

COAT-A-COUNT®

DHEA-SO₄

DPC®

Coat-A-Count® DHEA-SO₄

English

Intended Use: Coat-A-Count DHEA-SO₄ is a radioimmunoassay designed for the quantitative measurement of dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-SO₄) in serum and plasma. It is intended strictly for *in vitro* diagnostic use.

Catalog numbers: **TKDS1** (100 tubes), **TKDS2** (200 tubes), **TKDS5** (500 tubes), **TKDSX** (1000 tubes)



The 100-tube kit contains less than 4 microcuries (148 kilobecquerels) of radioactive ¹²⁵I DHEA-SO₄; the 200-tube kit contains less than 8 microcuries (296 kilobecquerels); the 500-tube kit contains less than 20 microcuries (740 kilobecquerels); and the 1000-tube kit contains less than 40 microcuries (1480 kilobecquerels).

Summary and Explanation

Measurement of dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-SO₄, DHEAS), an adrenal steroid, is important to investigations of abnormal hair growth (hirsutism) and balding (alopecia) in women.^{1,4,7} It is also of value in the assessment of adrenarche and delayed puberty.^{3,4}

The DHEA-SO₄ in circulation originates almost entirely from the adrenals, though in men some may also derive from the testes, partly accounting for the sex difference which emerges at about age 15.^{11,17} On the other hand, this hormone is not produced by the ovaries even under pathological conditions.^{2,16} In itself, DHEA-SO₄ is only weakly androgenic, but it can metabolize to more potent androgens like androstenedione and testosterone, and thus be indirectly a cause of hirsutism or virilization.^{1,16}

Plasma levels of DHEA-SO₄ increase steadily from about the seventh year of life, then gradually decline after the third decade.^{11,16,17} According to the literature, the upper limit of normal for young adults is approximately 300 µg/dL for women, and 500 µg/dL for men.⁸ Pregnancy and

oral contraceptives induce a moderate decrease.^{4,16}

DHEA-SO₄ is secreted into the bloodstream at a rate only somewhat greater than DHEA, but because of its much slower turnover — DHEA-SO₄ has a half-life of nearly a full day — it maintains a plasma level almost a thousandfold higher.^{4,13,16} Unlike cortisol, DHEA-SO₄ does not exhibit significant diurnal variation.^{4,15} Unlike testosterone, it does not circulate bound to sex hormone-binding globulin and hence is not influenced by alterations in the level of this carrier protein.¹⁶ Its abundance, together with its within-day and day-to-day stability, makes it an excellent direct indicator of adrenal androgen output — superior, certainly, to the measurement of urinary 17-ketosteroids in this context.^{1,2,4,8}

Accordingly, DHEA-SO₄ is often assayed in conjunction with free testosterone as an initial screen for hyperandrogenism in hirsutism.^{5,9} At least one of these two hormones is likely to be elevated in the great majority of cases — reportedly over 80 percent of the time.⁹ Sometimes DHEA-SO₄ is the only hormone circulating at a level above normal, and is apparently more likely to be elevated during the early stages of hirsutism than most other androgens.⁹

High DHEA-SO₄ levels are often encountered in the polycystic ovary syndrome, showing that adrenal hyperandrogenism is a fairly typical facet of this syndrome.² Elevated plasma levels which — over the course of two weeks or so — are dexamethasone-suppressible may also result from adrenal hyperplasia.^{4,6,9} Extremely high levels (greater than 700 or 800 µg/dL) in women are suggestive of a hormone-secreting adrenal tumor.¹³ (By contrast, DHEA-SO₄ levels are typically normal in the presence of ovarian tumors.¹)

Principle of the Procedure

In the Coat-A-Count DHEA-SO₄ procedure, ¹²⁵I-labeled DHEA-SO₄ competes with DHEA-SO₄ in the patient sample for sites on antibody-coated tubes. After incubation, separation of bound from

free is achieved by simply decanting. The tube is then counted in a gamma counter, the counts being inversely related to the amount of DHEA-SO₄ present in the patient sample. The quantity of DHEA-SO₄ in the sample is determined by comparing the counts to a calibration curve.

Reagents to Pipet: 1

Total Incubation Time: 30 minutes

Total Counts at Iodination:
approximately 50,000 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

DHEA-SO₄ Ab-Coated Tubes (TDS1)

Polypropylene tubes coated with antibodies to DHEA-SO₄ 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: light pink.

TKDS1: 100 tubes. **TKDS2:** 200 tubes.
TKDS5: 500 tubes. **TKDSX:** 1000 tubes.

125I DHEA-SO₄ (TDS2)

Iodinated DHEA-SO₄ in lyophilized form, with preservative. Reconstitute each vial with **110 mL** of distilled or deionized water. Cap securely and mix by *gentle* inversion. Stable at 2–8°C for 30 days after opening, or until the expiration date marked on the vial. *Do not transfer the tracer to a plastic container.*

TKDS1: 1 vial. **TKDS2:** 2 vials.

TKDS5: 5 vials. **TKDSX:** 10 vials.

DHEA-SO₄ Calibrators (TDS3–9)

Seven vials, labeled A through G, of protein-based calibrators in lyophilized form, with preservative. Reconstitute the zero calibrator A with **3.0 mL** distilled or deionized water and the remaining calibrators B through G with **1.0 mL**. Stable at 2–8°C for 30 days after opening. For longer storage, aliquot into tightly capped glass or polypropylene tubes and freeze at –20°C.

TKDS1: 1 set. **TKDS2:** 1 set.

TKDS5: 2 sets. **TKDSX:** 3 sets.

The calibrators contain, respectively, 0, 5, 20, 50, 200, 500 and 1,000 micrograms of DHEA-SO₄ per deciliter (µg/dL); equivalently: 0, 0.14, 0.54, 1.36, 5.4, 13.6 and 27.1 micromoles per liter (µmol/L). Intermediate calibration points may be obtained by mixing calibrators in suitable proportions.

Materials Required But Not Provided

Gamma counter – compatible with standard 12×75 mm tubes

Vortex mixer

Reagent Preparation

Graduated cylinder: 110 mL

Volumetric pipets: 1.0 mL and 3.0 mL

Distilled or deionized water

Radioimmunoassay

Plain 12×75 mm polypropylene tubes — for use as NSB tubes, available from DPC

Micropipets: 50 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-SO₄ 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 venipuncture¹⁹ into plain tubes, and separate the serum from the cells, noting the time of collection. EDTA plasma is also suitable for this assay. (See the section on Alternate Sample Type.)

Studies of nonesterified fatty acid (NEFA) show that oleic acid has a significant *in vitro* effect on the assay at physiologically high concentrations.

An ultracentrifuge is recommended to clear lipemic samples.

Hemolyzed samples may indicate mistreatment of a specimen before receipt by the laboratory; hence the results should be interpreted with caution.

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-SO₄ 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: 50 µL per tube.

Storage: 2 days at 2–8°C in glass or polypropylene tubes, or 2 months at –20°C.¹⁸ Before assay, 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.

Radioimmunoassay Procedure

All components must be at room temperature (15–28°C) before use.

- 1 Plain Tubes:** Label four plain (uncoated) 12×75 mm polypropylene

Coat-A-Count DHEA-SO₄ (PITKDS-4, 2005-03-18)

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-SO₄ Ab-Coated Tubes A (maximum binding) and B through G in duplicate. Label additional DHEA-SO₄ Ab-Coated Tubes, also in duplicate, for controls and patient samples.

Calibrators	µg/dL	µg/mL	µmol/L
A (MB)	0	0	0
B	5	0.05	0.14
C	20	0.2	0.54
D	50	0.5	1.36
E	200	2	5.4
F	500	5	13.6
G	1,000	10	27.1

- 2 Pipet **50 µL** of the zero calibrator A into the NSB and A tubes, and **50 µL** of each remaining calibrator, control and patient sample into the tubes prepared. **Pipet directly to the bottom.**

Patient samples expected to contain DHEA-SO₄ concentrations greater than the highest calibrator (1,000 µg/dL) should be diluted in the zero calibrator 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-SO₄ to every tube. Vortex briefly and gently.

No more than ten minutes should elapse during the dispensing of the tracer. If a repeating pipet with a plastic syringe is used, rinse it twice with the tracer before dispensing. Set the T tubes aside for counting (at step 6); they require no further processing.

- 4 Incubate for 30 minutes at 37°C.

Use a waterbath; neither an oven nor a heat block is suitable.

- 5 Decant thoroughly.

Removing all visible moisture will greatly enhance precision. Decant the contents of all tubes (except the T tubes) using a foam decanting rack, 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 × (Average NSB Counts / Total Counts)

%MB = 100 × (Net Counts / 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-SO₄ 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.

Expected Values

Reference range studies were conducted at two institutions using the Coat-A-Count DHEA-SO₄ kit on a total of 202 adults. Tabulated below are the median and range for the combined data, the range representing the central 95 percent of the observations.

	Median	Range (Central 95%)	<i>n</i>
Females	170 µg/dL	35 – 430 µg/dL	132
Males	280 µg/dL	80 – 560 µg/dL	70

In addition, a total of 74 pregnancy and postpartum samples were analyzed. The results, as expected, showed a progressive decline: median values for the

first and third trimesters and for one day postpartum were 230, 105 and 65 µg/dL, respectively.

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 following table and graphs. 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-SO₄ as a function of age.

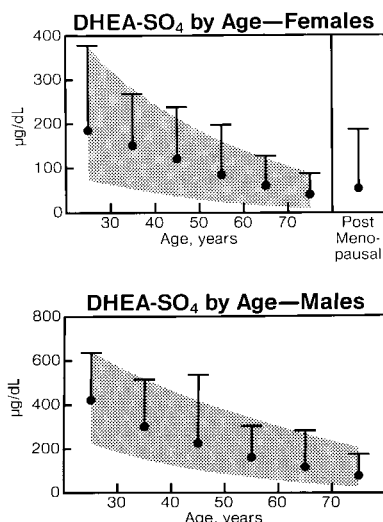
Results of a previous study by the same laboratory on 60 postmenopausal samples are also summarized in the following table and graphs.

Age Group	<i>n</i>	5 th %ile	50 th %ile	95 th %ile
Females				
10–19	2	—	140	—
20–29	23	65	185	380
30–39	29	45	150	270
40–49	29	32	120	240
50–59	18	26	85	200
60–69	21	13	50	130
70–79	8	17	40	90
80–89	6	—	26	—
Post-menopausal	60	10	55	190
Males				
10–19	6	—	215	—
20–29	17	280	420	640
30–39	21	120	300	520
40–49	23	95	250	530
50–59	29	70	160	310
60–69	37	42	130	290
70–79	18	28	80	175
80–89	4	—	36	—

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

See also "DHEA-SO₄ by Age: Males" and "DHEA-SO₄ by Age: Females" 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-SO₄ as a function of age.



Performance Data

See Tables and Graphs for data representative of the Coat-A-Count DHEA-SO₄ kit's performance. Results are expressed as micrograms of DHEA-SO₄ per deciliter (µg/dL).

Conversion Factor:

µg/dL × 0.02714 → µmol/L

Calibration Range: 5 – 1,000 µg/dL
(0.14 – 27 µmol/L)

Analytical Sensitivity: 1.1 µg/dL.

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.)

Interassay Precision (Run-to-Run):

Statistics were calculated for samples from the results of pairs of tubes in 24 different assays. (See "Interassay Precision" table.)

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

Recovery: Samples spiked 1 to 19 with three DHEA-SO₄ solutions (1,452, 3,046

and 4,820 µg/dL) were assayed. (See "Recovery" table.)

Specificity: The Coat-A-Count DHEA-SO₄ antiserum is highly specific for DHEA-SO₄, with a relatively low crossreactivity to other naturally occurring steroids and drugs that may be present in patient samples. (See "Specificity" table.)

End-of-Run Effect: None up to approximately 250 tubes. (See "End-of-Run Effect" table.)

Protein Effect: To simulate various protein concentrations, experiments were performed in which 2.0 mL aliquots of a human serum pool were freeze-dried and then reconstituted with various volumes of water. Each reconstituted aliquot was then assayed by the Coat-A-Count DHEA-SO₄ assay procedure. Note that aliquots reconstituted with half the original volume represent an extremely high protein concentration, on the order of 14 g/dL. (The factor to correct for reconstitution volume is tabulated.) These results indicate that even wide variations in protein have relatively little effect on the Coat-A-Count DHEA-SO₄ assay. (See "Protein Effect" table.)

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-SO₄ 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.

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

Hemolysis: Presence of packed red blood cells in concentrations up to 30 µL/mL has no effect on results, within the precision of the assay.

Alternate Sample Type: To assess the effect of alternate sample types, blood was collected from 22 volunteers into plain, heparinized, EDTA and Becton Dickinson SST[®] vacutainer tubes. All samples were assayed by the

Coat-A-Count DHEA-SO₄ procedure. By linear regression:

(Heparin) = 1.03 (Serum) – 3.4 µg/dL
r = 0.991

(EDTA) = 1.02 (Serum) – 7.8 µg/dL
r = 0.990

(SST) = 1.09 (Plain Tubes) – 19 µg/dL
r = 0.987

Means:

208 µg/dL (Serum)

211 µg/dL (Heparin)

204 µg/dL (EDTA)

208 µg/dL (SST)

Method Comparison: The Coat-A-Count DHEA-SO₄ procedure was compared to a commercially available radioimmunoassay (Kit A) on 112 patient serum samples. By linear regression:

(Coat-A-Count) = 1.14 (Kit A) – 6.9 µg/dL
r = 0.975

Means:

183 µg/dL (Coat-A-Count)

168 µg/dL (Kit A)

In another study, 99 patient serum samples were simultaneously assayed by the Coat-A-Count DHEA-SO₄ procedure using the new antibody and previous antibody. By linear regression:

(New) = 0.99 (Previous) – 0.46 µg/dL
r = 0.980

Means:

196 µg/dL (New)

197 µg/dL (Previous)

Curve Displacement: Two samples were each processed by the Coat-A-Count DHEA-SO₄ procedure in assays which included one-to-one dilutions of the sample with each of the calibrators A through G (0, 5, 20, 50, 200, 500 and 1,000 µg/dL). (See "Curve Displacement" table for representative data.)

References

1) Braunstein GD. Coping with hirsutism – management strategies. *Contemp Ob/Gyn* 1981 May;17(5):189-93. 2) Buvat J, et al. Investigative strategy of hyperandrogenism in women. *Horm Res* 1983;18:106-16. 3) Cohen HN, et al. Clinical value of adrenal androgen measurement in the diagnosis of delayed puberty. *Lancet* 1981;i:689-92. 4) Haning RV. Using DHEAS to monitor androgen disorders. *Contemp Ob/Gyn* 1981 Sept;18(9):117-32. 5) Haning RV, et al. Testosterone free index correlates best with dehydroepiandrosterone sulfate. *Fertil Steril* 1981;36:757-65. 6) Hatch R, et al. Hirsutism: implications, etiology, and management. *Am J*

Obstet Gynecol 1981;140:815-28. 7) Kasick JM, et al. Adrenal androgenic female-pattern alopecia: sex hormones and the balding woman. *Clev Clin Quarterly* 1983 Summer;50(2):111-22. 8) Lobo RA, Paul WL, Goebelsmann U. Dehydroepiandrosterone sulfate as an indicator of adrenal androgen function. *Obstet Gynecol* 1981;57:69-73. 9) Lobo RA, Paul WL, Goebelsmann U. Serum levels of DHEAS in gynecologic endocrinopathy and infertility. *Obstet Gynecol* 1981;57:607-12. 10) Maroulis GB, Abraham GE. Diagnostic tests in hirsutism. In: Mahesh V, Greenblatt RB, editors. *Hirsutism and virilism*. Boston: John Wright-PSG, 1983;295-307. 11) De Peretti E, Forest M. Pattern of plasma dehydroepiandrosterone sulfate levels in humans from birth to adulthood: evidence for testicular production. *J Clin Endocrinol Metab* 1978;47:572-77. 12) Rüedi B, et al. Diagnostic strategy in hyperandrogenic syndrome. *Horm Res* 1983;18:117-24. 13) Sciarra F. Diagnosis of virilizing syndromes: endocrinological parameters. In: Molinatti G, et al, editors. *Androgenization in women*. New York: Raven Press, 1983;85-113. 14) Toscano V, et al. Is hirsutism an evolving syndrome? *J Endocrinol* 1983;97:379-87. 15) Tourniaire J, Pugeat M. Strategic approach of hyperandrogenism in women. *Horm Res* 1983;18:125-34. 16) Vermeulen A. Androgen secretion by adrenals and gonads. In: Mahesh V, Greenblatt RB, editors. *Hirsutism and virilism*. Boston: John Wright-PSG, 1983;17-34. 17) Zappulla F, et al. Gonadal and adrenal secretion of dehydroepiandrosterone sulfate in prepubertal and pubertal subjects. *J Endocrinol Invest* 1981;4:197-202. 18) Burtis CA, Ashwood ER, editors. *Tietz textbook of clinical chemistry*. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1994. 19) National Committee for Clinical Laboratory Standards, *Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture*, 4th ed, NCCLS Document H3-A4, 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-SO ₄ µg/dL ⁶
T ⁷	53,225 53,499	53,362			
NSB ⁸	217 242	230	0		
A (MB) ⁹	24,552 24,687	24,620	24,390	100%	0
B	21,704 21,914	21,809	21,579	88%	5
C	16,937 17,449	17,193	16,963	70%	20
D	13,775 12,961	13,368	13,138	54%	50
E	6,189 5,852	6,021	5,791	24%	200
F	3,296 3,257	3,277	3,047	12%	500
G	2,092 2,159	2,126	1,896	8.0%	1,000
Unknowns ¹⁰					
X1	13,053 13,000	13,027	12,797	52%	49
X2	6,227 6,004	6,116	5,886	24%	206
X3	2,990 2,928	2,959	2,729	11%	601

Quality Control Parameters:¹¹

T⁷ = 53,362 cpm

%NSB⁸ = 0.4%

%MB⁹ = 46%

20% Intercept¹² = 273 µg/dL

50% Intercept = 55 µg/dL

80% Intercept = 11 µg/dL

Intraassay Precision (µg/dL)

	Mean ¹	SD ²	CV ³
1	19	0.97	5.1%
2	47	1.8	3.8%
3	190	8.3	4.4%
4	640	34	5.3%

Interassay Precision (µg/dL)

	Mean ¹	SD ²	CV ³
1	18	2.0	11%
2	47	3.6	7.7%
3	206	13	6.3%
4	669	54	8.1%

End-of-Run Effect (µg/dL)

	Tubes ¹ 31–44	Tubes 85–98	Tubes 139–152	Tubes 193–206	Tubes 247–260
1	20	19	18	18	18
2	43	48	44	47	43
3	168	167	169	182	152
4	614	607	618	584	671

Linearity (µg/dL)

	Dilution ¹	Observed ²	Expected ³	%O/E ⁴
1	16 in 16 ⁵	188	—	—
	8 in 16	91	94	97%
	4 in 16	41	47	87%
	2 in 16	22	24	92%
	1 in 16	13	12	108%
2	16 in 16	202	—	—
	8 in 16	92	101	91%
	4 in 16	48	51	94%
	2 in 16	25	25	100%
	1 in 16	13	13	100%
3	16 in 16	281	—	—
	8 in 16	138	141	98%
	4 in 16	63	70	90%
	2 in 16	31	35	89%
	1 in 16	16	18	89%
4	16 in 16	370	—	—
	8 in 16	170	185	92%
	4 in 16	87	93	94%
	2 in 16	43	46	93%
	1 in 16	24	23	104%
5	16 in 16	528	—	—
	8 in 16	246	264	93%
	4 in 16	138	132	105%
	2 in 16	62	66	94%
	1 in 16	31	33	94%

Recovery (µg/dL)

	Solution ¹	Observed ²	Expected ³	%O/E ⁴
1	—	134	—	—
	A	208	200	104%
	B	291	279	104%
	C	402	368	109%
2	—	192	—	—
	A	262	255	103%
	B	327	334	98%
	C	469	423	111%
3	—	309	—	—
	A	369	367	101%
	B	486	446	109%
	C	565	535	106%
4	—	328	—	—
	A	365	385	95%
	B	481	464	104%
	C	566	553	102%

Specificity (µg/dL)

Compound ¹	µg/dL Added ²	% Cross-reactivity ³
DHEA-SO ₄	75	(100%)
Estrone-3-SO ₄	5,000	0.25%
b-Estradiol-3-SO ₄ -17-Glucuronide	5,000	0.046%
DHEA-Glucuronide	5,000	0.17%
Androsterone-Glucuronide	5,000	0.04%
Androsterone-SO ₄	5,000	0.55%
DHEA	1,000	0.57%
Androstenedione	1,000	1.21%
Androsterone	2,000	0.28%
Testosterone	2,000	0.37%
5α-Dihydrotestosterone	5,000	0.085%
Estrone	5,000	0.09%
Progesterone	5,000	0.038%
Cortisol	10,000	ND
Aldosterone	5,000	ND
Estradiol	5,000	0.02%
Estriol	5,000	0.01%
19-Hydroxyandrostenedione	5,000	0.15%

ND: not detectable⁴**Protein Effect**

	Factor ¹	Approx. g/dL ²	Observed ³	Expected ⁴	O/E ⁵
1	2.00×	14.0	373	382	98%
	1.33×	9.3	263	254	103%
	1.00×	7.0	191	191	(100%)
	0.8×	5.6	150	153	98%
	0.67×	4.7	129	126	102%
2	2.00×	14.0	1,271	1,306	97%
	1.33×	9.3	890	869	103%
	1.00×	7.0	653	653	(100%)
	0.8×	5.6	537	522	103%
	0.67×	4.7	451	431	105%

Curve Displacement (µg/dL)

Solution ¹	Observed ²	Expected ³	% O/E ⁴
1 unspiked ⁵	94	—	—
1+A	44	47	94%
1+B	52	50	105%
1+C	57	57	99%
1+D	69	72	96%
1+E	152	147	103%
1+F	314	297	106%
1+G	626	547	114%
1 unspiked	189	—	—
1+A	85	94	90%
1+B	90	97	93%
1+C	96	104	92%
1+D	101	119	85%
1+E	189	194	97%
1+F	384	344	112%
1+G	588	594	99%

Deutsch. Example Run: ¹Röhrchen, ²Duplikat CPM, ³Mittelwert CPM, ⁴Netto CPM, ⁵Prozent Bindung, ⁶Ca. DHEA-SO₄, µg/dL, ⁷Qualitätskontrollparameter, ⁸Total, ⁹%NSB, ¹⁰%MB, ¹¹20% Intercept. **Intraassay Precision:** ¹Mittelwert, ²SD (Standardabweichung), ³CV (Variationskoeffizient). **Interassay Precision:** ¹Mittelwert, ²SD (Standardabweichung), ³CV (Variationskoeffizient). **Linearity:** ¹Verdünnung, ²Beobachtet (B), ³Erwartet (E), ⁴% B/E, ⁵16 in 16. **Recovery:** ¹Lösung, ²Beobachtet (B), ³Erwartet (E), ⁴% B/E. **Specificity:** ¹Verbindung, ²zugesetzte Menge, ³% Kreuzreaktivität, ⁴NN: Nicht nachweisbar. **End-of-Run Effect:**

¹Röhrchen. **Protein Effect:** ¹Faktor, ²Gemessene Konzentration, ³Beobachtet (B), ⁴Erwartet (E), ⁵% B/E. **Curve Displacement:** ¹Lösung, ²Beobachtet (B), ³Erwartet (E), ⁴% B/E, ⁵Ohne Zugabe von.

Español. Example Run: ¹Tubo, ²Duplicado CPM, ³Media CPM, ⁴CPM Netas, ⁵Porcentaje de unión, ⁶DHEA-SO₄, aprox., µg/dL, ⁷Parámetros del control de calidad, ⁸Total, ⁹%NSB, ¹⁰%MB, ¹¹Corte al 20%. **Intraassay Precision:** ¹Media, ²DS, ³CV. **Interassay Precision:** ¹Media, ²DS, ³CV. **Linearity:** ¹Dilución, ²Observado (O), ³Esperado (E), ⁴%O/E, ⁵16 en 16. **Recovery:** ¹Solución, ²Observado (O), ³Esperado (E), ⁴%O/E. **Specificity:** ¹Compuesto, ²Cantidad añadida, ³% Reacción cruzada, ⁴ND: no detectable. **End-of-Run Effect:** ¹Tubos. **Protein Effect:** ¹Factor, ²Concentración aparente, ³Observado (O), ⁴Esperado (E), ⁵%O/E. **Curve Displacement:** ¹Solución, ²Observado (O), ³Esperado (E), ⁴%O/E, ⁵Sin añadir.

Français. Exemple Série: ¹Tube, ²Duplicate CPM, ³CPM moyen, CPM corrigé, ⁵Pourcentage lié, ⁶Approx. DHEA-SO₄, µg/dL, ⁷Paramètres Contrôle de Qualité, ⁸Total, ⁹%NSB, ¹⁰%MB, ¹¹20% Intercept. **Intraassay Precision:** ¹Moyenne, ²SD, ³CV. **Interassay Precision:** ¹Moyenne, ²SD, ³CV. **Linearity:** ¹Dilution, ²Observé (O), ³Attendu (A), ⁴%O/A, ⁵16 dans 16. **Recovery:** ¹Solution, ²Observé (O), ³Attendu (A), ⁴%O/A. **Specificity:** ¹Composé, ²ajouté, ³Réaction croisée%. ⁴ND: non détectable. **End-of-Run Effect:** ¹Tubes. **Protein Effect:** ¹Facteur, ²Concentration apparente, ³Observé (O), ⁴Attendu (A), ⁵%O/A. **Curve Displacement:** ¹Solution, ²Observé (O), ³Attendu (A), ⁴%O/A, ⁵Non chargés.

Italiano. Seduta Esemplificativa: ¹Provetta, ²CPM in duplicato, ³CPM Medio, ⁴CPM Netti, ⁵Percentuale di Legato, ⁶Appross. DHEA-SO₄, µg/dL, ⁷Parametri per il Controllo di Qualità, ⁸Totale, ⁹%NSB, ¹⁰%MB, ¹¹Intercetta al 20%. **Intraassay Precision:** ¹Media, ²SD (Deviazione Standard), ³CV (Coefficiente di Variazione). **Interassay Precision:** ¹Media, ²SD (Deviazione Standard), ³CV (Coefficiente di Variazione). **Linearity:** ¹Diluizione, ²Osservato (O), ³Atteso (A), ⁴%O/A, ⁵16 in 16. **Recovery:** ¹Soluzione, ²Osservato (O), ³Atteso (A), ⁴%O/A. **Specificity:** ¹Composto, ²quantità aggiunta, ³Percentuale di Crossreattività, ⁴ND: non determinabile. **End-of-Run Effect:** ¹Provette. **Protein Effect:** ¹Fattore, ²Concentrazione apparente, ³Osservato (O), ⁴Atteso (A), ⁵%O/A. **Curve Displacement:** ¹Soluzione, ²Osservato (O), ³Atteso (A), ⁴%O/A, ⁵Semplice.

Português. Example Run: ¹Tubo, ²Duplicado CPM, ³Média de CPM, ⁴Net CPM, ⁵Percentagem de Ligação, ⁶Aprox. DHEA-SO₄, µg/dL, ⁷Parâmetros do controlo de qualidade, ⁸Total, ⁹%NSB, ¹⁰%MB, ¹¹20% Intercepção. **Intraassay Precision:** ¹Média, ²Desvio padrão, ³Coefficiente de variação. **Interassay Precision:** ¹Média, ²Desvio padrão, ³Coefficiente de variação.

Linearity: ¹Diluição, ²Observado (O), ³Esperado (E), ⁴%O/E, ⁵16 em 16. **Recovery:** ¹Solução, ²Observado (O), ³Esperado (E), ⁴%O/E. **Specificity:** ¹Composto, ²Quantidade adicionada, ³Percentagem de reação cruzada, ⁴ND: não detectável. **End-of-Run Effect:** ¹Tubos. **Protein Effect:** ¹Factor, ²Apparent Concentration, ³Observado (O), ⁴Esperado (E), ⁵%O/E. **Curve Displacement:** ¹Solução, ²Observado (O), ³Esperado (E), ⁴%O/E, ⁵Não adicionada.

Deutsch

Coat-A-Count DHEA-SO₄

Anwendung: Radioimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEA-SO₄) in Serum und Plasma. Zur *In-vitro*-Diagnostik.

Artikelnummern: **TKDS1** (100 Tests), **TKDS2** (200 Tests), **TKDS5** (500 Tests), **TKDSX** (1000 Tests)



Die Packung mit 100 Röhrchen enthält weniger als 4 Microcurie (148 Kilobecquerel) an radioaktivem ¹²⁵I-markiertem DHEA-SO₄; die Packung mit 200 Röhrchen enthält weniger als 8 Microcurie (296 Kilobecquerel); die Packung mit 500 Röhrchen enthält weniger als 20 Microcurie (740 Kilobecquerel) und die Packung mit 1000 Röhrchen enthält weniger als 40 Microcurie (1480 Kilobecquerel).

Klinische Relevanz

Das Dehydroepiandrosteron-Sulfat (DHEA-SO₄, DHEA-S) ist ein adrenales Steroid. Die Bestimmung der Konzentrationsverhältnisse ist wichtig in der Untersuchung von abnormalen Haarwuchs (Hirsutismus) und Haarausfall (Alopezie) bei Frauen.^{1,4,7} Es ist ebenso von Bedeutung in der Beurteilung der Adrenarche und einer verzögerten Pubertät.^{3,4}

Das DHEA-SO₄ wird nahezu ausschließlich in den Nebennieren produziert, obwohl bei Männern geringe Mengen von den Hoden produziert werden. Dies könnte die unterschiedlichen DHEA-SO₄-Konzentrationen bei Männern und Frauen nach dem 15. Lebensjahr

erklären.^{11,17} Im Gegensatz dazu wird DHEA-SO₄ niemals, auch nicht in pathologischen Fällen, im Ovar produziert.^{2,16} DHEA-SO₄ selbst ist ein schwaches Androgen. Es kann aber in stärker wirkende Androgene, wie z. B. Androstendion und Testosteron, umgewandelt werden. Damit kann es auf indirektem Wege Hirsutismus oder Virilisierung verursachen.^{1,16}

Die Plasmaspiegel von DHEA-SO₄ erhöhen sich ständig vom 7. Lebensjahr an. Nach dem 3. Lebensjahrzehnt verringern sich die Plasmawerte allmählich.^{11,16,17} In der Literatur werden als obere Grenze des Referenzbereiches annähernd 300 µg/dl für Frauen und 500 µg/dl für Männer angegeben.⁸ Schwangerschaft und orale Kontrazeptiva induzieren eine geringfügige Absenkung der Konzentrationswerte.^{4,16}

DHEA-SO₄ wird in den Blutstrom mit einer gegenüber dem DHEA nur geringfügig erhöhten Rate abgegeben. Die viel geringere Abbaurate - DHEA-SO₄ hat eine Halbwertszeit von einem Tag - führt schließlich zu einem Plasmaspiegel, der die DHEA-Konzentration um das Tausendfache übertrifft.^{4,13,16} Im Gegensatz zu Cortisol zeigt das DHEA-SO₄ keine tageszeitlichen Schwankungen.^{4,15} Im Gegensatz zu Testosteron ist es nicht an SHBG gebunden und wird daher nicht von Veränderungen der SHBG-Konzentrationen beeinflusst.¹⁶ Seine Aussagekraft, zusammen mit der Unabhängigkeit von tageszeitlichen Schwankungen, machen DHEA-SO₄ zu einem hervorragenden direkten Indikator der adrenalen Androgenausschüttung, der der Messung von urinären 17-Ketosteroiden in dieser Fragestellung mit Sicherheit überlegen ist.^{1,2,4,8}

Dementsprechend wird DHEA-SO₄ bei Hirsutismus häufig in Verbindung mit dem freiem Testosteron als initiales Screening-Verfahren für Hyperandrogenismus bestimmt.^{5,9} Zumindest eines dieser beiden Hormone ist in den meisten Fällen erhöht. Manchmal ist DHEA-SO₄ das einzige Hormon oberhalb des Referenzbereiches und es ist im Gegensatz zu den meisten anderen Androgenen häufiger während der frühen Stadien des Hirsutismus erhöht.⁹

Hohe DHEA-SO₄ Werte werden oft beim polyzystischen Ovarsyndrom beobachtet. Dies zeigt, dass adrenaler Hyperandrogenismus eine recht typische Facette dieses Syndroms darstellt.² Erhöhte Plasmaspiegel- durch Dexamethason über 2 Wochen reduzierbar- können von einer adrenalen Hyperplasie herrühren.^{4,6,9} Extrem hohe Werte (größer 700 – 800 µg/dl) bei Frauen lassen eine hormonproduzierenden, adrenalen Tumor vermuten.¹³ (Im Gegensatz dazu sind die DHEA-SO₄ Werte bei ovariellen Tumoren im Normalbereich¹).

Methodik

Im Coat-A-Count RIA der DPC (Diagnostic Products Corporation) zur Bestimmung des DHEA-SO₄ konkurriert ein ¹²⁵I-markiertes DHEA-SO₄, mit dem DHEA-SO₄ in der Patientenprobe um die Bindung an antikörper-beschichtete Röhrchen. Nach der Inkubation erfolgt die Trennung der gebundenen Komponenten von den freien durch einfaches Dekantieren. Die Röhrchen werden dann in einem Gamma-Counter gemessen. Die Counts sind der Konzentration des DHEA-SO₄ in der Patientenprobe umgekehrt proportional. Die Menge des DHEA-SO₄ in der Probe wird durch Vergleichen der Counts mit einer Standardkurve ermittelt.

Zu pipettierende Reagenzien: 1

Testdauer: 30 min

Totalaktivität zum Zeitpunkt der Markierung: ca. 50 000 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 Kits 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 dekontami-
nieren. Aerosolbildung ist zu vermeiden.
Flüssiger und fester radioaktiver Abfall
sind unter Beachtung der gültigen
Richtlinien zu entsorgen.

Im Lieferumfang enthalten:

DHEA-SO₄ Antikörper-beschichtete Röhrchen (TDS1)

Polypropylen Röhrchen beschichtet mit
Antikörpern gegen das DHEA-SO₄,
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: helles pink.

TKDS1: 100 Röhrchen.

TKDS2: 200 Röhrchen.

TKDS5: 500 Röhrchen.

TKDSX: 1000 Röhrchen.

125I DHEA-SO₄ (TDS2)

Jodiertes DHEA-SO₄ in lyophilisierter Form,
mit Konservierungsmitteln. Jede Flasche
mit **110 ml** destilliertem oder deionisiertem
Wasser auflösen. Sicher verschließen und
durch vorsichtiges Umdrehen mischen. Bei
2–8°C 30 Tage nach dem Öffnen oder bis
zum Verfallsdatum haltbar. *Den Tracer
nicht in ein Plastikgefäß überführen.*

TKDS1: 1 Flasche. **TKDS2:** 2 Flaschen.

TKDS5: 5 Flaschen. **TKDSX:** 10 Flaschen.

DHEA-SO₄ Standards (TDS3–9)

7 Flaschen, A – G, mit Standards auf
Proteinbasis, lyophilisiert, mit
Konservierungsmitteln. Den 0-Standard
mit **3,0 ml** destilliertem oder deionisiertem
Wasser auflösen und die anderen
Standards B – G mit je **1,0 ml**. Bei 2–8°C
bis 30 Tage nach dem Öffnen haltbar. Für
eine längere Haltbarkeit, in fest
verschlossene Glas oder Polypropylen
Röhrchen portionieren und bei –20°C
einfrieren.

TKDS1: 1 Set. **TKDS2:** 1 Set.

TKDS5: 2 Sets. **TKDSX:** 3 Sets.

Die Standards enthalten 0, 5, 20, 50, 200,
500 und 1 000 µg/dl; bzw.: 0; 0,14; 0,54;
1,36; 5,4; 13,6 und 27,1 µmol/l. Weitere
Standardkurvenpunkte können durch
Mischen der Standards hergestellt
werden.

Erforderliche Laborgeräte und Hilfsmittel

Gammacounter – kompatibel mit
12x75 mm Röhrchen

Wirbelmischer

Reagenzienvorbereitung

Messzylinder: 110 ml

Volumetrische Pipetten: 1,0 ml und 3,0 ml

Destilliertes oder deionisiertes Wasser

Radioimmunoassay

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

Mikropipetten: 50 µl und 1 000 µl. Für die
1,0 ml Reagenzzugabe, wird ein
Dispenser empfohlen.

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 Venenpunktion¹⁹ in Röhrchen ohne Zusätze, Trennung des Serums von den Blutzellen. Abnahmezeitpunkt notieren. EDTA-Plasma kann auch verwendet werden. (Siehe Abschnitt Alternativer Probentyp.)

Studien mit unveresterten Fettsäuren (NEFA) haben gezeigt, dass Ölsäure in hohen physiologischen Konzentrationen einen signifikanten *in vitro* Einfluss auf den Assay hat.

Eine Ultrazentrifuge wird zur Klärung von lipämischen Proben empfohlen.

Bei hämolysierten Proben besteht die Möglichkeit einer unsachgemäßen Handhabung vor Eintreffen im Labor, daher sind die Ergebnisse mit Vorsicht zu interpretieren.

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-SO₄ sind nicht mit allen möglichen Röhrchenvariationen ausgetestet worden. Details der getesteten Röhrchenarten sind dem Kapitel "Alternative Probenarten" zu entnehmen.

Erforderliche Menge: 50 µl pro Röhrchen.

Lagerung: Für 2 Tage bei 2–8°C in Glas oder Polypropylen-Röhrchen oder für 2 Monate bei –20°C.¹⁸ Die Proben vor Testbeginn auf Raumtemperatur (15–28°C) bringen und vorsichtig durchmischen. Um wiederholtes Einfrieren und Auftauen zu vermeiden bei Bedarf portionieren. Gefrorene Proben dürfen

nicht durch Erhitzen im Wasserbad aufgetaut werden.

Testansatz und Durchführung

Alle Testkomponenten vor Testbeginn auf Raumtemperatur (15–28°C) bringen.

- 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-SO₄ Röhrchen mit A (maximale Bindung, 0-Standard) und von B bis F beschriften. Jeweils 2 weitere Antikörper-beschichtete Röhrchen für Kontrollen und Patientenproben beschriften.

Standards	µg/dl	µg/mL	µmol/l
A (MB)	0	0	0
B	5	0,05	0,14
C	20	0,2	0,54
D	50	0,5	1,36
E	200	2	5,4
F	500	5	13,6
G	1 000	10	27,1

- 2** Jeweils **50 µl** des 0-Standards A in die NSB und A Röhrchen und jeweils 50 µl der restlichen Standards, Kontrollen und Patientenproben in die vorbereiteten Röhrchen pipettieren.

Direkt auf den Boden des Röhrchens pipettieren.

Patientenproben mit Konzentrationen oberhalb des Messbereichs bis 1 000 µg/dl müssen vor der Messung mit 0-Standard 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** of ¹²⁵I DHEA-SO₄ in jedes Röhrchen hinzufügen. Leicht und kurz mischen.

Das Verteilen des Tracers sollte nicht länger als 10 Minuten dauern. Wenn eine automatische Pipette mit Plastikspritze verwendet wird, muss vor dem Dispensieren 2x mit Tracer gespült werden. Die T-Röhrchen bis zur Messung (siehe Schritt 6) beiseite stellen; sie bedürfen keiner weiteren Behandlung.

- 4 Für **30 Minuten bei 37°C** im Wasserbad inkubieren.
Ein Ofen oder Heizblock darf nicht verwendet werden.
- 5 Vollständig dekantieren.
Vollständiges Entfernen der Flüssigkeit verbessert die Präzision deutlich. 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) × 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 überprüfen, 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 Konzentrationen (niedrig und hoch) an DHEA-SO₄ 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.

Referenzwerte

An zwei Instituten, die den Coat-A-Count DHEA-SO₄ RIA verwenden, wurden Referenzwertstudien an insgesamt 202 Erwachsenen durchgeführt. Der Median und der zentrale 95%-Bereich aus der Zusammenfassung beider Studien sind nachfolgend aufgeführt.

	Median	Bereich (Zentral 95%)	n
Frauen	170 µg/dl	35 – 430 µg/dl	132
Männer	280 µg/dl	80 – 560 µg/dl	70

Zusätzlich wurden Seren von 74 Schwangeren und Frauen nach der Geburt analysiert. Wie zu erwarten, zeigen die Ergebnisse einen progressiven Abfall: Die Mediane für das 1. Trimester, das 3. Trimester und einen Tag nach Geburt waren 230, 105 und 65 µg/dl.

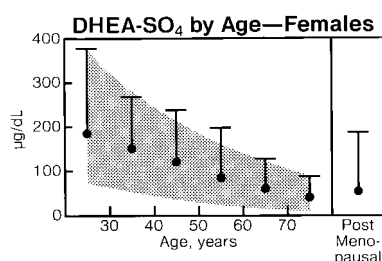
Eine weitere Referenzbereichstudie wurde in einem Krankenhaus im Nordosten der USA an 136 Frauen und 155 Männern mit bekanntem Alter durchgeführt. Die Ergebnisse sind, nach Alter und Geschlecht aufgeschlüsselt, in der nachfolgenden Tabelle und Grafik dargestellt. In der Grafik repräsentieren die geschlossenen Kreise die 50. Perzentilen während die 95. Perzentilen durch ein „T“ symbolisiert sind. Die Schattierung umfasst den geglätteten Bereich zwischen den 5. und 95. Perzentilen. Nach einem einfachen Modell wurden die zirkulierenden DHEA-SO₄ Werte als Funktion des Alters dargestellt.

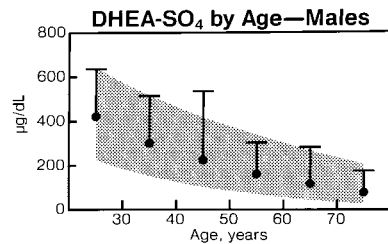
Die Ergebnisse einer früheren Studie des selben Labors an 60 Proben von postmenopausalen Frauen sind ebenfalls in der nachfolgenden Tabelle und Grafik dargestellt.

Altersgruppe	n	5 %ile	50 %ile	95 %ile
Frauen				
10–19	2	—	140	—
20–29	23	65	185	380
30–39	29	45	150	270
40–49	29	32	120	240
50–59	18	26	85	200
60–69	21	13	50	130
70–79	8	17	40	90
80–89	6	—	26	—
Post-menopausal	60	10	55	190
Männer				
10–19	6	—	215	—
20–29	17	280	420	640
30–39	21	120	300	520
40–49	23	95	250	530
50–59	29	70	160	310
60–69	37	42	130	290
70–79	18	28	80	175
80–89	4	—	36	—

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

Siehe auch Grafiken "DHEA-SO₄ by Age: Males" und "DHEA-SO₄ by Age: Females". In der Grafik repräsentieren die geschlossenen Kreise die 50. Perzentilen während die 95. Perzentilen durch ein „T“ symbolisiert sind. Die Schattierung umfasst den geglätteten Bereich zwischen den 5. und 95. Perzentilen. Nach einem einfachen Modell wurden die zirkulierenden DHEA-SO₄ Werte als Funktion des Alters dargestellt.





Leistungsdaten

Im folgenden Abschnitt sind Daten gezeigt, die für die Leistung des DHEA-SO₄ RIA repräsentativ sind. Die Ergebnisse sind in µg/dl angegeben.

Umrechnungsfaktor:

µg/dl × 0,02714 → µmol/l

Messbereich: 5 – 1 000 µg/dl

(0,14 – 27 µmol/l)

Analytische Sensitivität: 1,1 µg/dl

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

Interassay-Präzision: Statistische Berechnung der Ergebnisse von Proben, die in 24 Ansätzen in Doppelbestimmung gemessen wurden. (Siehe Tabelle „Interassay-Precision“.)

Linearität: Proben wurden in verschiedenen Verdünnungen getestet. (Repräsentative Daten entnehmen Sie bitte der Tabelle „Linearität“.)

Wiederfindung: Proben wurden 1:19 mit DHEA-SO₄ Lösungen (1 452, 3 046 und 4 820 µg/dl) versetzt und gemessen. (Siehe Tabelle „Recovery“.)

Spezifität: Das in diesem Testbesteck verwendete Antiserum ist hochspezifisch mit relativ niedrigen Kreuzreaktivitäten zu anderen natürlich vorkommenden Steroiden oder Medikamenten. (siehe Tabelle „Spezifität“.)

"End of Run" Effekt: Tritt bis ca. 250 Röhrchen nicht auf. (siehe Tabelle "End-of-Run Effect").

Protein Einfluss: Um unterschiedliche Proteinkonzentrationen zu simulieren, wurden 2,0 ml Portionen eines Humanserum-Pools gefriergetrocknet und anschließend in unterschiedlichen

Volumina an Wasser aufgelöst. Jede aufgelöste Portion wurde im DHEA-SO₄ Coat-A-Count RIA gemessen. In den mit der Hälfte des Originalvolumens aufgelösten Proben liegt eine extrem hohe Proteinkonzentration von 14 g/dl vor. (Der jeweilige Faktor, um das Auflösevolumen zu korrigieren, ist in der Tabelle aufgelistet.) Die Ergebnisse zeigen, dass selbst große Unterschiede in der Gesamtproteinkonzentration nur einen relativ kleinen Einfluss auf den DHEA-SO₄ Coat-A-Count RIA haben. (Siehe Tabelle "Protein Effect.")

Einfluss von Freien Fettsäuren: Um den Einfluss unveresterter Fettsäuren (NEFA) zu untersuchen wurden Portionen von 3 Seren lyophilisiert, rekonstituiert und dann im Coat-A-Count DHEA-SO₄ RIA gemessen. Zum Rekonstituieren wurden wässrige Lösungen mit 0; 2,5; 5 und 10 mmol/L Ölsäure verwendet. Die Ergebnisse zeigen, dass Ölsäure in hohen physiologischen Konzentrationen einen signifikanten *in vitro* Einfluss auf den Assay hat.

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

Hämolyse: Erythrozytenkonzentrate haben in Konzentrationen bis zu 30 µl/ml keinen Einfluss auf die Messung, der größer als die Impräzision des Assays selbst ist.

Alternativer Probentyp: Um die Auswirkungen von verschiedenen Probenarten zu untersuchen, wurde Blut von 22 Freiwilligen in Röhrchen ohne Additiva, in Heparin-, EDTA- und Becton Dickinson SST[®] Vacutainer-Röhrchen gesammelt. Alle Proben wurden im DHEA-SO₄ Coat-A-Count RIA gemessen. Durch lineare Regression:

(Heparin) = 1,03 (Serum) – 3,4 µg/dl
r = 0,991

(EDTA) = 1,02 (Serum) – 7,8 µg/dl
r = 0,990

(SST) = 1,09 (einfachen Röhrchen) – 19 µg/dl
r = 0,987

Mittelwerte:
208 µg/dl (Serum)
211 µg/dl (Heparin)
204 µg/dl (EDTA)
208 µg/dl (SST)

Methodenvergleich: Der Coat-A-Count DHEA-SO₄ RIA wurde mit einem kommerziell erhältlichen Radioimmunoassays (Kit A) an Hand von 112 Patienten-Serumproben verglichen. Durch lineare Regression:

(Coat-A-Count) = 1,14 (Kit A) – 6,9 µg/dl
r = 0,975

Mittelwerte:
183 µg/dl (Coat-A-Count)
168 µg/dl (Kit A)

In einer anderen Studie, wurden 99 Patienten-Serumproben gleichzeitig in dem Coat-A-Count DHEA-SO₄ mit den aktuellen und früher verwendeten Antikörpern gemessen. Durch lineare Regression:

(Neu) = 0,99 (Vorher) – 0,46 µg/dl
r = 0,980

Mittelwerte:
196 µg/dl (Neu)
197 µg/dl (Vorher)

Kurvenverschiebung: Zwei Proben wurden einzeln im Coat-A-Count DHEA-SO₄ RIA untersucht, dabei erfolgte jeweils eine 1:1 Verdünnung der Probe mit einem der Standards A–G. (0, 5, 20, 50, 200, 500 und 1 000 µg/dl). (Siehe Tabelle "Curve Displacement")

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-SO₄

Utilidad del análisis: Coat-A-Count DHEA-SO₄ es un radioinmunoensayo diseñado para la determinación cuantitativa de sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEA-SO₄) en suero y plasma. Está diseñado estrictamente para uso diagnóstico *in vitro*.

Referencia: **TKDS1** (100 tubos), **TKDS2** (200 tubos), **TKDS5** (500 tubos), **TKDSX** (1000 tubos)



El estuche de 100 tubos contiene menos de 4 microcurios (148

kilobequerels) de ¹²⁵I DHEA-SO₄, el estuche de 200 tubos contiene menos de 8 microcurios (296 kilobequerels); el estuche de 500 tubos contiene menos de 20 microcurios (740 kilobequerels); y el estuche de 1000 tubos contiene menos de 40 microcurios (1480 kilobequerels).

Resumen y Explicación del Test

La medición del sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEA-SO₄, DHEAS) un esteroide suprarrenal, es importante para las investigaciones del crecimiento anormal del cabello (hirsutismo) y la calvicie (alopecia) en las mujeres.^{1,4,7} También tiene valor en la evaluación de la adrenarquía y de la pubertad retrasada.^{3,4}

El DHEA-SO₄ en la circulación se origina casi completamente en las glándulas suprarrenales, aunque en los hombres también puede derivar algo de los testículos, explicando en parte las diferencias en el sexo que empiezan a aparecer alrededor de 15 años.^{11,17} Por otro lado, esta hormona no es producida por los ovarios ni siquiera en condiciones patológicas.^{2,16} En si, el DHEA-SO₄ es sólo débilmente androgénica, pero puede metabolizarse en andrógenos más potentes como la androstendiona y testosterona, y ser así indirectamente una causa del hirsutismo o virilización.^{1,16}

Los niveles plasmáticos de DHEA-SO₄ aumentan regularmente a partir del séptimo año, y luego después de la tercera década disminuyen gradualmente.^{11,16,17} Según la bibliografía, el límite de referencia superior para los adultos jóvenes es de aproximadamente 300 µg/dl para mujeres y 500 µg/dl para hombres.⁸ El embarazo y los anticonceptivos orales provocan una disminución moderada.^{4,16}

La DHEA-SO₄ es liberada al flujo sanguíneo a un ritmo solamente algo mayor que la DHEA, pero debido a su producción mucho mas lenta - DHEA-SO₄ tiene una media vida de casi un día completo - mantiene un nivel plasmático casi mil veces mayor.^{4,13,16} A diferencia del cortisol, el DHEA-SO₄ no exhibe una variación diurna significativa.^{4,15} A diferencia de la testosterona no circula unida a la globulina transportadora de la

hormona sexual y por lo tanto no está influenciada por alteraciones en el nivel de esta proteína transportadora.¹⁶ Su abundancia, junto con su estabilidad diaria y a lo largo del mismo día, la convierte en un excelente indicador directo de la producción de andrógeno suprarrenal, superior a la medición de 17-cetoesteroides urinarios en este contexto.^{1,2,4,8}

Por lo tanto, la DHEA-SO₄ frecuentemente se determina junto con la testosterona libre como screening inicial de hiperandrogenismo en hirsutismo.^{5,9} Cuando menos una de estas dos hormonas probablemente este elevada en la gran mayoría de los casos – según se publica más del 80 por ciento del tiempo.⁹ Algunas veces la DHEA-SO₄ es la única hormona circulando a un nivel por encima del normal y es aparentemente mas probable que esté elevada durante las primeras etapas del hirsutismo que la mayoría de los otros andrógenos.⁹

Frecuentemente se encuentran niveles altos de DHEA-SO₄ en el síndrome de ovario policístico, mostrando que el hiperandrogenismo suprarrenal es una faceta bastante típica de este síndrome.² Los niveles plasmáticos elevados – durante el curso de dos semanas más o menos – son suprimibles con dexametasona y pueden también ser resultado de una hiperplasia suprarrenal.^{4,6,9} Los niveles extremadamente altos (mayores a 700 o 800 µg/dl) en las mujeres sugieren un tumor suprarrenal secretor de hormona.¹³ (En contraste, los niveles de DHEA-SO₄ son típicamente normales en presencia de los tumores del ovario.¹)

Principio del análisis

En el procedimiento Coat-A-Count DHEA-SO₄, la DHEA-SO₄ marcada con I¹²⁵ compete con la DHEA-SO₄ de la muestra del paciente por sitios de unión en los tubos recubiertos con anticuerpo. Después de la incubación, se logra la separación de lo unido con lo libre simplemente decantando. El tubo es entonces contado en un contador gama, siendo los conteos inversamente proporcionales la cantidad de DHEA-SO₄ presente en la muestra del paciente. La cantidad de DHEA-SO₄ en la muestra es

determinada comparando los conteos con una curva de calibración.

Reactivos a pipetear: 1

Tiempo total de incubación: 30 minutos

Cuentas totales en la iodización:
aproximadamente 50 000 cpm

Advertencias y precauciones

Para uso diagnóstico *in vitro*.

Reactivos: Almacenar de 2–8°C en una cámara preparada para almacenar material radioactivo. 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 necesiten 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 HIV 1 y 2; para el antígeno de superficie de hepatitis B y para los anticuerpos de hepatitis C.

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

Agua: Usar agua destilada o desionizada.

Radioactividad

Una copia de cualquier certificado de licencia de radioisótopos (específico o general) emitido a la aduana de los EEUU se registrará en los ficheros de Diagnostic Products Corporation antes de que se puedan enviar kits o componentes conteniendo material radioactivo. Estos materiales radioactivos pueden adquirirse por cualquier cliente con la licencia específica apropiada. Con una licencia general, estos materiales radioactivos pueden adquirirse solo por medicos, veterinarios en la práctica de la medicina veterinaria, laboratorios clínicos y

hospitales — y estrictamente para la clínica *in vitro* o test de laboratorio que no conlleven la administración interna o externa de material radioactivo 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 EEUU o de un Estado con el NRC para su consiguiente control.

Manejar los materiales radioactivos 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 aerosols. Eliminar los residuos sólidos radioactivos de acuerdo con los requerimientos de su licencia. Licencias generales (NRC Form 483) pueden eliminar sus residuos sólidos radioactivos como residuos no radioactivos, 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 radioactivos 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 radioactivos contenidos en este tipo de productos como cualquier otro material líquido. Refiérase a la normativa aplicable a su laboratorio.

Materiales suministrados

Tubos Recubiertos de DHEA-SO₄ Ab (TDS1)

Tubos de polipropileno recubiertos con anticuerpos de DHEA-SO₄ 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:* Rosa pálido.
TKDS1: 100 tubos. **TKDS2:** 200 tubos.
TKDS5: 500 tubos. **TKDSX:** 1000 tubos.

I125 DHEA-SO₄ (TDS2)

Un frasco de DHEA-SO₄ yodada liofilizada con conservante. Reconstituir cada frasco con **110 ml** de agua destilada. Tapar herméticamente y mezclar por *suave* inversión. Almacenar refrigerado. 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.*
TKDS1: 1 vial. **TKDS2:** 2 viales.
TKDS5: 5 viales. **TKDSX:** 10 viales.

Calibradores DHEA-SO₄ (TDS3–9)

Siete frascos etiquetados de A a G, de calibradores con base proteica en forma liofilizada, con conservante. Reconstituir el calibrador cero A con **3,0 ml** de agua destilada y los restantes calibradores B a G con **1,0 ml**. Almacenar refrigerados, estables a 2–8°C durante 30 días después de su apertura. Para almacenar por mas tiempo, alicuotar en tubos de vidrio o polipropileno tapados herméticamente y congelar a –20°C.
TKDS1: 1 juego. **TKDS2:** 1 juego.
TKDS5: 2 juegos. **TKDSX:** 3 juegos.

Los calibradores contienen respectivamente, 0, 5, 20, 50, 200, 500 y 1 000 microgramos de DHEA-SO₄ por decilitro (µg/dl); equivalentemente a: 0, 0,14, 0,54, 1,36, 5,4, 13,6 y 27,1 micromoles por litro (µmol/l). Los puntos de calibración intermedios puede obtenerse mezclando los calibradores en las proporciones apropiadas.

Materiales Requeridos pero no suministrados

Contador Gamma – compatible con los tubos de 12x75 mm.

Vortex

Preparación de los Reactivos

Cilindro graduado para 110 ml

Pipetas: 1,0 ml y 3,0 ml

Agua destilada o desionizada

Radioinmunoanálisis

Tubos de polipropileno limpios de 12x75 mm – para usar como tubos NSB, disponibles en DPC.

Micropipetas: 100 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-SO₄ junto con otros más de 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 venopunción¹⁹ en tubos limpios y separar el suero de las células, anotando la hora de la toma. El plasma EDTA también es apropiado para este ensayo. (Ver la sección sobre Tipo de Muestra Alternativa.)

Los estudios de ácidos grasos no esterificados (NEFA) muestran que el ácido oleico tiene un efecto *in vitro* significativo en el ensayo a concentraciones fisiológicamente altas.

Se recomienda una ultracentrífuga para clarificar las muestras lipémicas.

Las muestras hemolizadas podrían indicar una mala manipulación de la muestra antes de ser recibida por el laboratorio; en este caso, los resultados deben interpretarse con precaución.

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-SO₄ 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: 50 µl por tubo.

Conservación: 2 días a 2–8°C en tubos de cristal o polipropileno, o 2 meses a

–20°C.¹⁸ Antes del ensayo, llevar todas las muestras a temperatura ambiente (15–28°C) y mezclar por inversión. 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.

Procedimiento del Radioinmunoanálisis

Todos los componentes deben llevarse a temperatura ambiente (15–28°C) antes de su uso.

- 1 Tubos de ensayo: Marcar cuatro tubos de ensayo de polipropileno (sin recubrir) 12x75 mm. Como Tubos T (cuentas totales) y NSB (unión no específica) en duplicado.

Al ser característicamente bajas las uniones no específicas en el ensayo Coat-A-Count DHE-SO₄, los tubos NSB pueden ser omitidos sin comprometer la precisión y control de calidad del ensayo.

Tubos Recubiertos: Marque 14 Tubos Recubiertos con DHEA-SO₄ Ab (unión máxima) con A (Máxima unión) y de B a G en duplicado. Marque también tubos en duplicado para controles y muestras de pacientes.

Calibradores	µg/dl	µg/mL	µmol/l
A (MB)	0	0	0
B	5	0,05	0,14
C	20	0,2	0,54
D	50	0,5	1,36
E	200	2	5,4
F	500	5	13,6
G	1 000	10	27,1

- 2 Pipetear **50 µl** del calibrador cero A en los tubos NSB y A y **50 µl** de cada calibrador, control y muestra de paciente restante en los tubos preparados. **Pipetear directamente en el fondo del tubo.**

Las muestras de pacientes que se espera contengan concentraciones de DHEA-SO₄ superiores al calibrador alto (1 000 µg/dl) deberían ser diluidas con el calibrador zero antes de ensayarlas.

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

- 3 Agregar **1,0 ml** de I^{125} DHEA-SO⁴ a todos los tubos. Agitar en vórtex breve y suavemente.

No deberán pasar más de 10 minutos durante la dispensación del trazador. Si se utiliza una pipeta de repetición con jeringa de plástico, enjuagarla dos veces con el trazador antes de utilizarla. Dejar los tubos T a un lado para su conteo (paso 6); no requieren más procesamiento posterior

- 4 Incubar durante **30 minutos a 37°C**.

Usar baño de María; ni un horno ni una parrilla son apropiados.

- 5 Decantar.

Eliminar toda la humedad visible para mejorar la precisión. Utilizando una gradilla de espuma, dispense el contenido de todos los tubos (excepto los tubos T) y déjelos 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 se puede simplificar omitiendo la corrección para la unión no específica; 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 dibujar 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 tabla "Example Run").

Control de Calidad

Los controles o pools de suero con cuando menos dos concentraciones de DHEA-SO⁴ – baja y alta – deberán sujetarse a ensayo rutinariamente como incógnitos.

Informar de 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 que las parejas de los tubos del control pueden espaciarse a lo largo de la tanda de ensayo para verificar la ausencia de deriva significativa.

Valores esperados

Se realizaron estudios para obtener rangos de normalidad en dos instituciones utilizando el kit Coat-A-Count DHEA-SO₄ en un total de 202 adultos. Abajo se indica la media y rango representando el 95 por ciento central de las observaciones para los datos combinados.

	Mediana	Rango (Central 95%)	n
Mujeres	170 µg/dl	35 – 430 µg/dl	132
Hombres	280 µg/dl	80 – 560 µg/dl	70

Adicionalmente, se analizó un total de 74 muestras de pacientes embarazadas y tras el parto. Los resultados, como se esperaba, mostraron una disminución progresiva: la media obtenida para el primer y tercer trimestre y para un día después del parto fueron 230, 105 y 65 µg/dl, respectivamente.

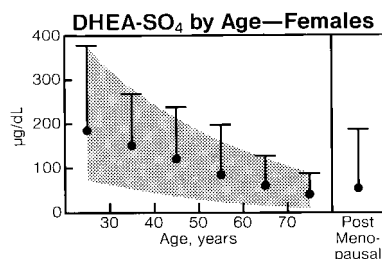
Se realizó otro estudio más de rango de referencia en un gran hospital del noreste con muestras de 136 mujeres y 155 hombres, todos de edad conocida. Los resultados, detallados por sexo y por edad, se resumen en las siguientes tablas y gráficas. En las gráficas, los círculos sólidos representan medias (percentil 50) mientras que las barras "T" representan percentiles 95. El área sombreada representa una curva de los percentiles 5 y 95 según un simple modelo del comportamiento del DHEA-SO₄ circulante en función de la edad.

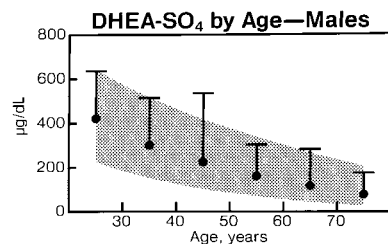
Los resultados de un estudio previo por el mismo laboratorio en 60 muestras posmenopáusicas se resumen en las siguientes tablas y gráficas.

Grupo de Edad	n	5 th %il	50 th %il	95 th %il
Mujeres				
10–19	2	—	140	—
20–29	23	65	185	380
30–39	29	45	150	270
40–49	29	32	120	240
50–59	18	26	85	200
60–69	21	13	50	130
70–79	8	17	40	90
80–89	6	—	26	—
Post-menopausia	60	10	55	190
Hombres				
10–19	6	—	215	—
20–29	17	280	420	640
30–39	21	120	300	520
40–49	23	95	250	530
50–59	29	70	160	310
60–69	37	42	130	290
70–79	18	28	80	175
80–89	4	—	36	—

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

Véase también los gráficos "DHEA-SO₄ por edad: Hombres" y "DHEA-SO₄ por edad: Mujeres". Los círculos sólidos representan medias (percentil 50) mientras que las barras "T" representan percentiles 95. El área sombreada representa los percentiles 5 y 95 según un simple modelo del comportamiento del DHEA-SO₄ circulante en función de la edad.





Características analíticas

Ver la sección Tablas y Gráficos para los datos *representativos* del rendimiento del kit Coat-A-Count DHEA-SO₄. Los resultados se expresan como microgramos por decilitro (µg/dl).

Factor de Conversión:

µg/dl $\times$ 0,02714 $\rightarrow$ µmol/l

Intervalo de calibración: 5 – 1 000 µg/dl
(0,14 – 27 µmol/l)

Sensibilidad analítica: 1,1 µg/dl,

Precisión intraensayo (dentro de una tanda): Las estadísticas se calcularon para cada una de cuatro muestras de los resultados de 20 pares de tubos en un solo ensayo. (Véase la tabla "Precisión intraensayo".)

Precisión entre ensayos (de una tanda a otra): La estadística fue calculada para cada una de cuatro muestras de los resultados de pares de tubos en 24 diferentes ensayos. Véase la tabla "Precisión entre ensayos".)

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

Recuperación: Se sobrecargaron muestras (1 a 19) con tres soluciones de DHEA-SO₄ (1 452, 3 046 y 4 820 µg/dl) y se ensayaron posteriormente. (Véase tabla "Recuperación".)

Especificidad: El antisuero Coat-A-Count DHEA-SO₄ es altamente específico al DHEA-SO₄ con una reactividad cruzada relativamente baja a otros esteroides o drogas de origen natural que puedan estar presentes en las muestras de los pacientes. (Véase la tabla "Especificidad".)

Efecto deriva: Ninguno hasta aproximadamente 250 tubos. (Ver tabla "End-of-Run Effect").

Efecto Proteico: Para simular varias concentraciones de proteínas, se realizaron experimentos en los que alícuotas de 2,0 mL de un pool de suero humano normal se liofilizaron y luego fueron reconstituidas con diferentes volúmenes de agua. Posteriormente, cada alícuota reconstituida se ensayó con el procedimiento Coat-A-Count DHEA-SO₄. Observe que las alícuotas reconstituidas con la mitad del volumen original representan una concentración de proteína extremadamente alta, del orden de 14 g/dl. Los resultados indican que aun amplias variaciones en proteína total no tienen un efecto significativo en el ensayo Coat-A-Count DHEA-SO₄. (Véase Tabla "Protein Effect".)

Efecto de Ácidos grasos libres: Para analizar el efecto de ácidos grasos no esterificados (NEFA), se liofilizaron tres muestras alícuotadas, se reconstituyeron y se ensayaron con el kit Coat-A-Count DHEA-SO₄. Para la reconstitución se usaron soluciones acuosas con 0, 2,5, 5, y 10 mmol/l de ácido oléico. Los resultados muestran que el ácido oléico — a concentraciones fisiológicamente altas — tiene un efecto in vitro significativo con este ensayo.

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

Hemólisis: La presencia de eritrocitos hasta concentraciones de 30 µl/ml no tiene efecto en los resultados, en lo concerniente a la precisión del ensayo.

Tipo de Muestra Alternativa: para evaluar el efecto de los diferentes tipos de muestras alternativas, se recogió sangre de 22 voluntarios en tubos normales, tubos con Heparina, tubos con EDTA y tubos vacutainer SST[®] de Becton Dickinson. Todas las muestras fueron ensayadas con el kit Coat-A-Count DHEA-SO₄. Por regresión lineal:

(Heparina) = 1,03 (Suero) – 3,4 µg/dl
r = 0,991

(EDTA) = 1,02 (Suero) – 7,8 µg/dl
r = 0,990

(SST) = 1,09 (tubos simples) – 19 µg/dl
r = 0,987

Medias:
208 µg/dl (Suero)
211 µg/dl (Heparina)

204 µg/dl (EDTA)
208 µg/dl (SST)

Comparación de Métodos: Se ensayaron simultáneamente 112 muestras de suero de pacientes con el kit Coat-A-Count DHEA-SO₄ y con otro radioinmunoensayo disponible comercialmente (Kit A). Por regresión lineal:

(Coat-A-Count) = 1,14 (Kit A) – 6,9 µg/dl
r = 0,975

Medias:
183 µg/dl (Coat-A-Count)
168 µg/dl (Kit A)

En otro estudio, se ensayaron simultáneamente 99 muestras de suero de pacientes con el kit Coat-A-Count DHEA-SO₄ usando el nuevo anticuerpo y el anticuerpo anterior. Por regresión lineal:

(Nuevo) = 0,99 (Anterior) – 0,46 µg/dl
r = 0,980

Medias:
196 µg/dl (Nuevo)
197 µg/dl (Anterior)

Desplazamiento de Curva: Dos muestras fueron procesadas con el kit Coat-A-Count DHEA-SO₄ en ensayos que incluyeron diluciones 1 a 1 de cada muestra con cada uno de los calibradores A a G (0, 5, 20, 50, 200, 500 y 1 000 µg/dl). (Véase la tabla "Desplazamiento de la Curva" para los resultados obtenidos)

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-SO₄

Domaine d'utilisation: La technique Coat-A-Count DHEA-SO₄ est un dosage radioimmunologique pour la mesure quantitative du sulfate de déhydroépiandrostérone (DHEA-SO₄) dans le sérum et le plasma. Réservé à un usage diagnostique *in vitro*.

Référence catalogue :

TKDS1 (100 tubes), **TKDS2** (200 tubes),
TKDS5 (500 tubes), **TKDSX** (1000 tubes)



Le coffret de 100 tubes contient moins de 4 micro curies (148 kilobecquerels) de DHEA-SO₄ marqué à l'iode I125 ; Le coffret de 200 tubes contient moins de 8 micro curies (296 kilobecquerels); Le coffret de 500 tubes contient moins de 20 micro curies (740 kilobecquerels); Le coffret de 1000 tubes contient moins de 40 micro curies (1480 kilobecquerels)

Introduction

Le sulfate de déhydroépiandrostérone est un stéroïde surrénalienne dont le dosage est important pour la recherche d'un développement anormal du système pileux (hirsutisme) ou d'une alopecie chez la femme.^{1,4,7} Ce dosage peut aussi avoir un intérêt pour apprécier l'adrenarche et une puberté retardée.^{3,4}

L'origine essentielle du DHEA-SO₄ circulant est surrénalien, bien que chez l'homme une partie puisse provenir des testicules en intervenant partiellement dans les modifications sexuelles observées vers l'âge de 15 ans^{11,17} Par ailleurs cette hormone n'est pas produite par les ovaires même dans des conditions pathologiques^{2,16} En tant que tel le DHEA-SO₄ est faiblement androgénique mais il peut être métabolisé en androgènes plus puissants tels l'androsténone et la testostérone et ainsi devenir une cause d'hirsutisme ou de virilisation.^{1,16}

Les taux de DHEA-SO₄ augmentent régulièrement à partir de la septième année de vie puis baissent peu à peu à partir de trente ans.^{11,16,17} Selon la littérature, la limite supérieure normale pour de jeunes adultes est d'environ 300 µg/dl pour les femmes et 500 µg/dl pour les hommes.⁸ La grossesse et les contraceptifs oraux provoquent une légère diminution de ces taux.^{4,16}

La DHEA-SO₄ est sécrétée dans la circulation sanguine à un taux légèrement plus élevé que la DHEA, mais du fait d'un métabolisme beaucoup plus lent et d'une demi vie proche d'une journée, le taux de DHEA-SO₄ sanguin est presque mille fois plus élevé que le taux de DHEA.^{4,13,16} Contrairement au cortisol, le DHEA-SO₄

ne présente pas de variations diurnes significatives.^{4,15} A l'opposé de la testostérone, il ne circule pas sous forme lié aux globulines de la Sex Hormone Binding Globulin (SHBG ou TeBG) et n'est pas, en conséquence, influencé par les modifications des taux de cette protéine de transport.¹⁶ Son abondance, sa stabilité dans la journée, et d'un jour à l'autre, font du DHEAS un excellent indicateur direct de la sécrétion androgénique surrénalienne et dans ce contexte supérieur à la détermination des 17 cétostéroïdes urinaires.^{1,2,4,8}

De ce fait, le DHEA-SO₄ est souvent associé au dosage de la testostérone libre pour un dépistage initial d'hyperandrogénie lors d'un hirsutisme.^{5,9} L'une au moins de ces deux hormones est vraisemblablement élevée dans la majorité des cas (80% selon la littérature).⁹ Parfois, le DHEA-SO₄ est la seule hormone circulant à un taux supérieur à la normale et apparemment plus sujet à être élevé que les autres androgènes durant les premiers stades de l'hirsutisme.⁹

Des taux élevés de DHEA-SO₄ sont fréquemment rencontrés dans le syndrome d'ovaires polykystiques (PCOS) indiquant que l'hyperandrogénie surrénalienne est un aspect bien typique de ce syndrome.² Des taux élevés plasmatiques, pouvant être réprimés par la dexaméthasone, au delà de deux semaines de traitement, peuvent être associés à une hyperplasie surrénalienne.^{4,6,9} Des concentrations très élevées, (700 à 800 µg/dl) chez la femme suggèrent une tumeur surrénalienne hormono-sécrétante.¹³ (A l'opposé, les taux de DHEA-SO₄ sont typiquement normaux en présence de tumeurs ovariennes.¹)

Principe du test

Le dosage Coat-A-Count DHEA-SO₄ est un dosage radioimmunologique en phase solide. Au cours de l'incubation, il y a compétition entre le DHEA-SO₄ marqué à l'iode 125 et le DHEA-SO₄ contenu dans l'échantillon 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-SO₄ présente dans l'échantillon qui sera déterminée à l'aide d'une courbe standard.

Réactifs à distribuer: 1

Temps d'incubation totale : 30 minutes

Activité totale en début de marquage :
environ 50 000 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-VHC 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. Éviter 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

Tubes revêtus d'anticorps anti-DHEA-SO₄ (TDS1)

Tubes en polypropylène revêtus d'anticorps anti- DHEA-SO₄ 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: Rose pâle.

TKDS1: 100 tubes. **TKDS2:** 200 tubes.
TKDS5: 500 tubes. **TKDSX:** 1000 tubes.

DHEA-SO₄ marqué à l'iode 125 (TDS2)

DHEA-SO₄ marqué à l'iode 125 avec des conservateurs fourni sous forme lyophilisée, reconstituer chaque flacon avec **110 ml** d'eau distillée. Bien reboucher le flacon et mélanger par légers retournements. Conserver à $+2/+8^{\circ}\text{C}$, stables au moins 30 jours après ouverture ou jusqu'à la date de péremption indiquée sur le flacon. *Ne pas transférer le traceur dans un récipient en plastique.*

TKDS1: 1 flacon. **TKDS2:** 2 flacons.
TKDS5: 5 flacons. **TKDSX:** 10 flacons.

Standards DHEA-SO₄ (TDS3-9)

7 standards étiquetés de A à G, sous forme lyophilisée en matrice protéine, avec conservateur. Reconstituer le standard zéro (A) avec **3,0 ml** d'eau distillée, et les autres standards (B à G) avec **1,0 ml**. Stable à $+2/+8^{\circ}\text{C}$ pendant 30 jours après ouverture. Il est possible d'augmenter la durée de vie des standards en les congelant (-20°C). Aliquoter, dans des tubes de verre ou polypropylène bien bouchés, afin d'éviter de répéter les cycles congélation / décongélation.

TKDS1: 1 jeu. **TKDS2:** 1 jeu.
TKDS5: 2 jeux. **TKDSX:** 3 jeux.

Les standards contiennent respectivement, 0, 5, 20, 50, 200, 500 et 1 000 micro-grammes de DHEA-SO₄ par décilitre ($\mu\text{g/dl}$); soit: 0, 0,14, 0,54, 1,36, 5,4, 13,6 et 27,1 micro-moles par litre ($\mu\text{mol/l}$). Des points intermédiaires peuvent être obtenus en mélangeant des standards dans des proportions compatibles.

Matériel requis mais non fourni

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

Préparation des réactifs

Epruvette graduée : 110 ml
Pipettes Volumétriques : 1,0 ml et 3,0 ml
Eau distillée ou désionisée

Dosage radioimmunologique

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

Micropipettes: 50 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 (Référence catalogue : FDR)

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

Un contrôle immunodosage, à base de sérum humain, à trois niveaux de concentration, contenant du DHEA-SO₄ (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 veineuse¹⁹ sur tubes secs (sans anticoagulant) et séparer le sérum des cellules. Le plasma EDTA est acceptable pour ce dosage (Voir le chapitre « Autres types d'échantillons »).

Des études démontrent un effet significatif des acides gras non estérifiés sur ce dosage : des valeurs physiologiques élevées d'acide oléique montrent un effet in-vitro.

Il est recommandé de clarifier les échantillons hyperlipémiques par ultracentrifugation.

Des échantillons hémolysés peuvent être révélateurs d'une préparation inadéquate du prélèvement avant son envoi au laboratoire ; il faudra donc interpréter les résultats avec prudence.

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-SO₄ 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 : 50 µl par tube.

Conservation: dans des tubes de verre ou polypropylène, 2 jours à +2/+8° C ou 2 mois à -20°C.¹⁸ Avant le dosage, 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.

Protocole de dosage

Tous les composants doivent être à température ambiante avant leur utilisation (15–28°C).

- 1 Tubes secs :** Etiqueter deux séries de tubes (non revêtus) en polypropylène 12x75 mm tubes T (activité totale) et LNB (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-SO₄, A (liaison maximale B0) et de B à G, en duplicate. Etiqueter les tubes revêtus d'anticorps anti-DHEA-SO₄ supplémentaires, également en duplicate, pour les contrôles et les échantillons patients.

Standards	µg/dl	µg/mL	µmol/l
A (B0)	0	0	0
B	5	0,05	0,14
C	20	0,2	0,54
D	50	0,5	1,36
E	200	2	5,4
F	500	5	13,6
G	1 000	10	27,1

- 2** Pipeter **50 µl** du standard zéro A dans les tubes de LNS et les tubes A. Pipeter **50 µl** de chacun des autres standards, contrôles et échantillons de patients dans les tubes correspondants préparés. **Pipeter directement au fond du tube.**

Les échantillons de patients suspectés de contenir des concentrations de DHEA-SO₄ supérieures au standard le plus élevé (1 000 µg/dl) doivent être dilués avec le standard zéro 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-SO₄ marqué à l'iode 125 dans chaque tube. Vortexer.

Les laboratoires équipés d'un pipeteur-diluteur fiable peuvent procéder aux étapes 2 et 3 simultanément après l'avoir rincé deux fois avec le traceur

Pas plus de 10 minutes ne doivent s'écouler pendant la distribution du traceur. Les tubes T peuvent être mis de côté jusqu'au comptage (étape 6); ils n'ont besoin d'aucun autre traitement.

- 4** Incuber pendant **30 minutes à 37°C**.
Utiliser un bain-marie. Une étuve ou un bloc chauffant ne sont pas adaptés à cet usage.
- 5** Décanter 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 LNS:

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

Puis déterminer pour chaque doublet la capacité de liaison en pourcentage de liaison maximale (B0), corrigée des cpm dus au LNS des tubes A tubes considérés à 100%:

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

Les échantillons dans la gamme de calibration donnent des résultats pratiquement identiques quand la capacité de liaison est calculée directement à partir de la moyenne des CPM. : sans correction de LNS.

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 standard (même si celle-ci est faite par ordinateur) avec les différentes valeurs de façon à visualiser le meilleur tracé, c'est également une façon de détecter les points déviants. Nous recommandons aussi de suivre les paramètres suivants :

T = Activité totale (cpm)

%LNS = 100 × (Moyenne des cpm du LNS / cpm Totaux)

%LM = 100 × (cpm corrigés / 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-SO₄ – 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.

Valeurs de référence

L'étude des valeurs de référence a été menée sur deux sites utilisant le coffret Coat-A-Count DHEA-SO₄ sur 202 échantillons. Le tableau donne les médianes, le domaine des 95 percentiles établis à partir des données combinées :

	Médiane	Domaine (95%)	n
Femmes	170 µg/dl	35 – 430 µg/dl	132
Hommes	280 µg/dl	80 – 560 µg/dl	70

De plus, 74 sérums de femmes enceintes et postpartum ont été analysés en donnant comme attendu des valeurs dégressives, du premier, troisième trimestre de grossesse et un jour après accouchement avec les médianes respectives de 230, 105 et 65 µg/dl.

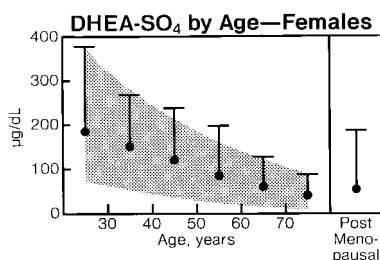
Une autre étude portant sur 136 femmes et 155 hommes a été analysée par sexe et tranche d'âge : Sur les graphiques, les cercles pleins indiquent les médianes (50^{ème}ile) tandis que les barres T représentent les 95^{ème}ile. Les parties ombrées illustrent la décroissance des taux de DHEA-SO₄ en fonction de l'âge.

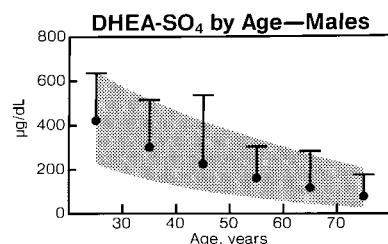
Les résultats d'une étude antérieure du même laboratoire sur 60 échantillons de femmes post-ménopausées sont inclus dans le tableau et graphiques suivants :

Tranche d'âge	n	5 ^{ème} %ile	50 ^{ème} %ile	95 ^{ème} %ile
Femmes				
10–19	2	—	140	—
20–29	23	65	185	380
30–39	29	45	150	270
40–49	29	32	120	240
50–59	18	26	85	200
60–69	21	13	50	130
70–79	8	17	40	90
80–89	6	—	26	—
Post-menopausée	60	10	55	190
Hommes				
10–19	6	—	215	—
20–29	17	280	420	640
30–39	21	120	300	520
40–49	23	95	250	530
50–59	29	70	160	310
60–69	37	42	130	290
70–79	18	28	80	175
80–89	4	—	36	—

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

Se reporter aussi aux 2 graphiques « DHEA-SO₄ en fonction de l'âge », chez l'homme et chez la femme où les cercles pleins désignent la médiane (50^{ème}ile), la barre du T, les 95^{ème}ile et la zone ombrée, un lissage des 5^{ème}ile et 95^{ème}ile pour une relation taux de DHEA-SO₄ en fonction de l'âge.





Performances du test

Consulter les tableaux et graphiques pour obtenir les données représentatives des performances de ce test. Les résultats sont exprimés en micro-grammes de DHEA-SO₄ par décilitre (µg/dl). Tous les résultats ont été obtenus à partir d'échantillons sériques.

Facteur de conversion :

µg/dl $\times$ 0,02714 $\rightarrow$ µmol/l

Domaine de mesure : 5 – 1 000 µg/dl
(0,14 – 27 µmol/l)

Sensibilité analytique : 1,1 µg/dl

Précision intra-dosage (au sein d'une même série) : Les résultats ont été calculés pour chacun des 4 échantillons à partir des résultats de 20 tubes en duplicate dans une même série. (Voir le tableau "Intraassay Precision")

Précision inter-dosage (entre plusieurs séries) : Les résultats ont été calculés pour chacun des 4 échantillons à partir des résultats de 24 séries en duplicate. (Voir le tableau "Interassay Precision".)

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

Test de récupération : Des échantillons chargés dans un rapport de 1 à 19 avec 3 solutions de DHEA-SO₄ (1 452, 3 046 et 4 820 µg/dl) ont été dosés. (Voir le tableau "Recovery".)

Spécificité : L'antisérum utilisé dans la technique Coat-A-Count DHEA-SO₄ est très spécifique du DHEA-SO₄. Il présente de très faibles réactions croisées avec les composés pouvant se trouver dans les échantillons des patients, stéroïdes ou médicaments. (Voir le tableau « Specificity ».)

Effet de la position des tubes : Aucun jusqu'à 250 tubes. (Voir le tableau « End-of-Run Effect ».)

Effet des protéines : Pour simuler différentes concentrations en protéines, des expériences ont été effectuées en reconstituant des aliquotes de 2 ml de sérums humains lyophilisés avec différents volumes d'eau (1, 2, 3 et 4 ml). Chaque aliquote reconstituée a été dosée à l'aide de la méthode Coat-A-Count DHEA-SO₄. 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 résultats montrent, que même de grandes variations de la concentration en protéines n'ont pas d'effet sur le dosage. (Voir le tableau "Protein Effect" pour les données représentatives.)

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.

Hémolyse : La présence d'agrégat d'hématies jusqu'à une concentration de 30 µl/ml, n'a aucun effet sur les résultats quant à la précision du dosage.

Autres types d'échantillons : pour estimer l'effet de l'utilisation de différents type d'échantillons, 22 volontaires ont été prélevés sur tubes secs, héparinés, EDTA et sur tubes vacutainer SST[®] Becton Dickinson. Tous les échantillons ont été dosés avec le protocole Coat-A-Count DHEA-SO₄. Par régression linéaire :

(Héparine) = 1,03 (Sérum) – 3,4 µg/dl
r = 0,991

(EDTA) = 1,02 (Sérum) – 7,8 µg/dl
r = 0,990

(SST) = 1,09 (tubes ordinaires) – 19 µg/dl
r = 0,987

Moyennes :
208 µg/dl (Sérum)
211 µg/dl (Héparine)
204 µg/dl (EDTA)
208 µg/dl (SST)

Comparaison de méthodes : La technique Coat-A-Count DHEA-SO₄ a été comparée sur 112 échantillons sériques avec un autre radio-immunos dosage (Coffret A). Par régression linéaire :

(Coat-A-Count) = 1,14 (Coffret A) – 6,9 µg/dl
r = 0,975

Moyennes :
183 µg/dl (Coat-A-Count)
168 µg/dl (Coffret A)

Une autre étude a comparé les résultats de 99 patients avec l'anticorps actuel et l'ancien anticorps. Par régression linéaire :

(Actuel) = 0,99 (Ancien) – 0,46 µg/dl
r = 0,980

Moyennes :
196 µg/dl (Actuel)
197 µg/dl (Ancien)

Test de parallélisme: Deux échantillons ont été dosés avec la technique Coat-A-Count DHEA-SO₄ après dilution volume à volume avec les standards du coffret (0, 5, 20, 50, 200, 500 et 1 000 µg/dl). (Se reporter au tableau "Curve Displacement".)

Assistance technique

Contactez 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-SO₄

Uso: Il Coat-A-Count DHEA-SO₄ è un radioimmunosaggio per la determinazione quantitativa del deidroepiandrosterone solfato (DHEA-SO₄) nel siero e nel plasma. E' a solo uso diagnostico *in vitro*.

Codice: **TKDS1** (100 provette),
TKDS2 (200 provette),
TKDS5 (500 provette),
TKDSX (1000 provette)



Il kit da 100 determinazioni contiene meno di 4 microcurie (148 kilobecquerel) di DHEA-SO₄ marcata con I¹²⁵; il kit da 200 determinazioni contiene meno di 8 microcurie (296 kilobecquerel); il kit da 500 determinazioni contiene meno di 20 microcurie (740 kilobecquerel); il kit da 1000 determinazioni contiene meno di 40 microcurie (1480 kilobecquerel)

Riassunto e spiegazione del Test

Le determinazioni di deidroepiandrosterone solfato (DHEA-SO₄, DHEAS), uno steroide surrenale, sono importanti nello studio della crescita anomala di peli (irsutismo) e nella calvizie (alopecia) nelle donne.^{1,4,7} Sono anche valide nella determinazione dell'adrenarca e nella pubertà tardiva.^{3,4}

Il DHEA-SO₄ in circolo ha origine quasi interamente nei surreni, benché negli uomini possa anche aver origine nei testicoli, in parte dovuto alla differenziazione tra i sessi che emerge a circa 15 anni.^{11,17} D'altro canto, questo ormone non è prodotto dalle ovaie anche in situazioni patologiche.^{2,16} In se stesso il DHEA-SO₄ è solo debolmente androgenico, ma può metabolizzarsi in androgeni molto più potenti quali l'androstenedione ed il testosterone e quindi essere direttamente la causa dell'irsutismo o della virilizzazione.^{1,16}

I livelli plasmatici di DHEA-SO₄ aumentano costantemente dal settimo anno di età, quindi declinano gradualmente dopo i 30 anni.^{11,16,17} Secondo i dati presenti in letteratura, il limite superiore di normalità nei giovani è di circa 300 µg/dL per le donne, e 500 µg/dL per gli uomini.⁸ La gravidanza o l'assunzione di contraccettivi orali provocano un moderato decremento.^{4,16}

Il DHEA-SO₄ è secreto nel circolo sanguigno a tassi che solo occasionalmente superano quelli del DHEA, ma a causa del suo turnover molto più lento, il DHEA-SO₄ ha un'emivita quasi pari ad un giorno intero – e si mantiene livelli plasmatici circa un centinaio di volte superiori.^{4,13,16} A differenza del cortisolo, il DHEA-SO₄ non presenta variazioni diurne significative.^{4,15} Diversamente dal testosterone, non circola legato alla SHBG e quindi non viene influenzato dalle alterazioni nel livello delle proteine carrier.¹⁶ La sua abbondanza, insieme alla stabilità all'interno di un giorno o da un giorno all'altro, lo rende un eccellente indicatore diretto della produzione di androgeni surrenali – in questo contesto superiore, certamente, alle determinazioni di chetosteroidi 17 urinari.^{1,2,4,8}

In linea con questo, il DHEA-SO₄ è spesso dosato unitamente al testosterone libero

quale screening iniziale per iperandrogenismo nell'irsutismo.^{5,9} Almeno uno di questi due ormoni è presumibilmente elevato nella stragrande maggioranza dei casi – verosimilmente in oltre l'80% delle volte.⁹ Qualchevolta il DHEA-SO₄ è l'unico ormone circolante ad un livello al di sopra del normale ed è apparentemente più elevato durante i primi stadi dell'irsutismo rispetto alla maggior parte degli altri androgeni.⁹

Livelli elevati di DHEA-SO₄ si incontrano spesso nella sindrome dell'ovaio policistico, dimostrando che l'iperandrogenismo surrenalico è tipicamente una sfaccettatura di questa sindrome.² Livelli di plasma elevati – nel corso di circa due settimane – possono essere soppressi con desametasone e possono esitare in iperplasia surrenale.^{4,6,9} Livelli estremamente elevati (superiori a 700 o 800 µg/dL) nelle donne indicano un tumore surrenale che secerne l'ormone.¹³ (Diversamente, i livelli di DHEA-SO₄ sono tipicamente normali in presenza di tumori ovarici.¹)

Procedura del Dosaggio

Nel dosaggio Coat-A-Count DHEA-SO₄, il DHEA-SO₄ marcato con I¹²⁵ compete con il DHEA-SO₄ presente nel campione del paziente per i siti anticorpali presenti sulle provette coattate. Dopo incubazione, attraverso decantazione si separa il legato dal libero. La provetta viene quindi contata in un gamma counter, le conte sono inversamente proporzionali alla quantità di DHEA-SO₄ presente nel campione del paziente. La quantità di DHEA-SO₄ nel campione è determinata comparando le conte alla curva di calibrazione.

Reagenti da Dispensare: 1

Tempo Totale di Incubazione: 30 minuti

Conte Totali alla iodinazione:
circa 50 000 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 analizzati 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 esercitino 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

Provette Coattate con anticorpi anti-DHEA-SO₄ (TDS1)

Provette di polipropilene coattate con anticorpi DHEA-SO₄ e confezionati 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: rosa chiaro.

TKDS1: 100 provette. **TKDS2:** 200 provette. **TKDS5:** 500 provette. **TKDSX:** 1000 provette

DHEA-SO₄ marcato con I125 (TDS2)

DHEA-SO₄ iodinato in forma liofila, con conservanti. Ricostituire ciascun flacone

con **110 mL** di acqua distillata o deionizzata. Sigillare e mescolare capovolgendo il flacone. Stabile a 2–8°C per 30 giorni dopo l'apertura, o fino alla data di scadenza indicata sulla provetta. *Non trasferire il tracciante in un contenitore di plastica.*

TKDS1: 1 flacone. **TKDS2:** 2 flaconi

TKDS5: 5 flaconi. **TKDSX:** 10 flaconi.

Calibratori DHEA-SO₄ (TDS3–9)

Sette flaconi, etichettati dalla A alla G, di calibratori su base proteica in forma liofila, con conservanti. Ricostituire il calibratore zero A con **3,0 mL** di acqua distillata o deionizzata ed i rimanenti calibratori dalla B alla G con **1,0 mL**. Stabile a 2–8°C per 30 giorni dopo l'apertura. Per periodi di conservazione più lunghi aliquotare in provette di vetro o di polipropilene sigillare e congelare a –20°C.

TKDS1: 1 set. **TKDS2:** 1 set.

TKDS5: 2 set. **TKDSX:** 3 set.

I calibratori contengono, rispettivamente 0, 5, 20, 50, 200, 500 e 1 000 microgrammi di DHEA-SO₄ per decilitro (µg/dL); equivalenti a: 0, 0,14, 0,54, 1,36, 5,4, 13,6 e 27,1 micromoli per litro (µmol/L). I punti intermedi della calibrazione possono essere ottenuti mescolando i calibratori in proporzioni idonee.

Materiali Richiesti Ma Non Forniti

Gamma counter – compatibile con le provette standard 12x75 mm

Vortex mixer

Preparazione dei Reagenti

Cilindro graduato: 110 mL

Pipette volumetriche: 1,0 mL e 3,0 mL

Acqua distillata o deionizzata.

Radioimmunoassay

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

Micropipette: da 50 µL e da 1 000 µL.

Bagnetto termostato — capace di mantenere la temperatura a 37°C. Non possono essere utilizzati né un forno né un dispositivo riscaldato.

Foam per la decantazione — disponibili da DPC.

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

Un controllo umano su base sierica a tre livelli, contenente DHEA-SO₄ tra gli oltre 25 costituenti dosati, disponibile da DPC. (Codice: CON6).

Prelievo dei Campioni

Non è necessario che il paziente sia a digiuno, non sono necessarie preparazioni particolari. Prelevare il sangue¹⁹ in provette semplici, e separare il siero o il plasma dalle cellule. Occorre annotare l'ora del prelievo. Può essere utilizzato anche il plasma EDTA. (Vedi la sezione sugli Tipo di Campione Alternativo).

Gli studi effettuati sugli acidi grassi non esterificati (NEFA) dimostrano che l'acido oleico ha un effetto significativo *in vitro* sul dosaggio a concentrazioni fisiologicamente elevate.

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

I campioni emolizzati posson indicare il trattamento non idoneo del campione prima dell'arrivo al laboratorio; per questo motivo, i risultati devono essere interpretati con prudenza.

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-SO₄ 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: 50 µL per provetta.

Conservazione: 2 giorni a 2–8°C in provette di vetro o di polipropilene, o 2 mesi a –20°C.¹⁸ Prima del dosaggio, consentire ai campioni di raggiungere temperatura ambiente (15–28°C) e mescolare scuotendo leggermente o 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.

Dosaggio Radioimmunologico

Tutti i componenti devono essere a temperatura ambiente (15–28°C) prima dell'utilizzo.

- 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 anche omesse senza compromettere l'accuratezza o il controllo di qualità.

Provette Coattate: Etichettare con A 14 provette coattate con anticorpo DHEA-SO₄ (legame massimo) e da B ad G in duplicato. Etichettare altre provette coattate con anticorpo, anch'esse in duplicato, per i controlli ed i campioni dei pazienti.

Calibratori	µg/dL	µg/mL	µmol/L
A (MB)	0	0	0
B	5	0,05	0,14
C	20	0,2	0,54
D	50	0,5	1,36
E	200	2	5,4
F	500	5	13,6
G	1 000	10	27,1

- 2** Dispensare **50 µL** del calibratore zero A nelle provette NSB ed A, e **50 µL** di ciascuno dei calibratori, controlli e campioni dei pazienti rimanenti nelle provette preparate. **Pipettare direttamente al fondo.**

Campioni con concentrazioni di DHEA-SO₄ più alte del calibratore più elevato (1 000 µg/dL) devono essere diluiti nel calibratore zero 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-SO₄ marcata con I¹²⁵ in ogni provetta. Vortexare brevemente e dolcemente. Devono trascorrere non più di dieci minuti durante la dispensazione del

tracciante. Se viene utilizzata una pipetta a ripetizione con una siringa di plastica, risciacquarla due volte con il tracciante prima di dispensare. Mettere da parte le provette T per la conta (al punto 6); non sono necessari ulteriori passaggi.

4 Incubare per 30 minuti a 37°C.

Utilizzare un bagnetto termostato. Non utilizzare né forni né piastre riscaldate.

5 Decantare completamente.

Rimuovere tutta l'umidità visibile aumentando così la precisione. Utilizzando un foam, decantare il contenuto di tutte le provette (ad eccezione delle provette T) e consentire loro di asciugarsi 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 sconosciuti 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

Devono essere dosati in routine come campioni sconosciuti controlli (o pool di sieri) con almeno due livelli di concentrazione di DHEA-SO₄ (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, quali 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.

Valori Attesi

E' stato effettuato uno studio sui range di riferimento effettuato con il dosaggio Coat-A-Count DHEA-SO₄. Sono stati analizzati 202 campioni provenienti da adulti in buono stato di salute. Di seguito sono presentati il valore mediano ed il range per i dati combinati, il range rappresenta il valore centrale al 95% delle osservazioni.

	Mediana	Range (Centrale 95%)	n
Femmine	170 µg/dL	35 – 430 µg/dL	132
Maschi	280 µg/dL	80 – 560 µg/dL	70

Inoltre, sono stati analizzati un totale di 74 campioni provenienti da donne in gravidanza e post-parto. I risultati, come atteso, hanno presentato un declino progressivo: i valori mediani per il primo ed il terzo trimestre e per un giorno post-parto erano rispettivamente 230, 105 e 65 µg/dL.

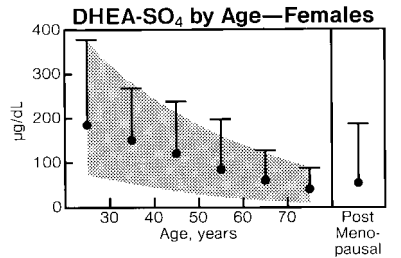
E' stato condotto un ulteriore studio di riferimento presso un grosso ospedale nel Nord-Est degli Stati Uniti su 136 donne e 155 uomini, tutti di età ignota. I risultati, suddivisi per sesso ed età, sono riassunti nella tabella e nei grafici seguenti. Nei grafici, i tondini indicano le mediane (50° percentile) mentre le barre a "T" indicano il 95° percentile. L'ombreggiatura rappresenta la smussatura del 5° e 95° percentile secondo un semplice modello che ritrae il comportamento del DHEA-SO₄ in circolo in funzione dell'età.

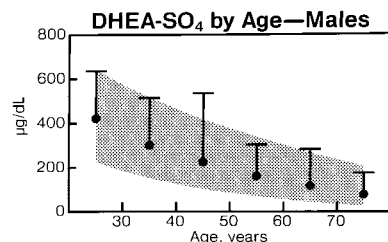
I risultati dello studio precedente effettuato dallo stesso laboratorio su 60 campioni postmenopausa sono riassunti nella tabella e nei grafici seguenti.

Età	n	5° %ile	50° %ile	95° %ile
Femmine				
10–19	2	—	140	—
20–29	23	65	185	380
30–39	29	45	150	270
40–49	29	32	120	240
50–59	18	26	85	200
60–69	21	13	50	130
70–79	8	17	40	90
80–89	6	—	26	—
Post-menopausa	60	10	55	190
Maschi				
10–19	6	—	215	—
20–29	17	280	420	640
30–39	21	120	300	520
40–49	23	95	250	530
50–59	29	70	160	310
60–69	37	42	130	290
70–79	18	28	80	175
80–89	4	—	36	—

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

Vedi anche i grafici "DHEA-SO₄ by Age: Males" e "DHEA-SO₄ by Age: Females". I tondini indicano le mediane (50° percentile) mentre le barre a "T" indicano il 95° percentile. L'ombreggiatura rappresenta la smussatura del 5° e 95° percentile secondo un semplice modello che ritrae il comportamento del DHEA-SO₄ in circolo in funzione dell'età.





Prestazioni del Dosaggio

Vedi Tabelle e Grafici per i dati *representativi* delle performance del test Coat-A-Count DHEA-SO₄. I risultati sono espressi come µg/dL.

Fattore di Conversione:

µg/dL × 0,02714 → µmol/L

Range di calibrazione: 5 – 1 000 µg/dL
(0,14 – 27 µmol/L)

Sensibilità analitica: 1,1 µg/dL,

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

Precisione Inter-Dosaggio (Da una seduta all'altra): Sono state calcolate statistiche per i campioni dai risultati di coppie di provette in 24 dosaggi differenti (Vedi tabella "Interassay Precision".)

Linearità: I campioni sono stati dosati a varie diluizioni. (Vedi tabella "Linearity" per dati rappresentativi.)

Recupero: Sono stati dosati 1:19 campioni cui sono state aggiunte tre soluzioni di DHEA-SO₄ (1 452, 3 046 e 4 820 µg/dL). (Vedi tabella "Recovery")

Specificità: L'antisiero è altamente specifico per il DHEA-SO₄ con bassa crossreattività verso altri steroidi presenti in natura o medicinali che possano essere presenti nei campioni. (Vedi tabella "Specificity".)

Effetto Fine-Seduta: Nessuno fino a circa 250 provette. (Vedi tabella "End-of-Run Effect").

Effetto delle Proteine: Per simulare le concentrazioni delle varie proteine, sono stati effettuati esperimenti nei quali aliquote da 2,0 mL di un pool di sieri umani sono state liofilizzate e quindi

ricostituite con vari volumi di acqua (1,2 e 3 mL). Ciascuna aliquota ricostituita è stata dosata con il dosaggio Coat-A-Count DHEA-SO₄. Fare attenzione che le aliquote ricostituite con metà del volume originario rappresentino una concentrazione di proteine estremamente elevata, nell'ordine di 14 g/dL. (Il fattore per correggere il volume di ricostituzione è tabulato di seguito). I risultati indicano che anche con variazioni consistenti delle proteine non ci sono effetti sul dosaggio Coat-A-Count DHEA-SO₄. (Vedi tabella "Protein Effect").

Effetto degli Acidi Grassi Liberi: Per indagare sull'effetto degli acidi grassi non esterificati (NEFA), sono state liofilizzate aliquote di tre campioni, ricostituite e quindi dosate con il dosaggio Coat-A-Count DHEA-SO₄. Soluzioni acquose contenenti 0, 2,5, 5, e 10 mmol/L di acido oleico sono state utilizzate per la ricostituzione. I risultati dimostrano che l'acido oleico – a concentrazioni fisiologicamente elevate – ha un effetto significativo *in vitro* sul dosaggio.

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.

Emolisi: La presenza di globuli rossi impaccati in concentrazioni fino a 30 µL/mL non ha effetto sui risultati entro il range di precisione del dosaggio.

Tipo di Campione Alternativo: Per determinare l'effetto di campioni alternativi, è stato prelevato del sangue da 22 volontari in provette semplici, eparinizzate, EDTA e Becton Dickinson vacutainer SST®. Tutti i campioni sono stati dosati con il dosaggio Coat-A-Count DHEA-SO₄. Mediante regressione lineare:

(Eparina) = 1,03 (Siero) – 3,4 µg/dL
r = 0,991

(EDTA) = 1,02 (Siero) – 7,8 µg/dL
r = 0,990

(SST) = 1,09 (tubi semplici) – 19 µg/dL
r = 0,987

Valore medio:
208 µg/dL (Siero)
211 µg/dL (Eparina)
204 µg/dL (EDTA)
208 µg/dL (SST)

Comparazione di Metodi: Il dosaggio Coat-A-Count DHEA-SO₄ è stato

comparato ad un dosaggio disponibile in commercio (Kit A) su 112 campioni di siero. Mediante regressione lineare:

(Coat-A-Count) = 1,14 (Kit A) – 6,9 µg/dL
r = 0,975

Valore medio:

183 µg/dL (Coat-A-Count)

168 µg/dL (Kit A)

In un altro studio, 99 campioni di siero sono stati simultaneamente dosati con il dosaggio Coat-A-Count DHEA-SO₄ utilizzando il nuovo ed il precedente anticorpo. Mediante regressione lineare:

(Nuovo) = 0,99 (Precedente) – 0,46 µg/dL
r = 0,980

Valore medio:

196 µg/dL (Nuovo)

197 µg/dL (Precedente)

Curva di Dislocazione: Due campioni sono stati dosati con il dosaggio Coat-A-Count DHEA-SO₄ incluse diluizioni 1:1 del campione con ciascuno dei calibratori dalla A alla G. (0, 5, 20, 50, 200, 500 e 1 000 µg/dL). (Vedi tabella "Curve Displacement" per dati rappresentativi)

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

DHEA-SO₄ Coat-A-Count

Utilização: O DHEA-SO₄ Coat-A-Count é um radioimunoensaio designado para o doseamento quantitativo do sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEA-SO₄) no soro e plasma. Destina-se exclusivamente ao diagnóstico *in vitro*.

Números de catálogo:

TKDS1 (100 tubos), **TKDS2** (200 tubos),
TKDS5 (500 tubos), **TKDSX** (1000 tubos)



O Kit com 100 tubos contém menos que 4 microcuries (148 kilobecquerels) de ¹²⁵I radioactivo ligado ao DHEA-SO₄; o Kit com 200 tubos contém menos que 8 microcuries (296 kilobecquerels); o Kit

com 500 tubos contém menos que 20 microcuries (740 kilobecquerels), o kit com 1000 tubos contém menos que 40 microcuries (1480 kilobecquerels).

Sumário e Explicação do Teste

As mensurações do sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEA-SO₄, DHAS), um esteróide adrenal, é importante às investigações do crescimento anormal de cabelos (hirsutismo) e calvície (alopecia) na mulher.^{1,4,7} Também é de valor na avaliação da adrenarca e na puberdade tardia.^{3,4}

O DHEA-SO₄ em circulação origina-se quase que totalmente das adrenais, apesar que no homem alguns podem ser derivado dos testículos, parcialmente acompanhando as diferenças sexuais que ocorrem por volta dos 15 anos de idade.^{11,17} Por outro lado este hormônio não é produzido pelos ovários ainda que em condições patológicas. Por isso mesmo, o DHEA-SO₄ é apenas fracamente androgênico, mas pode ser metabolizado aos mais potentes andrógenos como a androstenediona e a testosterona, e estes podem indirectamente ser a causa do hirsutismo ou virilização.^{1,16}

Os níveis plasmáticos de DHEA-SO₄ aumentam constantemente até cerca do 17º ano de vida e declinam gradualmente após a 3ª década.^{11,16,17} De acordo com a literatura, o limite superior para adultos jovens normais é de aproximadamente 300 µg/dL para mulheres e 500 µg/dL para homens. A gravidez e uso de contraceptivos orais induzem a um decréscimo moderado.^{4,16}

O DHEA-SO₄ é secretado na corrente sanguínea em uma taxa um pouco maior que o DHEA, mas por causa do seu "turnover" ser muito menor, DHEA-SO₄ tem a sua meia vida ao redor de um dia completo, e isto mantém o nível plasmático quase mil vezes maior. Diferente do Cortisol, o DHEA-SO₄ não exhibe uma variação diurna significativa. Ao contrário da testosterona, ele não circula ligado as globulinas ligadoras de hormônios sexuais, sendo assim, ele não é influenciado pela alteração do nível destas proteínas carregadoras. Sua abundância juntamente com a sua

estabilidade dentro do mesmo dia e de dia-a-dia, faz do mesmo um indicador excelente e directo da resposta androgênica das adrenais – superior, certamente, à medida urinária do 17-cetoesteróides neste contexto.^{1,2,4,8}

Desta maneira, frequentemente, o DHEA-SO₄ é ensaiado em conjunto com a testosterona livre como uma triagem inicial do hiperandrogenismo no hirsutismo.^{5,9} Pelo menos um desses dois hormônios deverá estar elevado na grande maioria dos casos – reportadamente como 80% das vezes. Algumas vezes o DHEA-SO₄ é o único hormônio circulante em nível acima do normal e aparentemente é o que mais está elevado durante os estágios iniciais do hirsutismo do que os outros andrógenos.⁹

Altos níveis de DHEA-SO₄ são encontrados frequentemente na síndrome de ovário policístico, mostrando que o hiperandrogenismo adrenal é claramente uma faceta típica desta síndrome.² Níveis plasmáticos elevados, os quais, ao longo de duas semanas, ou mais, são suprimíveis pela dexametazona e podem resultar de uma hiperplasia adrenal.^{4,6,9} Níveis extremamente altos (superiores a 700 ou 800 µg/dL) nas mulheres são sugestivos de um tumor adrenal secretor deste hormônio.¹³ (Em contraste, os níveis de DHEA-SO₄ são tipicamente normais na presença de tumores ovarianos.¹)

Princípio do Procedimento

No procedimento de DHEA-SO₄ Coat-A-Count, o DHEA-SO₄ marcado com 125I compete com o DHEA-SO₄ da amostra do paciente para os sítios do anticorpo, que recobre os tubos. Após a encubação, a reparação do ligado do livre é realizada por uma decantação simples. O tubo, é então contado em um contador tipo gama, sendo as contagens inversamente relacionadas a quantidade de DHEA-SO₄ presente na amostra do paciente. A quantificação de DHEA-SO₄ na amostra é determinada na comparação das contagens à uma curva de calibração.

Reagentes para Pipitar: 1

Tempo de Incubação: 30 minutos

Contagens Totais na Marcação com o Iodo: aproximadamente 50 000 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-SO₄ (TDS1)

Tubos de polipropileno revestidos com anticorpos à DHEA-SO₄ embalados em sacos com fecho de segurança. 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: Rosa Roque.

TKDS1: 100 tubos. **TKDS2:** 200 tubos. **TKDS5:** 500 tubos. **TKDSX:** 1000 tubos.

125I DHEA-SO₄ (TDS2)

DHEA-SO₄ iodado, em forma liofilizada, com conservante. Reconstituir cada frasco com **110 mL**. De água destilada ou deionizada. Tampar firmemente e misturar gentilmente por inversão. Estável a 2–8°C durante 30 dias depois reconstituído, ou até à data de expiração marcada no frasco. *Não transferir o traçador à container plástico.*

TKDS1: 1 frasco. **TKDS2:** 2 frascos.

TKDS5: 5 frascos. **TKDSX:** 10 frascos.

Calibradores de DHEA-SO₄ (TDS3–9)

Sete frascos, rotulados de A a G de calibradores baseados em proteína em forma liofilizada, com conservante. Reconstituir o calibrador A zero com **3 mL** de água destilada ou deionizada e os calibradores remanescentes de B a G com **1 mL**. Estável a 2–8°C durante 30 dias depois de reconstituído. Para uma armazenagem mais longa, aliquotar em tubos de polipropileno ou vidro bem tampado e congelar a –20°C.

TKDS1: 1 conjunto. **TKDS2:** 1 conjunto.

TKDS5: 2 conjuntos. **TKDSX:** 3 conjuntos.

Os calibradores contêm respectivamente, 0, 5, 20, 50, 200, 500 e 1 000 microgramas de DHEA-SO₄ por decilitro (µg/dL), equivalente à: 0, 0,14, 0,54, 1,36, 5,4, 13,6 e 27,1 micromoles por litro (µmol/L). Pontos de calibração intermediários podem ser obtidos pela mistura de calibradores em proporções adequadas.

Materiais necessários mas não fornecidos

Contador Gama – compatível com os tubos normais (12x75 mm).

Aagitador Vórtex

Preparação do Reagente

Cilindro graduado: 110 mL

Pipetas volumétricas: 1,0 mL e 3,0 mL

Água destilada ou deionizada

Radioimunoensaio

Tubos não revestidos de polipropileno (12x75 mm) – para uso como tubos T e NSB, disponíveis na DPC.

Micropipetas: 50 µL e 1 000 µL.

Banho-maria capaz de manter 37°C. Não utilizar bloco de calor ou estufa.

Espuma de decantação – disponível na DPC

Papel gráfico logit-log – disponível na DPC (Números de catálogo: ZP797)

Controle de imunoensaios, com três níveis, baseado em soro humano, contendo de DHEA-SO₄ como um dos mais de 25 constituintes ensaiados; disponíveis na DPC (Números de catálogo: CON6).

Colheita

O paciente não necessita dieta. Não são necessárias preparações especiais. Colher o sangue por punção venosa¹⁹ em tubos comuns, e separar o soro da células anotando-se a hora da coleta. O plasma com EDTA também é adequado para este ensaio (ver secção de Tipo de amostra alternativa).

Estudos com ácidos graxos não esterificados (NEFA) mostraram que ácido oleico possui um efeito significativo in vitro neste ensaio à altas concentrações fisiológicas.

Um ultra centrifuga e recomendada para "clarear" as amostras lipêmicas.

Amostras hemolisadas podem indicar tratamento incorrecto de uma amostra antes do envio para o laboratório; portanto os resultados devem ser interpretados com cuidado.

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-SO₄ 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: 50 µL por tubo.

Storage: 2 dias à at 2–8°C em tubos de vidro ou polipropileno, ou 2 mês à –20°C.¹⁸ Deixar as amostras atingirem a temperatura ambiente (15–28°C) e agitar suavemente ou por inversão. Aliquotar se necessário para evitar repetidos congelamentos/descongelamentos. Não descongelar as amostras por aquecimento em banho-maria.

Técnica de Radioimunoensaio

Todos os componentes devem estar à temperatura ambiente (15–28°C) antes do uso.

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

Devido ao fato das ligações não específicas no método de Coat-A-Count serem geralmente baixas os valores de NSB podem ser omitidos sem comprometer a precisão ou controle de qualidade.

Tubos revestidos: Rotular 14 tubos revestidos de DHEA-SO₄ Ab em A (máxima ligação) e de B a G em duplicado. Rotular tubos adicionais revestidos de DHEA-SO₄ Ab também em duplicata, para os controles e amostras de pacientes.

Calibradores	µg/dL	µg/mL	µmol/L
A (MB)	0	0	0
B	5	0,05	0,14
C	20	0,2	0,54
D	50	0,5	1,36
E	200	2	5,4
F	500	5	13,6
G	1 000	10	27,1

- 2** Pipetar **50 µL** do calibrador zero A nos tubos NSB e A, e **50 µL** de cada calibrador remanescente, controle e amostra de paciente nos tubos pré-preparados. **Pipetar directamente para a base do tubos.**

As amostras de pacientes das quais se esperam conterem concentrações de DHEA-SO₄ superiores ao calibrador mais alto (1 000 µg/dL) devem ser diluídas com o calibrador zero antes do ensaio.

É uma boa prática usar uma pipeta de ponteira descartável, trocando as mesmas entre as amostras de modo a evitar a contaminação.

- 3** Adicionar **1,0 mL** de DHEA-SO₄ ¹²⁵I em todos os tubos. Misturar em vórtex gentilmente e brevemente.

Não mais que 10 minutos devem ser gastos durante a dispensação do traçador. Se uma pipeta de repetição com seringa plástica for usada, enxaguar a mesma duas vezes com traçador antes da dispensação. Deixar os tubos T para as contagens (nº6) pois os mesmos não necessitam mais processamento.

- 4 Incubar por 30 minutos a 37°C.
Usar banho-maria, nem estufa ou bloco de calor são adequados.
- 5 Decantar vigorosamente.
Removendo todo o líquido remanescente melhora-se bastante a precisão. Usando-se uma espuma de decantação, decantar o conteúdo de todos os tubos (excepto os T) e deixar invertidos 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 faixa de calibração originam virtualmente os mesmos resultados quando a Porcentagem de Ligação é calculada directamente da Média de CPM.)

Usando um papel milimétrico logit-log, represente a Porcentagem de Ligação no eixo vertical (probabilidade) contra a Concentração no eixo horizontal (logarítmico) 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 replicatas 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 afaste. Também recomenda-se 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% 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 immunoassays data reduction. Clin Chem 1985;31:1264-71.

Exemplo de Ensaio: Apenas para ilustração, não para calcular resultados de outros ensaios. (Ver tabela "Exemplo de Ensaio").

Controle de Qualidade

Controles (ou "pools" de soro) com pelo menos dois níveis de concentração de DHEA-SO₄ – baixo e alto – devem ser rotineiramente ensaiados como desconhecidos.

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

É uma boa prática laboratorial registrar para cada ensaio o número do lote dos componentes usados, bem como as datas de quando foram primeiro reconstituídas ou abertas. Recomenda-se registrar 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 monitorar a

precisão interensaio, e que pares de controles podem ser colocados ao longo do ensaio para ajudar a verificar a ausência de variação significativa.

Valores de Referência

Estudos da faixa de referência foram realizados em duas instituições usando-se o kit DHEA-SO₄ Coat-A-Count em um total de 202 adultos. Tabulados abaixo estão as medianas e as faixas para os dados combinados, e a faixa representando uma central de 95% das observações.

	Mediana	Faixa de 95%	n
Mulheres	170 µg/dL	35 – 430 µg/dL	132
Homens	280 µg/dL	80 – 560 µg/dL	70

Adicionalmente, um total de 74 amostras de mulheres grávidas e pós-parto foram analisadas. Os resultados, como esperado, mostraram um declínio progressivo: valores medianos para o primeiro e terceiro trimestre e para um dia pós parto os quais foram 230, 105 e 65 µg/dL respectivamente.

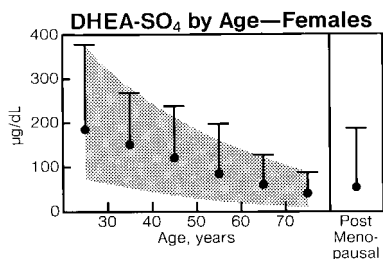
Um estudo a posterior de faixa de referência, foi realizado em um grande hospital do Nordeste com 136 mulheres e 155 homens, todos com idade conhecida. Os resultados, divididos por sexo e pela idade estão sumarizados na tabela e gráficos abaixo. Nos gráficos, os círculos sólidos mostram as medianas (porcentagem de 50%) enquanto que as barras T mostram porcentagem de 95%. A sombra representa o observado de 5 a 95% dos percentuais de acordo com um modelo simples do comportamento do DHEA-SO₄ circulante, como uma função da idade.

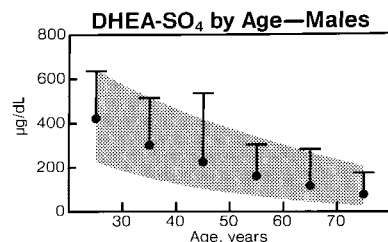
Os resultados de um estudo prévio pelo mesmo laboratório em 60 amostras de pós-menopausa estão apresentados nas tabelas e gráficos.

Grupo de Idade	n	5 th %ile	50 th %ile	95 th %ile
Mulheres				
10–19	2	—	140	—
20–29	23	65	185	380
30–39	29	45	150	270
40–49	29	32	120	240
50–59	18	26	85	200
60–69	21	13	50	130
70–79	8	17	40	90
80–89	6	—	26	—
Pós Menopausa	60	10	55	190
Homens				
10–19	6	—	215	—
20–29	17	280	420	640
30–39	21	120	300	520
40–49	23	95	250	530
50–59	29	70	160	310
60–69	37	42	130	290
70–79	18	28	80	175
80–89	4	—	36	—

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

Ver também os gráficos DHEA-SO₄ por idade: Homens e Mulheres. Os círculos sólidos significam medianas (50% da porcentagem) enquanto que as barras T significam 95%. O sombreado representa uma faixa como observada de 5 a 95% de acordo com um modelo simples de comportamento do DHEA-SO₄ circulante como uma função da idade.





Características do Ensaio

Ver tabelas e gráficos para os dados representativos da performance do kit de DHEA-SO₄ Coat-A-Count. Os resultados estão expressos em µg/dL.

Factor de conversão:

µg/dL × 0,02714 → µmol/L

Calibração: 5 – 1 000 µg/dL

(0,14 – 27 µmol/L)

Sensibilidade Analítica: 1,1 µg/dL,

Precisão Intra-ensaio (entre ensaios):

As estatísticas foram calculadas para as amostras dos resultados de 20 pares de tubos em um único ensaio (Consulte a tabela Precisão Intra-ensaio).

Precisão Inter-ensaio (ensaio a ensaio):

As estatísticas foram calculadas para os resultados de amostras de pares de tubos em 24 ensaios diferentes. (Consulte a tabela Precisão Inter-ensaio).

Linearidade: As amostras foram doseadas sob várias diluições. (Consulte a tabela "Linearidade" para dados representativos.)

Recuperação: Amostras foram misturadas em um para 19 com três soluções de DHEA-SO₄ (1 452, 3 046 e 4 820 µg/dL) e foram ensaiadas. (Consulte a tabela "Recuperação").

Especificidade: O antisoro do DHEA-SO₄ Coat-A-Count é altamente específico para o DHEA-SO₄, com uma reacção cruzada relativamente baixa a outros esteróides que ocorrem naturalmente e drogas que possam estar presentes nas amostras de pacientes. (Consulte a tabela "Especificidade").

Efeito fim-de-série: Nenhum até aproximadamente 250 tubos. (Ver tabela "Efeito fim-de-série")

Efeito de Proteína: Para simular várias concentrações de proteína, foram

realizados experimentos nos quais 2,0 mL de alíquotas de "pools" de soro humano foram liofilizados, sendo então reconstituídos com vários volumes de água. Cada alíquota reconstituída foi então ensaiada pelo procedimento DHEA-SO₄ Coat-A-Count. Nota-se que as alíquotas foram reconstituídas com a metade do volume original, representando uma concentração de proteína extremamente alta, na ordem de 14 g/dL (O factor de correcção para o volume de reconstituição estão tabulados abaixo). Estes resultados indicam que ainda que em uma larga variação na proteína a mesma possui um efeito relativamente pequeno no ensaio DHEA-SO₄ Coat-A-Count (Consulte a tabela "Efeito de Proteína").

Efeito dos Ácidos Graxos Livres: Para investigar o efeito de ácido graxo não esterificado (NEFA), alíquotas de três amostras foram liofilizadas, reconstituídas e ensaiadas com o procedimento DHEA-SO₄ Coat-A-Count. As soluções aquosas contendo 0, 2,5, 5 e 10 mmol/L de ácido oleico foram usados na reconstituição. Os resultados demonstraram que o ácido oleico – em condições fisiológicas de altas concentrações – não possui efeito significativo in vitro, no procedimento.

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

Hemólise: A presença de eritrócitos em concentrações de até 30 µL/mL não tem efeito em resultados, dentro da precisão do ensaio.

Tipo de amostra alternativa: Para determinar o efeito de amostras alternativas, foi colhido sangue de 22 voluntários em tubos secos, com EDTA, heparinizados e tubos de vacum SST® da Becton Dickinson. Todas as amostras foram ensaiadas pelo procedimento DHEA-SO₄ Coat-A-Count. Por regressão linear:

(Heparina) = 1,03 (Soro) – 3,4 µg/dL
r = 0,991

(EDTA) = 1,02 (Soro) – 7,8 µg/dL
r = 0,990

(SST) = 1,09 (tubos simples) – 19 µg/dL
r = 0,987

Médias:
208 µg/dL (Soro)

211 µg/dL (Heparina)
204 µg/dL (EDTA)
208 µg/dL (SST)



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

Comparação de Métodos: O

procedimento DHEA-SO₄ Coat-A-Count foi comparado com um radioimunoensaio comercialmente disponível (Kit A) em 112 amostras de soro de pacientes. Por regressão li:

(Coat-A-Count) = 1,14 (Kit A) – 6,9 µg/dL
r = 0,975

Médias:

183 µg/dL (Coat-A-Count)
168 µg/dL (Kit A)

Em um outro estudo, amostras se soros de 99 pacientes foram simultaneamente ensaiadas pelo procedimento DHEA-SO₄ Coat-A-Count usando-se um novo anticorpo e os anticorpos anteriores. Por regressão linear:

(Novo) = 0,99 (Anteriores) – 0,46 µg/dL
r = 0,980

Médias:

196 µg/dL (Novo)
197 µg/dL (Anteriores)

Deslocamento da curva: Duas amostras foram ensaiadas pelo procedimento DHEA-SO₄ Coat-A-Count em ensaios nos quais incluíram diluições 1:1 da amostra com cada um dos calibradores de A a G (0, 5, 20, 50, 200, 500 e 1 000 µg/dL. (Consulte a tabela "Deslocamento da Curva" para dados representativos.)

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

PITKDS – 4