberi: Per verificare l'effetto di acidi grassi non esterificati (NEFA), sono state liofilizzate aliquote di tre campioni, ricostituite e quindi dosate con il dosaggio Coat-A-Count DHEA. Sono state utilizzate soluzioni acquose contenenti 0, 2,5, 5, e 10 mmol/L di acido oleico per la ricostituzione. I risultati dimostrano che l'acido oleico — ad elevate concentrazioni fisiologiche — ha un effetto significativo *in vitro* sul dosaggio.

Effetto delle Proteine: Per simulare le concentrazioni di varie proteine, sono stati effettuati esperimenti nei quali aliquote da 1,0 mL di un pool di sieri umani sani strippati sono state congelate e quindi ricostituite con vari volumi d'acqua (0,5, 0,67, 1,0, 1,5, 2,0 mL). Ciascuna aliquota ricostituita è stata quindi dosata con il dosaggio Coat-A-Count DHEA. Attenzione che le aliquote ricostituite con metà del volume originario rappresentano una concentrazione di proteine estremamente

elevata, nell'ordine di 14 g/dL. (Il fattore da correggere per il volume di ricostituzione è tabulato di seguito). I risultati indicano che le concentrazioni totali di proteine che sono estremamente basse possono avere un effetto clinico significativo sul dosaggio Coat-A-Count DHEA. (Vedi tabella "Protein Effect".)

Assistenza Tecnica

All'Estero: Contattare il proprio Distributore Nazionale.

Il Sistema Qualità della Diagnostic Products Corporation è certificato secondo le norme ISO 13485:2003.

Português

Coat-A-Count DHEA

Utilização: O Coat-A-Count DHEA é um radioimunoensaio ^{125}I de fase sólida concebido para a medição quantitativa dos níveis de dehidroepiandrosterona (DHEA) no soro. Destina-se unicamente a uso de diagnóstico *in vitro*.

Números de catálogo: **TKDH1** (75 tubos), **TKDH2** (150 tubos).



O kit de 75 tubos contém menos de 5 microcuries (185 quilibecquerels) de DHEA ^{125}I radioactivo; e o kit de 150 tubos contém menos de 10 microcuries (370 quilibecquerels).

Sumário e explicação do teste

A dehidroepiandrosterona (DHEA) é um esteróide supra-renal que se apresenta frequentemente em elevados níveis de circulação em casos de crescimento anormal do cabelo (hirsutismo) e de virilização. A sua medição pode ser igualmente útil na avaliação da adrenarca e da puberdade tardia.

A DHEA em circulação tem origem quase sempre nas glândulas supra-renais. Embora seja produzida a um ritmo um pouco inferior ao do sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEA-SO₄), com o qual é perifericamente interconvertível, a DHEA apresenta uma semi-vida muito mais curta, mantendo por isso uma concentração no plasma quase mil vezes

inferior. A DHEA por si só é apenas ligeiramente androgénica, mas pode funcionar como precursora de androgénios mais potentes.

Os níveis de DHEA no plasma aumentam constantemente a partir aproximadamente do sétimo ano de vida, começando a diminuir gradualmente após os trinta anos. De acordo com a literatura de referência, o limite de referência superior para jovens adultos é aproximadamente de 10 ng/mL. Como o cortisol, a DHEA regista uma variação diurna, apresentando-se com a concentração mais elevada durante a manhã. Por outro lado, não apresenta qualquer variação significativa ao longo do período menstrual. Verifica-se uma redução moderada durante a gravidez. Ao contrário da testosterona, a DHEA não circula ligada à globulina de ligação às hormonas sexuais e, por isso, não é influenciada por alterações no nível desta proteína de transporte.

Princípio do Procedimento

O procedimento Coat-A-Count DHEA é um imunoensaio competitivo baseado em tubos revestidos com anticorpos. Em primeiro lugar, as amostras de paciente são preparadas em diclorometano, evaporadas até secar e colocadas novamente em suspensão com no calibrador zero. A DHEA marcada com ¹²⁵I compete então com a DHEA das preparações de paciente por locais de fixação de anticorpos. Uma vez decantados e contados os tubos, as concentrações de DHEA podem ser lidas directamente a partir da curva de calibração.

Reagentes para Pipetar: 1

Tempo de Incubação: 2 horas

Contagens Totais na Marcação com o lodo: aproximadamente 100 000 cpm

Precauções

Para uso de diagnóstico *in vitro*.

Reagentes: Conservar a 2–8°C num frigorífico destinado para materiais radioactivos. Eliminar de acordo com as leis aplicáveis.

Não utilize reagentes com prazo de validade expirado.

Alguns componentes fornecidos com este dispositivo podem conter matéria de origem humana e/ou outros ingredientes potencialmente perigosos que necessitem de algumas precauções.

Manipule com as devidas precauções todos os materiais capazes de transmitir doenças infecciosas. As matérias primas, obtidas de soro humano, foram testadas, revelando resultados negativos para a sífilis, para os anticorpos do vírus da imunodeficiência humana (HIV) 1 e 2; para o antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg) e para os anticorpos do vírus da hepatite C.

Azida de sódio foi adicionada como conservante; para evitar acumulações de azidas metálicas explosivas em canalizações de cobre e alumínio, os reagentes devem ser rejeitados no esgoto apenas se estiverem diluídos e forem lavados com grandes volumes de água.

Água: Utilize água destilada ou desionizada.

Radioactividade

Uma cópia da licença de uso de produtos radioactivos (específico ou geral) enviada pelo cliente, deve estar em poder da DPC antes do envio dos kits ou componentes contendo material radioactivo. Estes materiais radioactivos podem ser adquiridos por qualquer cliente que possua a necessária licença específica. Com uma licença generalista estes produtos radioactivos só podem ser adquiridos por médicos, veterinários na prática de medicina veterinária, laboratórios clínicos e hospitais. E somente para uso clínico *in vitro* ou testes laboratoriais não envolvendo administração externa ou interna do material radioactivo ou da sua radiação para o ser humano ou outros animais. A sua aquisição, receita, armazenamento, uso, transporte e eliminação estão sujeitas aos regulamentos e à licenciada Comissão de Regulação Nuclear ou do Estado respectivo de acordo com a lei em vigor.

Tratar os materiais radioactivos de acordo com a regulamentação da sua licença, específica ou generalista. De modo a minimizar a exposição à radiação deve o utilizador seguir as instruções da publicação do Departamento Nacional de

Padrões (*Utilização segura de materiais radioactivos*-Livro No. 92, publicado em Março de 1964) e publicações seguintes do Estado e Autoridades Federais.

Limpar os derrames prontamente e descontamine as superfícies afectadas. Evitar os aerossóis. Elimine os lixos radioactivos de acordo com a regulamentação da licença. As licenças generalistas (portadores da licença NRC 483) podem eliminar os lixos sólidos radioactivos como lixo não radioactivo depois de remover os rótulos. Licenças Específicas (Licença NRC 313) devem ter em conta o Capítulo 10 do artigo 20, do Código de Regulamentações Federais. Cada Estado deve referir a legislação em vigor aprovada para o seu território. As licenças generalistas podem eliminar os lixos radioactivos líquidos do tipo deste produto para um esgoto de laboratório. Os licenciados devem remover os rótulos dos frascos vazios de materiais radioactivos antes de os colocar no esgoto sólido. As licenças específicas podem eliminar pequenas quantidades de lixo radioactivo deste tipo de produto para o esgoto normal do laboratório. Ter em atenção as regulamentações em vigor para o seu laboratório.

Materiais fornecidos: Preparação inicial

Tubos Revestidos com Anticorpos de DHEA (TDH1)

Tubos de polipropileno revestidos com anticorpos para DHEA e embalados em saquetas de fecho hermético. Conservar refrigerado e protegido da humidade, selar os sacos cuidadosamente após cada abertura. Estável a 2–8°C até à data de validade inscrita na embalagem. Cor: castanho claro.

TKDH1: 75 tubos. **TKDH2:** 150 tubos.

¹²⁵I DHEA (TDH2)

DHEA iodada liofilizada. Reconstituir cada frasco com **80 mL** de água destilada. Estável, após a reconstituição, durante 30 dias a 2–8°C, ou até à data de validade inscrita no frasco. Não transferir o marcador para um recipiente de plástico.

TKDH1: 1 frasco. **TKDH2:** 2 frascos.

Tampão DHEA (DHC3)

100 mL de tampão, fornecido na forma líquida, pronto a usar. Utilizado para suspender novamente as preparações e serve igualmente como calibrador zero (Calibrador A) Guardar o tampão em recipiente fechado. Estável a uma temperatura de 2–8°C durante 30 dias depois de aberto.

TKDH1: 1 frasco. **TKDH2:** 1 frasco.

Calibradores DHEA (DHC4–9)

Um conjunto de seis frascos, rotulados de B a G, contendo níveis diferentes de DHEA na mesma matriz utilizada para o Tampão DHEA. Cada frasco contém 3,0 mL. Estável a uma temperatura de 2–8°C durante 30 dias depois de aberto.

TKDH1: 1 conjunto. **TKDH2:** 1 conjunto.

Os calibradores representam respectivamente, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10 e 30 nanogramas de DHEA por mililitro (ng/mL); o que equivale a 1,7, 3,5, 8,7, 17,3, 34,7 e 104 nanomoles por litro (nmol/L). Os pontos de calibração intermédios podem ser obtidos misturando os calibradores nas proporções adequadas. A duração dos calibradores pode ser prolongada por congelamento. Aliquotar, se necessário, em tubos de vidro silanizado bem fechados, a fim de evitar o descongelamento e congelamento repetidos.

Materiais necessários mas não fornecidos

Contador gama — compatível com tubos standard 12x75 mm

Agitador Vortex

Preparação dos Reagentes

Proveta graduada: 100 mL

Preparação

Pipetas de vidro: 1,0 mL e 6,0 mL

Tubos de 16x125 mm com tampas com rebordo de Teflon. Os tubos devem ser de vidro de borossilicato de alta qualidade. (Não utilizar plástico.) Para evitar o risco de contaminação, usar utensílios de vidro “pré-lavados” ou aplicar uma lavagem final com 0.1 N HCl, seguido de diclorometano.

Rotador mecânico, com capacidade para 15 a 20 rotações por minuto.

Aspirador

Evaporador com exaustor e placa de aquecimento a 37°C ou banho-maria.

Azoto comprimido

Banho ultrassónico

Diclorometano (cloreto de metileno) com pelo menos qualidade espectrofotométrica

Radioimunoensaio

Tubos lisos de polipropileno 12x75 mm — para utilização como tubos NSB, disponíveis na DPC

Micropipetas com pontas descartáveis: 200 µL e 1 000 µL.

Banho-maria capaz de manter a temperatura de 37°C — não é adequada a utilização de um forno nem de uma placa de aquecimento.

Dispositivo de decantação de espuma — disponível na DPC

Papel milimétrico logit-log — disponível na DPC (Números de catálogo: ZP797)

Um controlo de três níveis de imunoensaio baseado em soro humano, contendo DHEA como um dos mais de 25 constituintes submetidos a ensaio, está disponível na DPC. CON6).

Colheita

O paciente não necessita dieta. Não são necessárias preparações especiais. Colher sangue por punção venosa⁶ para tubos lisos e separar o soro das células, registando a hora e a data da colheita.

Antes da preparação, deixar que as amostras atinjam a temperatura ambiente (15–28°C) e misturar por agitação ou inversão *suaves*. Aliquotar se necessário para evitar repetidos congelamentos/descongelamentos. Não descongelar as amostras por aquecimento em banho-maria.

Recomenda-se o uso de uma ultra centrífuga para clarear amostras lipémicas.

Não é adequada a utilização de amostras lipémicas.

Os tubos para colheita sanguínea de diferentes fabricantes, podem originar diferentes valores, dependendo dos materiais e aditivos, incluindo gel ou barreiras físicas, activadores do coágulo e/ou anti coagulantes. Coat-A-Count DHEA não foram ainda testados com

todas as possíveis variações originadas pelos tipos de tubos. Consultar a secção Tipos de Amostras Alternativas para obter detalhes sobre os tubos que foram testados.

Volume de Amostra: 1,0 mL de soro por tubo.

Armazenamento: 2 dias a 2–8°C, ou 2 meses congelado a –20°C.

Preparação das Amostras

Atenção: O diclorometano (cloreto de metileno) é um solvente orgânico volátil e inflamável. Efectuar a fase de evaporação sob um exaustor. Evitar chamas expostas e não pipetar com a boca. O diclorometano tem de apresentar pelo menos uma qualidade espectrofotométrica.

De notar que só as amostras de paciente e os controlos necessitam de preparação antes do ensaio. *Não preparar os calibradores.*

- 1 Rotular um tubo de vidro 16x125 mm para cada controlo e amostra de paciente.

Os tubos devem ser de vidro de borosilicato de alta qualidade. (Não utilizar plástico.) Para evitar o risco de contaminação, usar utensílios de vidro “pré-lavados” ou aplicar uma lavagem final com 0,1 N HCl, seguido de diclorometano.

- 2 Pipetar **1,0 mL** de cada amostra de paciente e controlo para os tubos preparados.
- 3 **Preparação:** Adicionar **10 mL** de diclorometano a cada tubo. Tapar bem.
- 4 Misturar por inversão utilizando um rotador mecânico durante **60 minutos**.

O método preferencial é a rotação suave de ponta a ponta de 15 a 20 rotações por minuto.

- 5 Centrifugar durante **5 minutos** a cerca de 1500xg, para separar as duas camadas.

Qualquer amostra parcialmente emulsionada deve ser vigorosamente agitada e novamente centrifugada.

- 6 Remover a *maior parte* da camada superior, tendo o cuidado de não agitar a camada intermédia.

Utilizar um aspirador de torneira de água. (Aspirar até à camada intermédia pode conduzir à contaminação da camada de diclorometano por contacto com resíduos da camada de soro.)

- 7 **Evaporação:** Transferir **6,0 mL** da camada inferior (diclorometano) para um tubo de vidro limpo e evaporar até secar completamente, sob um fluxo suave de azoto a 37°C.

- 8 Uma vez seco, suspender novamente as preparações com **0,6 mL** de Tampão DHEA (Calibrador A) Turbilhonar exaustivamente ou submeter a tratamento por ultra-sons. Passar ao procedimento de radioimunoensaio, da forma descrita em seguida.

As preparações reconstituídas podem ser armazenadas a -20°C. As preparações reconstituídas a partir de amostras com concentrações de DHEA superiores à do calibrador mais elevado (30 ng/mL) podem ser ainda diluídas com Tampão DHEA antes do ensaio.

Técnica de Radioimunoensaio

Todos os componentes devem estar à temperatura ambiente (15–28°C) antes de usar. Os calibradores de B a G e o Tampão DHEA (Calibrador A) estão prontos a usar. Só os controlos e as amostras de paciente têm de ser submetidos ao procedimento de preparação acima descrito.

- 1 **Tubos lisos:** Rotular quatro tubos de polipropileno (não revestidos) de 12x75 mm – T (contagens totais) e NSB (ligações não específicas) em duplicado.

Dado que a ligação não específica no procedimento Coat-A-Count é caracteristicamente baixa, os tubos NSB podem ser omitidos com segurança sem comprometer a precisão ou o controlo de qualidade.

Tubos revestidos: Rotular catorze tubos revestidos com anticorpos de DHEA com A (ligação máxima) e com B a G, em duplicado. Rotular tubos adicionais

revestidos com anticorpos, também em duplicado, para controlos e amostras de paciente.

Calibrador	ng/mL	nmol/L
A (MB)	0	0
B	0,5	1,7
C	1,0	3,5
D	2,5	8,7
E	5,0	17,3
F	10	34,7
G	30	104

- 2 Pipetar **200 µL** do calibrador zero A (Tampão DHEA) para os tubos NSB e A, e **200 µL** de cada calibrador diferente de zero para os tubos identificados como B a G. Pipetar **200 µL** de cada controlo e amostra de paciente para os tubos preparados.

Pipetar directamente para a base dos tubos.

As preparações reconstituídas a partir de amostras com concentrações de DHEA superiores à do calibrador mais elevado (30 ng/mL) podem ser ainda diluídas com Tampão DHEA antes do ensaio.

É boa prática usar uma pipeta de pontas descartáveis, mudando a ponta entre as amostras de modo a evitar contaminação.

- 3 Adicionar **1,0 mL** de DHEA ¹²⁵I a cada tubo. Turbilhonar.

Adicionar o marcador I 125 no espaço de 10 minutos após pipetar os calibradores, controlos e amostras. Deixar os tubos T para as contagens (nº 6); não necessitam mais processamento.

- 4 Incubar durante **2 horas a 37°C**.

- 5 Decantar vigorosamente.

Removendo todo o líquido remanescente melhora-se bastante a precisão. Usando um dispositivo de decantação de espuma, decantar o conteúdo de todos os tubos (à excepção dos tubos T) e deixá-los escorrer durante 2 ou 3 minutos. Eliminar todas as gotas residuais com papel absorvente.

- 6 Contar **1 minuto** em contador gama.

Cálculo dos Resultados

Para obter resultados de concentrações numa representação logit-log da curva de calibração, deve em primeiro lugar calcular-se para cada par de tubos a média de NSB-contagens por minuto corrigidas:

Contagens reais = (Média CPM) minutos (Média NSB CPM)

Determine a ligação de cada par de tubos como percentagem do máximo de ligação (MB), com o NSB-contagens por minuto corrigidas dos tubos A tidas como 100%:

Percentagem de Ligação = (Contagens reais / Contagens **MB** reais) × 100

(O cálculo pode ser simplificado omitindo a correcção para a ligação não específica; amostras dentro da gama de calibração originam virtualmente os mesmos resultados quando a Percentagem de Ligação é calculada directamente da Média de CPM.)

Usando um papel milimétrico logit-log, represente a Percentagem de Ligação no eixo vertical (probabilidade) contra a Concentração no eixo horizontal (logaritmico) para cada um dos calibradores diferentes de zero, e representar uma linha recta em função da trajectória destes pontos. Resultados de amostras desconhecidas podem então ser lidas nessa recta por interpolação.

É boa prática verificar os resultados pela concordância entre as réplicas, e construir um gráfico da curva de calibração (mesmo que os cálculos sejam efectuados por computador) para verificação visual da aplicabilidade da transformação usada e como forma para detectar pontos de calibração que se afastem. Também se recomenda guardar estas curvas:

T = Contagens Totais (como contagens por minuto)

%NSB = $100 \times (\text{Média Contagens NSB} / \text{Contagens Totais})$

%MB = $100 \times (\text{Contagens reais} / \text{Contagens Totais})$

E os 20, 50 e 80 por cento "intercepta," onde

20% = Concentração a 20 por cento de Ligação, etc.

Note que para outras perspectivas, como a implementação de uma logística de 4 parâmetros, também é aceitável. Ver Dudley RA, et al. Guidelines for immunoassay data reduction. Clin Chem 1985;31:1264-71.

Exemplo de Ensaio: Apenas para ilustração, não para calcular resultados de outro ensaio. (Ver tabela "Example Run".)

Controlo de Qualidade

Os controlos ou os pools de soro com pelo menos dois níveis de concentração de DHEA — baixo e alto — devem ser submetidos por rotina a ensaio como amostras desconhecidas.

Os resultados dos pacientes devem apenas ser reportados se os resultados dos controlos para este ensaio estiverem dentro dos critérios de aceitação estabelecidos pelo laboratório.

É boa prática laboratorial registar para cada ensaio o número do lote dos componentes usados, bem como as datas de quando foram primeiro reconstituídas ou abertas. Recomenda-se registar os valores diários em gráfico — como descrito, por exemplo, in Westgard JO, et al. A multi-rule chart for quality control. Clin Chem 1981;27:493-501. Note que amostras repetidas podem servir como ferramenta adicional para monitorizar a precisão inter-ensaio, e que pares de controlos podem ser colocados ao longo do ensaio para ajudar a verificar a ausência de variação significativa.

Ensaio sem Solventes:

Para obter resultados fiáveis, o diclorometano tem de apresentar pelo menos uma qualidade espectrofotométrica e a fonte de azoto, se utilizada, não pode contaminar os tubos de evaporação com óleo ou humidade. (A utilização de um ardil contendo sulfato de cálcio ajuda a prevenir essa contaminação.) Para verificar a pureza destes reagentes, recomendamos a realização periódica de um "ensaio sem solventes". Este procedimento implica a preparação e o ensaio com água destilada ou esterilizada, da forma indicada para as amostras de paciente, de modo a confirmar que produz uma concentração aparente de DHEA igual ou inferior ao limite de detecção do ensaio.

Valores de Referência

Foi efectuado um estudo preliminar de gama de referência com o procedimento Coat-A-Count DHEA em amostras de soro de 33 voluntários adultos saudáveis, incluindo 19 mulheres e 14 homens. Os resultados variaram entre 0,2 e 9,8 ng/mL com um valor médio de 2,5 ng/mL.

Noventa e um por cento dos resultados foram inferiores a 6,0 ng/mL. De notar que estes resultados foram obtidos para o tipo de amostra recomendado, ou seja, soro.

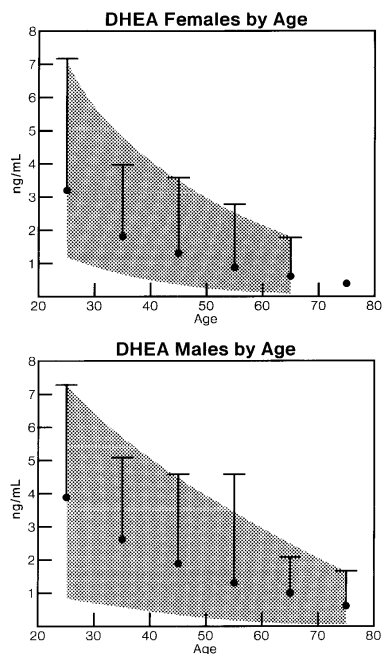
Realizou-se outro estudo de gama de referência num hospital de grandes dimensões em 136 mulheres e 155 homens, sendo conhecida a idade de todos. A tabela e os quadros que se seguem apresentam os resultados resumidos por sexo e idade. Nos gráficos, os círculos preenchidos representam as médias (percentis 50), enquanto as barras "T" representam os percentis 95. As zonas sombreadas representam uma suavização dos percentis 5 e 95 observados, de acordo com um modelo simplificado do comportamento da DHEA em circulação em função da idade.

Mulheres

Faixa Etária	n	perc. 5	perc. 50	perc. 95
10-19	2	—	3,2	—
20-29	23	1,1	1,6	7,2
30-39	29	0,55	1,3	4,0
40-49	29	0,40	0,85	3,6
50-59	18	0,3	0,7	2,8
60-69	21	0,1	0,3	1,8
70-79	8	0,1	0,25	1,5
80-89	6	—	—	—

Homens

Faixa Etária	n	perc. 5	perc. 50	perc. 95
10-19	6	—	1,1	—
20-29	17	1,0	3,9	7,3
30-39	21	0,75	2,6	5,1
40-49	23	0,7	1,9	4,6
50-59	29	0,55	1,7	4,6
60-69	37	0,4	1,0	2,1
70-79	18	0,1	0,6	1,7
80-89	4	—	0,3	—



DHEA Females by Age: DHEA nas mulheres, por idade: DHEA Males by Age: DHEA nos homens, por idade:

Considere estes limites *apenas como directrizes*. Cada laboratório deve estabelecer os seus próprios valores de referência.

Características do Ensaio

Ver as Tabelas e os Gráficos para dados *representativos* do desempenho do kit Coat-A-Count DHEA. Os resultados de DHEA nas secções são expressos em nanogramas por mililitro (ng/mL). Como a massa molecular da DHEA é de 288,4 daltons, para converter para unidades S.I. — nanomoles por litro (nmol/L) — multiplicar por 3,467:

Factor de conversão:

ng/mL x 3,467 → nmol/L

Calibração: 0,5 – 30 ng/mL

(1,7 – 104 nmol/L)

Sensibilidade Analítica: 0,04 ng/mL

Precisão Intra-ensaio (dentro do ensaio): Foram calculadas estatísticas para amostras a partir dos resultados de 20 pares de tubos num único ensaio.

(Consulte a tabela "Precisão Intra-ensaio".)

Interpretação: Foram calculadas estatísticas para três amostras preparadas vinte vezes individualmente e, em seguida, submetidas a ensaio com o kit Coat-A-Count DHEA. (Ver tabela "Interpretação".)

Especificidade: Este kit é altamente específico para DHEA, com uma reactividade cruzada relativamente baixa a outros esteróides naturais ou fármacos terapêuticos que possam estar presentes nas amostras de paciente. Foram utilizadas nesta experiência amostras preparadas dissolvidas com o calibrador zero, à excepção dos compostos assinalados com asterisco (*), que foram testados sem preparação e dissolvidos com o calibrador zero. (Ver tabela de "Specificity".)

Linearidade: As amostras foram doseadas sob várias diluições. (Ver tabela "Linearidade".)

Recuperação 1: Foram submetidas a ensaio amostras a que foram adicionadas três soluções de DHEA de 1 para 19 (50, 100 e 200 ng/mL). (Ver tabela "Recuperação 1".)

Recuperação 2: Numa experiência semelhante, foram preparadas mais três soluções de adição (D, E e F) com os níveis de 100, 200 e 400 ng/mL. Os valores esperados foram calculados somando 95% do valor sem adição a 5% da concentração da solução de adição (5, 10 e 20 ng/mL, respectivamente). (Ver tabela "Recuperação 2".)

Bilirrubina: A presença de bilirrubina conjugada em concentrações até 200 mg/L não tem efeito em resultados, dentro da precisão do ensaio.

Lipémia: Determinou-se que uma hiperquilomicronémia grave pode interferir nalguns imunoensaios. Esta interferência pode ser evitada isolando a camada lípida de infranadante antes do ensaio. Para efectuar este procedimento manualmente, retirar a amostra lipémica para uma pipeta e selar a ponta com película de comparação. Deixar a pipeta em repouso até os lípidos flutuarem até à superfície. Seguidamente, escorrer e submeter a ensaio a camada lípida de soro. Em alternativa, pode ser utilizada

uma máquina pneumática. (Não está estabelecido se outros tipos de lipémia também podem interferir.)

Tipo de amostra alternativa: Para determinar o efeito de amostras alternativas, foi colhido sangue de 33 voluntários em tubos secos, com EDTA, e tubos de vacum heparinizados. Todas as amostras foram ensaiadas pelo método Coat-A-Count DHEA, com os seguintes resultados.

(Heparina) = 0,84 (Soro) + 1,0 ng/mL
 $r = 0,90$

(EDTA) = 0,92 (Soro) + 0,2 ng/mL
 $r = 0,95$

Means:
3,8 ng/mL (Heparina)
3,4 ng/mL (Soro)
3,4 ng/mL (EDTA)

Foram registados valores séricos numa gama entre 0,2 e 13,7 ng/mL. Tanto o plasma heparinado como o plasma EDTA revelaram variabilidade — ou seja, discrepâncias relativamente aos resultados das amostras de soro dos mesmos indivíduos — superior à variabilidade observada no estudo de precisão da interextracção. Com base nisto, recomenda-se que as amostras sejam recolhidas como soro.

Comparação de Métodos: O kit Coat-A-Count DHEA foi comparado com outro radioimunoensaio de DHEA disponível no mercado em 90 amostras de soro de pacientes. As estatísticas apresentadas em seguida demonstram uma boa correlação entre estas duas metodologias.

(CAC) = 1,17 (Kit A) + 0,26 ng/mL
 $r = 0,94$

Médias:
2,0 ng/mL (Coat-A-Count)
1,5 ng/mL (Kit A)

Efeito dos Ácidos Gordos Livres: Para investigar o efeito dos ácidos gordos não esterificados (NEFA), foram liofilizadas, reconstituídas e, seguidamente, submetidas a ensaio com o procedimento Coat-A-Count DHEA aliquotas de três amostras. Para a fase de reconstituição, foram usadas soluções aquosas contendo 0, 2,5, 5, e 10 mmol/L de ácido oléico. Os resultados demonstraram que o ácido oléico — em concentrações fisiologicamente altas — não tem um

efeito *in vitro* significativo no procedimento.

Efeito das Proteínas: Para simular diversas concentrações de proteínas, foram efectuadas experiências em que alíquotas listadas de 1,0 mL de pool de soro humano saudável foram submetidas ao processo de congelamento-secagem e, em seguida, reconstituídas com diversos volumes de água (0,5, 0,67, 1,0, 1,5, 2,0 mL). Cada alíquota reconstituída foi então testada através do procedimento Coat-A-Count DHEA. Note-se que as alíquotas reconstituídas com metade do volume original representam uma concentração proteica extremamente elevada, na ordem dos 14 g/dL. (O factor de correcção do volume de reconstituição encontra-se representado abaixo em tabela.) Estes resultados indicam que as concentrações proteicas totais extremamente baixas podem ter um efeito clinicamente significativo sobre o ensaio Coat-A-Count DHEA. (Ver tabela "Efeito das Proteínas".)

Assistência Técnica

Por favor contacte o seu Distribuidor Nacional.

O Sistema de Qualidade da Diagnostic Products Corporation está registado sob ISO 13485:2003.



Diagnostic Products Corporation
Corporate Offices
5210 Pacific Concourse Drive
Los Angeles, CA 90045-6900
USA

2005-03-18

PITKDH – 4



EC REP DPC Biermann GmbH
61231 Bad Nauheim
Germany
+49 -6032-994-00