



DHEA-S-RIA-CT

KIP0481

Version : 230123

Date of issue : 23/01/2023

Revision date: 23/01/2023

History

Summary of change:

Current Version: 230123
New logo

Read entire protocol before use.

DHEA-S-RIA-CT

I. INTENDED USE

Radioimmunoassay for the *in vitro* quantitative measurement of human 5-Androsten-3 β -OL-17-Dione Sulphate (Dehydroepiandrosterone Sulphate or DHEA Sulphate) in serum.

II. GENERAL INFORMATION

- A. **Proprietary name :** DIAsource DHEA-S-RIA-CT Kit
- B. **Catalog number :** KIP0481 : 96 tests
- C. **Manufactured by :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

For technical assistance or ordering information contact :
Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. CLINICAL BACKGROUND

A. Biological Activity

Dehydroepiandrosterone (DHEA) and its sulphated form, DHEA-S, are the most abundant steroid products of the adrenal glands. The adrenal is the sole source of these steroids in women, but in men there is also a small contribution from the testes. Formation of DHEA is stimulated by ACTH producing a significant diurnal variation in serum concentrations. DHEA is rapidly converted to DHEA-S by an enzyme present in the adrenals, liver and small intestine. DHEA-S is present at concentrations greater than 200 times that of DHEA and has a longer half-life, which largely removes the diurnal variation.

The aging influences the endocrine temporal structure, including DHEA-S which can be considered as a biomarker of aging, since its levels gradually decrease in older subjects. Plasma levels of DHEA-S increase steadily from about the seventh year of life, then gradually decline after the third decade.

DHEA is a 19-carbon steroid with a molecular weight of 288 Kd and a half-life in plasma of about 1-3 hours. The molecular weight of DHEA-S is 368.5 Kd and the half-life is about 10-20 hours. DHEA is formed from pregnenolone by the enzyme 17,20 desmolase and metabolised to androstenedione or testosterone by 3 β - or 17 β -hydrosteroid dehydrogenase respectively. Hydrosteroid sulphatase converts DHEA to DHEA-S and sulphohydrolase reverses this reaction.

B. Clinical Applications

Raised levels of DHEA-S are found in the plasma of patients with adrenal tumors or with congenital adrenal hyperplasia. DHEA-S may also be slightly elevated in patients with polycystic ovaries, supporting an adrenal component to the virilization seen in this condition. HCG-production tumors in men may lead to increased testicular DHEA production.

DHEA-S is often assayed in conjunction with free testosterone as an initial screen for hyperandrogenism in hirsutism. Sometimes DHEA-S 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.

DHEA-S is usually undetectable with adrenal insufficiency or panhypopituitarism. Concentrations are slightly decreased in pregnancy and with oral contraceptive use and markedly decreased following glucocorticoid administration.

Low circulating concentrations are seen with severe illness and in patients with AIDS.

IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

A fixed amount of ¹²⁵I labelled DHEA-S competes with the DHEA-S to be measured present in the sample or in the calibrator for a fixed amount of antibody sites being immobilized to the wall of a polystyrene tube. After 1-hour incubation at 37°C in water bath, an aspiration step terminates the competition reaction. The tubes are then washed twice with 2 ml of Working Wash Solution and aspirated. A calibration curve is plotted and the DHEA-S concentrations of the samples are determined by dose interpolation from the calibration curve.

V. REAGENTS PROVIDED

Reagents	96 Test Kit	Colour Code	Reconstitution			
 Tubes coated with anti DHEA-S	2 x 48	ivory	Ready for use			
<table border="1"><tr><td>Ag</td><td>¹²⁵I</td></tr></table> TRACER: ¹²⁵ Iodine labelled DHEA-S (HPLC grade) in buffer with bovine serum albumin and azide (<0.1%)	Ag	¹²⁵ I	1 vial 55 ml 450 kBq	red	Ready for use	
Ag	¹²⁵ I					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Zero calibrator in human serum, thymol	CAL	0	1 vial lyophilised	yellow	Add 0.5 ml distilled water	
CAL	0					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Calibrators DHEA-S - N = 1 to 5 (see exact values on vial labels) in human plasma, thymol	CAL	N	5 vials lyophilised	yellow	Add 0.5 ml distilled water	
CAL	N					
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Wash solution (TRIS-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 vial 10 ml	brown	Dilute 70 x with distilled water (use a magnetic stirrer).
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Controls - N = 1 or 2 in human plasma, thymol (see exact values on vial labels)	CONTROL	N	2 vials Lyophilised	silver	Add 0.5 ml distilled water	
CONTROL	N					

Note : Use the zero calibrator for sample dilutions.

VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

The following material is required but not provided in the kit:

- Distilled water
- Pipettes for delivery of: 10 µl and 500 µl (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
- Vortex mixer
- Magnetic stirrer
- Water bath at 37°C
- 5 ml automatic syringe (Cornwall type) for washing
- Aspiration system (optional)
- Any gamma counter capable of measuring ¹²⁵I may be used (minimal yield 70%).

VII. REAGENT PREPARATION

- Calibrators** : Reconstitute the calibrators with 0.5 ml distilled water
- Controls**: Reconstitute the controls with 0.5 ml distilled water.
- Working Wash solution**: Prepare an adequate volume of Working Wash solution by adding 69 volumes of distilled water to 1 volume of Wash Solution (70x). Use a magnetic stirrer to homogenize. Discard unused Working Wash solution at the end of the day.

VIII. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

- Before opening or reconstitution, all kit components are stable until the expiry date, indicated on the label, if kept at 2 to 8°C.
- After reconstitution, calibrators and controls are stable for one week at 2 to 8°C. For longer storage periods, aliquots should be made and kept at -20°C for maximum 3 months. Avoid successive freezing and thawing.
- Freshly prepared Working Wash solution should be used on the same day.
- After its first use, the tracer is stable until expiry date, if kept in the original well-closed vial at 2 to 8°C.

- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration.

IX. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- Serum samples must be kept at 2-8°C.
- If the test is not run within 24 hours, storage in aliquots at -20°C is recommended.
- Avoid successive freezing and thawing.

X. PROCEDURE

A. Handling notes

Do not use the kit or components beyond expiry date. Do not mix materials from different kit lots. Bring all the reagents to room temperature (18-25°C) prior to use. Thoroughly mix all reagents and samples by gentle agitation or swirling. In order to avoid cross-contamination, use a clean disposable pipette tip for the addition of each reagent and sample. High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision. Respect the incubation times. Prepare a calibration curve for each run, do not use data from previous runs. Each tube can only be used once.

B. Procedure

- Label coated tubes in duplicate for each calibrator, control and sample. For the determination of total counts, label 2 normal tubes.
- Briefly vortex calibrators, controls and samples and dispense 10 µl of each into respective tubes.
- Dispense 500 µl of ¹²⁵Iodine labelled DHEA-S into each tube, including the uncoated tubes for total counts.
- Shake the tube rack gently by hand to liberate any trapped air bubbles.
- Incubate for 1 hour at 37°C in water bath.
- Aspirate (or decant) the content of each tube (except total counts). Be sure that the plastic tip of the aspirator reaches the bottom of the coated tube in order to remove all the liquid.
- Wash tubes with 2 ml Working Wash solution (except total counts) and aspirate (or decant). Avoid foaming during the addition of the Working Wash solution.
- Wash tubes with 2 ml Wash solution (except total counts) and aspirate (or decant). Avoid foaming during the addition of the Working Wash solution.
- Let the tubes stand upright for two minutes and aspirate the remaining drop of liquid.
- Count tubes in a gamma counter for 60 seconds.

XI. CALCULATION OF RESULTS

- Calculate the mean of duplicate determinations.
- Calculate the bound radioactivity as a percentage of the binding determined at the zero calibrator point (0) according to the following formula:

$$B/B_0 (\%) = \frac{\text{Counts (Calibrator or sample)}}{\text{Counts (Zero Calibrator)}} \times 100$$

- Plot the (B/B₀(%)) values for each calibrator point as a function of the DHEA-S concentration of each calibrator point. Reject obvious outliers.
- Computer assisted methods can also be used to construct the calibration curve. If automatic result processing is used, a 4-parameter logistic function curve fitting is recommended.
- By interpolation of the sample (B/B₀ (%)) values, determine the DHEA-S concentrations of the samples from the calibration curve.
- For each assay, the percentage of total tracer bound in the absence of unlabelled DHEA-S (B₀/T) must be checked.

XII. TYPICAL DATA

The following data are for illustration only and should never be used instead of the real time calibration curve.

DHEA-S-RIA-CT		cpm	B/Bo (%)
Total count		164710	
Calibrator	0.0 µg/dl	34266	100.0
	1.7 µg/dl	31393	91.6
	9.7 µg/dl	21411	62.5
	41.0 µg/dl	11078	32.3
	219.0 µg/dl	3398	9.9
	1090.0 µg/dl	877	2.6

Conversion factor:

From µg/dl to µmol/l : x 0.0271

From µmol/l to µg/dl : x 36.85

XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS**A. Detection limit**

Twenty zero calibrators were assayed along with a set of other calibrators. The detection limit, defined as the apparent concentration two standard deviations below the average counts at zero binding, was 1.23 µg/dl.

B. Specificity

The specificity of the polyclonal antibody used in this assay was evaluated by RIA, as the ratio of the amount of DHEA-S, which yields 50% inhibition of binding of labelled DHEA-S and the amount of cross-reacting compounds (analogs) giving the same inhibition.

Compound	Cross-Reactivity (%)
DHEA-S	100.00
DHEA	< 0.05
DHEA-Glucuronide	< 0.05
Androstenediol	< 0.05
Estrone-Sulfate	0.08
5α-Dihydrotestosterone	< 0.05
Testosterone	< 0.05

Note : This table shows the cross-reactivity for the anti DHEA-S.

C. Precision**INTRA-ASSAY PRECISION****INTER-ASSAY PRECISION**

Serum	N	<X> ± SD (µg/dl)	CV (%)	Serum	N	<X> ± SD (µg/dl)	CV (%)
A	20	32.1 ± 1.9	5.9	A	12	30.8 ± 2.0	6.5
B	20	107.4 ± 5.1	3.6	B	12	105.5 ± 6.5	6.5

SD: Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

D. Accuracy**DILUTION TEST**

Sample	Dilution	Theoretical Concent. (µg/dl)	Measured Concent. (µg/dl)
Serum 1	1/1	389.6	
	1/2	194.8	168.1
	1/4	97.4	92.3
	1/8	48.7	50.7
	1/16	24.3	27.1
Serum 2	1/1	85.0	
	1/2	42.5	38.3
	1/4	21.2	19.0
	1/8	10.6	10.6
	1/16	5.3	7.0

Samples were diluted with the zero calibrator.

RECOVERY TEST

Sample (µg/dl)	added DHEA-S (µg/dl)	Theoretical DHEA-S (µg/dl)	Measured DHEA-S (µg/dl)	Recovered %
Serum	0	NA	26.0	NA
	25	51	59.7	117
	50	76	80.6	106
	100	126	128.1	101.6

To the best of our knowledge, no international reference material exists for this parameter.

E. Time delay between last calibrator and sample dispensing

As shown hereafter, assay results remain accurate even when a sample is dispensed 30 minutes after the calibrator has been added to coated tubes.

TIME DELAY

Serum (µg/dl)	0'	10'	20'	30'
Serum 1	30.8	33.8	31.5	31.2
Serum 2	98.5	113.5	118.2	102.5

XIV. INTERNAL QUALITY CONTROL

- If the results obtained for Control 1 and/or Control 2 are not within the range specified on the vial label, the results cannot be used unless a satisfactory explanation for the discrepancy has been given.
- If desirable, each laboratory can make its own pools of control samples, which should be kept frozen in aliquots.
- Acceptance criteria for the difference between the duplicate results of the samples should rely on Good Laboratory Practises.

XV. REFERENCE INTERVALS

These values are given only for guidance; each laboratory should establish its own normal range of values.

The ranges are expressed as 2.5% to 97.5% percentiles.

Subjects (age group)	N	Mean (µg/dl)	Range *
Women			
< 15	15	129.7	37.8 - 264.5
15-19	19	276.7	117.3 - 531.0
20-24	16	244.0	118.7 - 428.9
25-29	33	197.5	70.2 - 413.4
30-34	29	175.1	75.2 - 398.7
35-39	23	162.0	63.3 - 291.4
40-44	19	144.4	37.3 - 255.8
45-49	13	109.8	20.9 - 198.0
50-54	16	117.0	26.8 - 375.4
55-59	13	102.9	34.5 - 178.1
60-64	10	92.8	24.6 - 182.3
> 65	15	114.3	6.3 - 377.0
Men			
< 15	14	138.9	34.9 – 284.1
15 – 50	42	262.2	80.5 – 479.4
> 50	37	177.6	51.8 – 470.7

XVI. PRECAUTIONS AND WARNINGS**Safety**

For *in vitro* diagnostic use only.

This kit contains ¹²⁵I (half-life: 60 days), emitting ionizing X (28 keV) and γ (35.5 keV) radiations.

This radioactive product can be transferred to and used only by authorized persons; purchase, storage, use and exchange of radioactive products are subject to the legislation of the end user's country. In no case the product must be administered to humans or animals.

All radioactive handling should be executed in a designated area, away from regular passage. A logbook for receipt and storage of radioactive materials must be kept in the lab. Laboratory equipment and glassware, which could be contaminated with radioactive substances, should be segregated to prevent cross contamination of different radioisotopes.

Any radioactive spills must be cleaned immediately in accordance with the radiation safety procedures. The radioactive waste must be disposed of following the local regulations and guidelines of the authorities holding jurisdiction over the laboratory. Adherence to the basic rules of radiation safety provides adequate protection.

The human blood components included in this kit have been tested by European approved and/or FDA approved methods and found negative for HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 and 2. No known method can offer complete assurance that human blood derivatives will not transmit hepatitis, AIDS or other infections.

Therefore, handling of reagents, serum or plasma specimens should be in accordance with local safety procedures.

All animal products and derivatives have been collected from healthy animals. Bovine components originate from countries where BSE has not been reported. Nevertheless, components containing animal substances should be treated as potentially infectious.

Avoid any skin contact with reagents (sodium azide as preservative). Azide in this kit may react with lead and copper in the plumbing and in this way form highly explosive metal azides. During the washing step, flush the drain with a large amount of water to prevent azide build-up.

Do not smoke, drink, eat or apply cosmetics in the working area. Do not pipette by mouth. Use protective clothing and disposable gloves.

For more information, see Material Safety Data Sheet (MSDS)

XVII. BIBLIOGRAPHY

1. Orentreich N, Brind J, Rizer R, Vogelmann J : **Age changes and sex differences in serum dehydroepiandrosterone sulphate concentrations throughout adulthood.** J Clin Endocrinol Metab 59:551-555, 1984.
2. Orentreich N, Brind J, Vogelmann J, Andres R, Baldwin H. : **Long-term longitudinal measurements of plasma dehydroepiandrosterone sulphate in normal men.** J Clin Endocrinol Metab 75:1002-1004, 1992.
3. Abbasi A, Drinka P, Mattson D, Rudman D : **Low circulating levels of insulin-like growth factors and testosterone in chronically institutionalized elderly men.** J Am Geriatr Soc 41:975-981, 1993.
4. Belanger A, Candas B, Dupont A et al. : **Changes in serum concentrations of conjugated and unconjugated steroid in 40 to 80 year old men.** J Clin Endocrinol Metab 79:1086-1090, 1994.
5. Borst S, Millard W, Lowenthal D : **Growth hormone, exercise, and aging : the future of therapy for the frail elderly.** J Am Geriatr Soc 42:528-535, 1994.
6. Morales A, Nolan J, Nelson J, Yen S : **Effects of replacement dose of dehydroepiandrosterone in men and women of advancing age.** J Clin Endocrinol Metab 78:1360-1367, 1994.
7. Tenover J : **Androgen administration to aging men.** Clin Andol 23:877-892, 1994.
8. Rosenfeld R, Rosenberg B, Fukushima D, Heuman L : **24 hour secretory pattern of dehydroepiandrosterone and dehydroandrosterone sulphate.** J Clin Endocrinol 40:850-855, 1975.
9. Liu C, Laughlin G, Fischer U, Yen S : **Marked attenuation of ultradian and circadian rhythms of dehydroepiandrosterone in postmenopausal women : evidence for a reduced 17,20-desmolase enzymatic activity.** J Clin Endocrinol Metab 71:900-906, 1990.
10. Thomas G, Frenoy N, Legrain S, Sebag-Lanoe R, Baulieu E, Debuire B : **Serum dehydroepiandrosterone sulphate levels as an individual marker.** J Clin Endocrinol Metab 79:1273-1276, 1994.
11. Tissandier O, Peres G, Fiet J, Piette F : **Testosterone, dehydroepiandrosterone, insulin-like growth factor 1, and insulin in sedentary and physically trained aged men.** Eur J Appl Physiol 85:177-184; 2001.
12. Guagnano MT, Del Ponte A, Manigrasso MR, Merlitti D, Pace-Palitti V, Sensus S : **Age-related circadian rhythm of DHEA-S plasma levels in male subjects.** Biological Rhythm Research 32,3:323-331, 2001.
13. Derksen J, Nagesser S.K, Meinders A.E, Haak H.R, Van De Velde C.J.H : **Identification of virilizing adrenal tumors in hirsute women.** New Engl J Med 331(15):968-973, 1994.
14. Lobo R.A, Paul W.L, Goebelsmann U : **dehydroepiandrosterone sulphate as an indicator of adrenal androgen function.** Obstet Gynecol 57:69-73, 1981.
15. Cacciari E : **Gonadal and adrenal secretion of dehydroepiandrosterone sulphate in prepubertal and pubertal subjects.** J Endocrinol Invest 4:197-202, 1981.
16. Ebeling P, Koivisto V.A : **Physiological importance of dehydroepiandrosterone.** Lancet 343:1479-1481, 1994.

XVIII. SUMMARY OF THE PROTOCOL

	TOTAL COUNTS µl	CALIBRATORS µl	SAMPLE(S) CONTROLS µl
Calibrators (0-5) Samples, controls Tracer	- - 500	10 - 500	- 10 500
Incubation	1 hour at 37°C in water bath		
Separation Working Wash solution Separation Working Wash solution Separation	-	Aspirate 2.0 ml Aspirate 2.0 ml Aspirate carefully	
Counting	Count tubes for 60 seconds		

Other translations of this Instruction for Use can be downloaded from our website: <https://www.diasource-diagnostics.com/>

Lire entièrement le protocole avant utilisation.

DHEA-S-RIA-CT

I. BUT DU DOSAGE

Trousse de dosage radio-immunologique pour la mesure quantitative *in vitro* de la 5-Androstène-3 β -OL-17-Dione Sulfate humaine (Déhydro-épiandrostérone Sulfate ou DHEA Sulfate) dans le sérum humain.

II. INFORMATIONS GENERALES

- A. **Nom du produit :** DIAsource DHEA-S-RIA-CT kit
- B. **Numéro de catalogue :** KIP0481 : 96 tests
- C. **Fabriqué par :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgique.

Pour une assistance technique ou une information sur une commande :

Tel : +32 (0)10 84.99.11

Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. CONTEXTE CLINIQUE

A. Activité biologique

La déhydro-épiandrostérone (DHEA) et sa forme sulfate, la DHEA-S, sont les stéroïdes les plus abondants produits par les glandes surrénales. La glande surrénale est la seule source de ces stéroïdes chez la femme, mais, chez l'homme, les testicules en produisent également un peu. La formation de DHEA est stimulée par l'ACTH, produisant une variation diurne significative des concentrations sériques. La DHEA est rapidement convertie en DHEA-S par une enzyme présente dans les surrénales, le foie et l'intestin grêle. La DHEA-S est présente à des concentrations 200 fois supérieures à celles de la DHEA et elle a un temps de demi-vie plus long qui gomme en grande partie la variation diurne.

L'âge influence la structure endocrine temporelle, y compris la DHEA-S qui peut être considérée comme un marqueur biologique de l'âge puisque ses taux diminuent progressivement chez les sujets plus âgés. Les taux plasmatiques de la DHEA-S augmentent régulièrement depuis l'âge de sept ans environ et puis diminuent progressivement après la trentaine.

La DHEA est un stéroïde à 19 carbones, d'un poids moléculaire de 288 Kd et d'une demi-vie plasmatique de 1 à 3 heures. Le poids moléculaire de la DHEA-S est de 368.5 Kd et sa demi-vie d'environ 10 à 20 heures. La DHEA est formée à partir de la prégénolone par l'enzyme 17,20 desmolase et est métabolisée en androstènedione ou en testostérone par, respectivement, la 3 bêta- ou la 17 bêta-hydrostéroïde déshydrogénase. La hydrostéroïde sulfatase convertit la DHEA en DHEA-S et la sulfohydrolase inverse cette réaction.

B. Applications cliniques

Des taux élevés de DHEA-S sont trouvés dans le plasma de patients avec une tumeur surrénalienne ou avec une hyperplasie surrénalienne congénitale. La DHEA-S peut également être légèrement élevée chez les patients avec des ovaires polykystiques renforçant une composante surrénalienne de la virilisation vue dans cette condition. Les tumeurs productrices d'HCG peuvent conduire chez l'homme à l'augmentation de la production testiculaire de DHEA.

La DHEA-S est souvent dosée en conjonction avec la testostérone libre lors d'un screening initial d'un hyperandrogénisme en cas d'hirsutisme. Parfois, la DHEA-S est la seule hormone circulante à être au-dessus des valeurs normales et a apparemment plus de chances d'être élevée dans les premiers stades de l'hirsutisme que la plupart des autres androgènes.

La DHEA-S est généralement indétectable dans l'insuffisance surrénalienne ou le panhypopituitarisme. Les concentrations diminuent faiblement pendant la grossesse et lors d'une contraception orale et diminuent fortement après l'administration de glyocorticoïdes.

Des concentrations circulantes basses se voient dans des maladies sévères et chez les patients atteints du SIDA.

IV. PRINCIPE DU DOSAGE

Une quantité fixe de DHEA-S marquée à l'125I est en compétition avec la DHEA-S à mesurer et présente dans l'échantillon ou dans le calibrateur pour une quantité fixe d'anticorps immobilisés sur les parois du tube en polystyrène. Après 1 heure d'incubation à 37°C dans un bain-marie, le liquide est aspiré pour terminer la réaction de compétition. Les tubes sont lavés deux fois avec 2 ml de Solution de Lavage et aspirés à nouveau. Une courbe de calibration est réalisée et la concentration en DHEA-S des échantillons est déterminée par interpolation de la dose sur la courbe de calibration.

V. REACTIFS FOURNIS

Réactifs	96 Tests	Code couleur	Reconstitution			
 Tubes recouverts avec l'anti DHEA-S	2 x 48	Ivoire	Prêt à l'emploi			
<table border="1"><tr><td>Ag</td><td>¹²⁵I</td></tr></table> TRACEUR: DHEA-Smarquée à l' ¹²⁵ Iode (grade HPLC) dans un tampon avec de l'albumine bovine et de l'azoture de sodium (<0,1%)	Ag	¹²⁵ I	1 flacon 55 ml 450 kBq	Rouge	Prêt à l'emploi	
Ag	¹²⁵ I					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Calibrateur zéro dans du sérum humain et du thymol	CAL	0	1 flacon lyophilisés	Jaune	Ajouter 0,5 ml d'eau distillée	
CAL	0					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Calibrateurs DHEA-S - N = 1 à 5 (cf. valeurs exactes sur chaque flacon) dans du plasma humain et du thymol	CAL	N	5 flacons lyophilisés	Jaune	Ajouter 0,5 ml d'eau distillée	
CAL	N					
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Solution de lavage (TRIS-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 flacon 10 ml	Brun	Diluer 70x avec de l'eau distillée (utiliser un agitateur magnétique).
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Contrôles - N = 1 ou 2 dans du plasma humain et, du thymol (cf. valeurs exactes sur chaque flacon)	CONTROL	N	2 flacons lyophilisés	Gris	Ajouter 0,5 ml d'eau distillée	
CONTROL	N					

Note : Utiliser le calibrateur zéro pour la dilution des échantillons

VI. MATERIEL NON FOURNI

Le matériel mentionné ci-dessous est requis mais non fourni avec la trousse:

- 1. Eau distillée
- 2. Pipettes pour distribuer: 10 µl et 500 µl (l'utilisation de pipettes précises et de pointes jetables en plastique est recommandée)
- 3. Agitateur vortex
- 4. Agitateur magnétique
- 5. Bain-marie à 37°C
- 6. Seringue automatique de 5 ml (type Cornwall) pour les lavages
- 7. Système d'aspiration
- 8. Tout compteur gamma capable de mesurer l'125I peut être utilisé (rendement minimum 70%).

VII. PREPARATION DES REACTIFS

- A. Calibrateurs : Reconstituer les calibrateurs avec 0,5 ml d'eau distillée.
- B. Contrôles : Reconstituer les contrôles avec 0,5 ml d'eau distillée.
- C. Solution de Lavage : Préparer un volume adéquat de Solution de Lavage en ajoutant 69 volumes d'eau distillée à 1 volume de Solution de Lavage (70x). Utiliser un agitateur magnétique pour homogénéiser. Eliminer la Solution de Lavage non utilisée à la fin de la journée.

VIII. STOCKAGE ET DATE D'EXPIRATION DES REACTIFS

- Avant l'ouverture ou la reconstitution, tous les composants de la trousse sont stables jusqu'à la date d'expiration, indiquée sur l'étiquette, si la trousse est conservée entre 2 et 8°C.
- Après reconstitution, les calibrateurs et les contrôles sont stables pendant une semaine entre 2 et 8°C. Pour de plus longues périodes de stockage, des aliquots devront être réalisés et ceux-ci seront gardés à -20°C. Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.
- La Solution de Lavage préparée doit être utilisée le jour même.
- Après la première utilisation, le traceur est stable jusqu'à la date d'expiration, si celui-ci est conservé entre 2 et 8°C dans le flacon d'origine correctement fermé.
- Des altérations dans l'apparence physique des réactifs de la trousse peuvent indiquer une instabilité ou une détérioration.

IX. PREPARATION ET STABILITE DE L'ECHANTILLON

- Les échantillons de sérum doivent être gardés entre 2 et 8°C.
- Si le test n'est pas réalisé dans les 24 heures, un stockage à -20°C est recommandé.
- Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.

X. MODE OPERATOIRE

- A. Notes de manipulation
Ne pas utiliser la trousse ou ses composants après avoir dépassé la date d'expiration. Ne pas mélanger du matériel provenant de trousses de lots différents. Mettre tous les réactifs à température ambiante (18-25°C) avant utilisation.
Mélanger à fond tous les réactifs et les échantillons sous agitation douce. Pour éviter toute contamination croisée, utiliser une nouvelle pointe de pipette pour l'addition de chaque réactif et échantillon.
Des pipettes de haute précision ou un équipement de pipetage automatique permettent d'augmenter la précision. Respecter les temps d'incubation.
Préparer une courbe de calibration pour chaque nouvelle série d'expériences, ne pas utiliser les données d'expériences précédentes.
Chaque tube ne peut être utilisé qu'une seule fois.

- B. Mode opératoire
1. Identifier les tubes recouverts fournis dans la trousse en double pour chaque calibrateur, échantillon, contrôle. Pour la détermination de l'activité totale, identifier 2 tubes non recouverts.
- 2. Agiter au vortex brièvement les calibrateurs, les échantillons et les contrôles. Puis distribuer 10 µl de chacun d'eux dans leurs tubes respectifs.
- 3. Distribuer 500 µl de DHEA-S marquée à l' 125Iode dans chaque tube, y compris les tubes sans anticorps pour la détermination de l'activité totale.
- 4. Agiter gentiment le portoir de tubes pour libérer toute bulle d'air emprisonnée.
- 5. Incuber pendant 1 heure dans un bain-marie à 37°C.
- 6. Aspirer le contenu de chaque tube (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale). Assurez-vous que la pointe utilisée pour aspirer le liquide des tubes atteint le fond de chacun d'eux pour éliminer toute trace de liquide.
- 7. Laver les tubes avec 2 ml de Solution de Lavage (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale) et aspirer. Eviter la formation de mousse pendant l'addition de la Solution de Lavage.
- 8. Laver une seconde fois les tubes avec 2 ml de Solution de Lavage (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale) et aspirer. Eviter la formation de mousse pendant l'addition de la Solution de Lavage.
- 9. Laisser les tubes droits pendant 2 minutes et aspirer le reste de liquide.
- 10. Placer les tubes dans un compteur gamma pendant 60 secondes pour quantifier la radioactivité.

XI. CALCUL DES RESULTATS

- 1. Calculer la moyenne de chaque détermination réalisée en double.
- 2. Calculer la capacité de liaison de l'essai comme un pourcentage de liaison déterminé au point de calibration (0) en suivant la formule ci-dessous :

B/B0 (%) = (moyenne des cpm (CAL ou échantillon n) / moyenne des cpm (CAL 0)) x100

- 3. Porter en ordonnée les valeurs exprimées en pourcentage de liaison (B/B0(%)) de chaque point de calibration et en abscisse leur concentration respective en DHEA-S, écarter les valeurs aberrantes.
- 4. Des méthodes informatiques peuvent aussi être utilisées pour construire la courbe de calibration. Si un système d'analyse de traitement informatique des données est utilisé, il est recommandé d'utiliser la fonction « 4 paramètres » du lissage de courbes.

5. L’interpolation des valeurs de chaque échantillon (B/B0(%)) détermine les concentrations en DHEA-S à partir de la courbe de calibration.
6. Pour chaque essai, le pourcentage total de traceur lié en absence de DHEA-S non marquée (B0/T) doit être vérifié.

XII. DONNEES TYPES

Les données représentées ci-dessous sont données pour information et ne peuvent jamais être utilisées à la place d’une courbe de calibration.

DHEA-S-RIA-CT		cpm	B/Bo (%)
Activité totale		164710	
Calibrateur	0,0 µg/dl	34266	100.0
	1.7 µg/dl	31393	91.6
	9.7 µg/dl	21411	62.5
	41.0 µg/dl	11078	32.3
	219.0 µg/dl	3398	9.9
	1090.0 µg/dl	877	2.6

XIII. PERFORMANCE ET LIMITES DU DOSAGE

- A. Limite de détection

Vingt calibrateurs zéro ont été testés en parallèle avec un assortiment d’autres calibrateurs.
La limite de détection, définie comme la concentration apparente située 2 déviations standards en dessous de la moyenne déterminée à la fixation zéro, était de 1,23 µg/dl.
- B. Spécificité

Le pourcentage de réaction croisée estimé par la comparaison de la concentration (indiquant une inhibition de 50 %) est respectivement :

Composé	Réactivité Croisée (%)
DHEA-S	100,00
DHEA	< 0,05
DHEA-Glucuronide	< 0,05
Androstènediol	< 0,05
Oestrone -Sulfate	0,08
5α-Dihydrotestostérone	< 0,05
Testostérone	< 0,05

Note: cette table montre la réactivité croisée pour l’anti-DHEA-S

C. Précision

INTRA-ESSAI				INTER-ESSAI			
Sérum	N	<X> ± SD (µg/dl)	CV (%)	Sérum	N	<X> ± SD (µg/dl)	CV (%)
A B	20	32.1 ± 1.9	5.9	A B	12	30.8 ± 2.0	6.5
	20	107.4 ± 5.1	3.6		12	105.5 ± 6.5	6.5

SD : Déviation Standard; CV: Coefficient de variation

D. Exactitude

TEST DE DILUTION			
Echantillon	Dilution	Concent. Théorique (µg/dl)	Concent. Mesurée (µg/dl)
Serum 1	1/1	389,6	
	1/2	194,8	168,1
	1/4	97,4	92,3
	1/8	48,7	50,7
	1/16	24,3	27,1
Serum 2	1/1	85,0	
	1/2	42,5	38,3
	1/4	21,2	19,0
	1/8	10,6	10,6
	1/16	5,3	7,0

Les échantillons ont été dilués avec le Calibrateur zéro.

TEST DE RECUPERATION			
Echantillon	DHEA-S ajouté (µg/dl)	DHEA-S récupéré (µg/dl)	Recupération (%)
Serum	0	NA	26.0
	25	51	59.7
	50	76	80.6
	100	126	128.1

A notre connaissance, aucun matériel de référence internationale n’existe pour ce paramètre.

- E. Délai entre la distribution du dernier calibrateur et celle de l’échantillon

Comme montré ci-dessous, les résultats d’un essai restent précis même quand un échantillon est distribué 30 minutes après que le calibrateur ait été ajouté aux tubes avec l’anticorps.

DELAI				
Sérum (µg/dl)	0'	10'	20'	30'
Sérum 1	30.8	33.8	31.5	31.2
Sérum 2	98.5	113.5	118.2	102.5

XIV. CÔNTROLE DE QUALITE INTERNE

- Si les résultats obtenus pour le(s) contrôle(s) 1 et/ou 2 ne sont pas dans l’intervalle spécifié sur l’étiquette du flacon, les résultats ne peuvent pas être utilisés à moins que l’on ait donné une explication satisfaisante de la non-conformité.
- Chaque laboratoire est libre de faire ses propres stocks d’échantillons contrôles, lesquels doivent être aliquotés et congelés.
- Les critères d’acceptation pour les écarts des valeurs en double des échantillons doivent être basés sur les pratiques de laboratoire courantes.

XV. VALEURS ATTENDUES

Les valeurs sont données à titre d’information; chaque laboratoire doit établir ses propres écarts de valeurs.
Domaine de mesure basé sur les percentiles de 2,5% & 97,5%.

Sujets (groupes d’âge)	N	Moyen (µg/dl)	Domaine de mesure
Femmes			
< 15	15	129,7	37,8 - 264,5
15-19	19	276,7	117,3 - 531,0
20-24	16	244,0	118,7 - 428,9
25-29	33	197,5	70,2 - 413,4
30-34	27	175,1	75,2 - 398,7
35-39	23	162,0	63,3 - 291,4
40-44	19	144,4	37,3 - 255,8
45-49	13	109,8	20,9 - 198,0
50-54	16	117,0	26,8 - 375,4
55-59	13	102,9	34,5 - 178,1
60-64	10	92,8	24,6 - 182,3
> 65	15	114,3	6,3 - 377,0
Hommes			
< 15	14	138,9	34,9 – 284,1
15 – 50	42	262,2	80,5 – 479,4
> 50	37	177,6	51,8 – 470,7

XVI. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

Sécurité

Pour utilisation en diagnostic *in vitro* uniquement.
Cette trousse contient de l'125I (demi-vie: 60 jours), une matière radioactive émettant des rayonnements ionisants X (28 keV) et γ (35.5 keV).
Ce produit radioactif peut uniquement être reçu, acheté, possédé ou utilisé par des personnes autorisées; l'achat, le stockage, l'utilisation et l'échange de produits radioactifs sont soumis à la législation du pays de l'utilisateur final. Ce produit ne peut en aucun cas être administré à l'homme ou aux animaux.
Toutes les manipulations radioactives doivent être exécutées dans un secteur désigné, éloigné de tout passage. Un journal de réception et de stockage des matières radioactives doit être tenu à jour dans le laboratoire. L'équipement de laboratoire et la verrerie, qui pourrait être contaminée avec des substances radioactives, doivent être isolés afin d'éviter la contamination croisée de plusieurs isotopes.
Toute contamination ou perte de substance radioactive doit être réglée conformément aux procédures de radio-sécurité. Les déchets radioactifs doivent être placés de manière à respecter les réglementations en vigueur. L'adhésion aux règles de base de sécurité concernant les radiations procure une protection adéquate.
Les composants de sang humain inclus dans ce kit ont été évalués par des méthodes approuvées par l'Europe et/ou la FDA et trouvés négatifs pour HBsAg, l'anti-HCV, l'anti-HIV-1 et 2. Aucune méthode connue ne peut offrir l'assurance complète que des dérivés de sang humain ne transmettront pas d'hépatite, le sida ou toute autre infection. Donc, le traitement des réactifs, du sérum ou des échantillons de plasma devront être conformes aux procédures locales de sécurité. Tous les produits animaux et leurs dérivés ont été collectés d'animaux sains. Les composants bovins proviennent de pays où l'ESB n'a pas été détectée. Néanmoins, les composants contenant des substances animales devront être traités comme potentiellement infectieux.
L'azoture de sodium est nocif s'il est inhalé, avalé ou s'il entre en contact avec la peau (l'azoture de sodium est utilisé comme agent conservateur). L'azoture dans cette trousse pouvant réagir avec le plomb et le cuivre dans les canalisations et donner des composés explosifs, il est nécessaire de nettoyer abondamment à l'eau le matériel utilisé.
Ne pas fumer, ni boire, ni manger ni appliquer de produits cosmétiques dans les laboratoires où des produits radioactifs sont utilisés. Ne pas pipeter avec la bouche. Utiliser des vêtements protecteurs et des gants à usage unique.
Pour plus d'informations, consultez la fiche signalétique (MSDS)

XVII. BIBLIOGRAPHIE

1. Orentreich N, BrindJ, Rizer R, Vogelmann J : **Age changes and sex differences in serum dehydroepiandrosterone sulphate concentrations throughout adulthood.** J Clin Endocrinol Metab 59:551-555, 1984.

2. Orentreich N, Brind J, Vogelmann J, Andres R, Baldwin H. : **Long-term longitudinal measurements of plasma dehydroepiandrosterone sulphate in normal men.** J Clin Endocrinol Metab 75:1002-1004, 1992.

3. Abbasi A, Drinka P, Mattson D, Rudman D : **Low circulating levels of insulin-like growth factors and testosterone in chronically institutionalized elderly men.** J Am Geriatr Soc 41:975-981, 1993.

4. Belanger A, Candas B, Dupont A et al. : **Changes in serum concentrations of conjugated and unconjugated steroid in 40 to 80 year old men.** J Clin Endocrinol Metab 79:1086-1090, 1994.

5. Borst S, Millard W, Lowenthal D : **Growth hormone, exercise, and aging : the future of therapy for the frail elderly.** J Am Geriatr Soc 42:528-535, 1994.

6. Morales A, Nolan J, Nelson J, Yen S : **Effects of replacement dose of dehydroepiandrosterone in men and women of advancing age.** J Clin Endocrinol Metab 78:1360-1367, 1994.

7. Tenover J : **Androgen administration to aging men.** Clin Andol 23:877-892, 1994.

8. Rosenfeld R, Rosenberg B, Fukushima D, Heuman L : **24 hour secretory pattern of dehydroepiandrosterone and dehydroandrosterone sulphate.** J Clin Endocrinol 40:850-855, 1975.

9. Liu C, Laughlin G, Fischer U, Yen S : **Marked attenuation of ultradian and circadian rhythms of dehydroepiandrosterone in postmenopausal women : evidence for a reduced 17,20-desmolase enzymatic activity.** J Clin Endocrinol Metab 71:900-906, 1990.

10. Thomas G, Frenoy N, Legrain S, Sebag-Lanoe R, Baulieu E, Debuire B : **Serum dehydroepiandrosterone sulphate levels as an individual marker.** J Clin Endocrinol Metab 79:1273-1276, 1994.

11. Tissandier O, Peres G, Fiet J, Piette F : **Testosterone, dehydroepiandrosterone, insulin-like growth factor 1, and insulin in sedentary and physically trained aged men.** Eur J Appl Physiol 85:177-184; 2001.

12. Guagnano MT, Del Ponte A, Manigrasso MR, Merlitti D, Pace-Palitti V, Sensis S : **Age-related circadian rhythm of DHEA-S plasma levels in male subjects.** Biological Rhythm Research 32,3:323-331, 2001.

13. Derksen J, Nagesser S.K, Meinders A.E, Haak H.R, Van De Velde C.J.H : **Identification of virilizing adrenal tumors in hirsute women.** New Engl J Med 331(15):968-973, 1994.

14. Lobo R.A, Paul W.L, Goebelsmann U : **dehydroepiandrosterone sulphate as an indicator of adrenal androgen function.** Obstet Gynecol 57:69-73, 1981.

15. Cacciari E : **Gonadal and adrenal secretion of dehydroepiandrosterone sulphate in prepubertal and pubertal subjects.** J Endocrinol Invest 4:197-202, 1981.

16. Ebeling P, Koivisto V.A : **Physiological importance of dehydroepiandrosterone.** Lancet 343:1479-1481, 1994.

XVIII. RESUME DU PROTOCOLE

	ACTIVITE TOTALE (µl)	CALIBRA- TEURS (µl)	ECHANTILLON(S) CONTROLES (µl)
Calibrateurs (0 à 5) Echantillons, contrôles Traceur	- - 500	10 - 500	- 10 500
Incubation	1 heure dans un bain-marie à 37°C		
Séparation Solution de Lavage Séparation Solution de Lavage Séparation	-	aspiration 2,0 ml aspiration 2,0 ml Aspiration (prudemment)	
Comptage (radioactivité)	Temps de comptage des tubes : 60 secondes		



Lees het hele protocol vóór gebruik.

DHEA-S-RIA-CT

I. BEOOGD GEBRUIK

Radioimmunoassay voor de kwantitatieve bepaling *in vitro* van humaan 5-androstene-3 β -OL-17-dione sulfaat (dehydro-epiandrosteronsulfaat of DHEA-sulfaat) in serum.

II. ALGEMENE INFORMATIE

- A. **Gedeponeerd handelsmerk:** DIAsource DHEA-S-RIA-CT kit
- B. **Catalogusnummer:** KIP0481: 96 testen.
- C. **Geproduceerd door:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, België.

Voor technische assistentie of voor bestelinformatie
kunt u contact opnemen met :

Tel : +32 (0)10 84.99.11

Fax: +32 (0)10 84.99.91

III. KLINISCHE ACHTERGROND

A. Biologische activiteit

Dehydro-epiandrosteron (DHEA) en zijn gesulfateerde vorm, DHEA-S, zijn de belangrijkste steroïden van de bijnieren. Bij vrouwen zijn de bijnieren de enige bron van deze steroïden maar bij mannen produceren ook de testes in geringe mate deze steroïden. ACTH stimuleert de vorming van DHEA waardoor er een significante diurnale variatie in serumconcentratie ontstaat. DHEA wordt snel in DHEA-S omgezet door een enzym dat in de bijnieren, de lever en de dunne darm aanwezig is. DHEA-S is in een concentratie aanwezig die 200 keer groter is dan die van DHEA en heeft een langere halfwaardetijd, waardoor de diurnale variatie in grote mate wordt opgeheven.

Het ouder worden heeft een invloed op de endocriene temporale structuur, inclusief DHEA-S die als een biomarker voor het ouder worden kan worden beschouwd aangezien de concentratie ervan bij oudere patiënten geleidelijk aan daalt. Vanaf ongeveer het zevende levensjaar stijgt de plasmaspiegel van DHEA-S gestaag, waarna die vanaf de leeftijd van dertig jaar geleidelijk aan daalt.

DHEA is een C-19 steroïd met een moleculair gewicht van 288 Kd en een halfwaardetijd in plasma van ongeveer 1 - 3 uur. Het moleculair gewicht van DHEA-S is 368,5 Kd en de halfwaardetijd bedraagt ongeveer 10 - 20 uur. DHEA wordt uit pregnenolon gevormd door het enzym 17,20 desmolase en gemetaboliseerd tot androstenedione of testosteron door respectievelijk 3 beta- of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. Hydroxysteroid sulfatase zet DHEA om in DHEA-S, terwijl sulfohydrolase deze reactie omkeert.

B. Klinische toepassingen

Bij patiënten met een bijnier tumor of met congenitale bijnierhyperplasie wordt een verhoogde DHEA-S concentratie waargenomen. DHEA-S kan ook bij patiënten met het polycysteus-ovariumsyndroom lichtjes verhoogd zijn, waarbij een bijniercomponent bijdraagt tot de virilisatie die bij deze aandoening wordt gezien. Tumoren met HCG-productie bij mannen kunnen tot een verhoogde testiculaire DHEA-productie leiden.

Dikwijls wordt DHEA-S samen met vrij testosteron getest als een initiële screening voor hyperandrogenisme bij hirsutisme. Soms is DHEA-S het enige hormoon dat in een hogere concentratie dan normaal circuleert en blijkbaar is het meer waarschijnlijk dat het – in vergelijking met andere androgenen – in hogere mate voorkomt tijdens de vroege stadia van hirsutisme.

Gewoonlijk kan DHEA-S niet worden gedetecteerd bij bijnierschorsinsufficiëntie of panhypopituitarisme. Tijdens de zwangerschap en bij gebruik van een oraal anticonceptiemiddel is de concentratie lichtjes verlaagd, terwijl die na toediening van glucocorticoiden aanzienlijk verlaagd is.

Bij een ernstige ziekte en bij aids-patiënten worden er lage circulerende concentraties waargenomen.

IV. BESCHRIJVING VAN DE METHODE

Een vaste hoeveelheid ¹²⁵I gelabeld DHEA-S concurreert met DHEA-S dat bepaald moet worden en aanwezig is in het monster of in de kalibrator voor een vast aantal plaatsen met antilichamen die geïmmobiliseerd zijn aan de wand van een buisje van polystyreen. Na een incubatieperiode van 1 uur bij 37°C in een waterbad, wordt de concurrentiereactie beëindigd door een aspiratiefase. Daarna worden de buisjes tweemaal gewassen met 2 ml werk-wasoplossing en opnieuw afgezogen. Een kalibratiecurve wordt uitgezet en de concentraties van DHEA-S van de monsters worden bepaald door dosisinterpolatie van de kalibratiecurve.

V. GELEVERDE REAGENTIA

Reagens	Kit voor 96 testen	Kleur -code	Reconstitutie			
 Buisjes gecoat met anti DHEA-S	2 x 48	Ivoor	Klaar voor gebruik			
<table border="1"><tr><td>Ag</td><td>¹²⁵I</td></tr></table> Tracer : DHEA-S-gelabeld met ¹²⁵ jood (HPLC-kwaliteit) in buffer met bovien albumine en azide (< 0,1%)	Ag	¹²⁵ I	1 flacon 55 ml 450 kBq	Rood	Klaar voor gebruik	
Ag	¹²⁵ I					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Nulkalibrator in humaan serum met thymol	CAL	0	1 flacon gevries- droogd	Geel	0,5 ml gedestilleerd water toevoegen	
CAL	0					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Kalibrators DHEA-S : N = 1 tot 5 (zie de exacte waarden op de flaconetiketten) in humaan plasma met thymol	CAL	N	5 flacons gevries- droogd	Geel	0,5 ml gedestilleerd water toevoegen	
CAL	N					
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Wasoplossing 70x : TRIS-HCl	WASH	SOLN	CONC	1 flacon 10 ml	Bruin	70x met gedistilleerd water verdunnen (gebruik een magnetische roerder)
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Controles: N = 1 of 2 in humaan plasma met thymol (zie de exacte waarden op de flaconetiketten)	CONTROL	N	2 flacons, gevries- droogd	zilver	0,5 ml gedestilleerd water toevoegen	
CONTROL	N					

Opmerking: Gebruik de nulkalibrator voor monsterverdunningen

VI. NIET MEEGELEVERDE MATERIALEN

De volgende materialen zijn noodzakelijk maar worden niet meegeleverd met de kit:

- 1. Gedestilleerd water.
- 2. Pipetten voor een volume van 10 µl en 500 µl (het gebruik van nauwkeurige pipetten met plastic wegwerptips wordt aanbevolen).
- 3. Vortexmenger.
- 4. Magnetische roerder.
- 5. Waterbad bij 37°C
- 6. Automatische spuit van 5 ml (type Cornwall) voor de wasfase.
- 7. Afzuigstelsysteem (facultatief).
- 8. Een gammateller die geschikt is voor de bepaling van ¹²⁵I. Een maximale telefficiëntie moet worden gegarandeerd.

VII. BEREIDING VAN HET REAGENS

- A. **Kalibrators:** Reconstitueer de kalibrators met 0,5 ml gedestilleerd water.
- B. **Controles:** Reconstitueer de controles met 0,5 ml gedestilleerd water.
- C. **Werk-wasoplossing:** Bereid een voldoende hoeveelheid werk-wasoplossing door 69 eenheden gedestilleerd water toe te voegen aan 1 eenheid wasoplossing. Gebruik een magnetische roerder voor de homogenisering. Op het eind van de dag moet de ongebruikte werk-wasoplossing afgevoerd worden.

VIII. OPSLAG EN VERVALDATUM VAN REAGENTIA

- Vóór opening of reconstitutie zijn alle kitcomponenten houdbaar tot de vervaldatum, zoals vermeld op het etiket, indien zij bewaard werden bij 2 tot 8°C.
- Na reconstitutie zijn de kalibrators en controles gedurende 1 week houdbaar bij 2 tot 8°C. Voor een langere bewaartermijn moeten aliquots gemaakt worden, die bij -20°C bewaard moeten worden. Vermijd herhaalde invriezing en ontdooiing.
- Een vers bereide werk-wasoplossing moet op dezelfde dag nog gebruikt worden.
- Na het eerste gebruik is de tracer houdbaar tot de vervaldatum, indien bewaard bij 2 tot 8°C in de oorspronkelijke, goed afgesloten flacon.
- Wijzigingen in het fysieke aspect van kitreagentia kunnen wijzen op instabiliteit of op een kwaliteitsvermindering.

IX. MONSTERAFNAME EN MONSTERBEREIDING

- Serummonsters moeten bij 2-8°C bewaard worden.
- Indien de bepaling niet binnen 24 uur uitgevoerd wordt, dan wordt aanbevolen om ze bij -20°C te bewaren.
- Vermijd herhaalde invriezing en ontdooiing.

X. PROCEDURE

A. Opmerkingen bij de procedure

Gebruik de kit of de componenten niet langer dan de aangegeven vervaldatum. Materialen van kits van verschillende loten mogen niet gemengd worden. Laat alle reagentia op kamertemperatuur (18-25°C) komen vóór gebruik. Meng alle reagentia en monsters goed door ze voorzichtig te bewegen of door er voorzichtig mee te draaien. Om kruisbesmetting te vermijden, moet een propere wegwerpbare pipettip gebruikt worden voor toevoeging van elk reagens en monster. Pipetten met een grote precisie of geautomatiseerde pipetteerapparatuur zullen de precisie verhogen. Respecteer de incubatietijden. Bereid een kalibratiecurve voor elke run; men mag geen gegevens gebruiken van voorafgaande runs.

B. Procedure

- 1. Etiketteer de gecoate buisjes in duplo voor elke kalibrator, voor elk monster, voor elke controle. Etiketteer 2 normale buisjes voor de bepaling van de totaal tellingen.
- 2. Vortex de kalibrators, monsters en controles gedurende korte tijd en distribueer 10 µl van elk in het desbetreffende buisje.
- 3. Distribueer 500 µl DHEA-S dat met ¹²⁵I gelabeld werd in elk buisje, inclusief de niet gecoate buisjes voor de totaal tellingen.
- 4. Schud het rek met de buisjes voorzichtig zodat eventuele ingesloten luchtballen vrijkomen.
- 5. Incubeer gedurende 1 uur bij 37°C in een waterbad
- 6. Zuig de inhoud van elk buisje (met uitzondering van de totaal tellingen) op. Zorg ervoor dat de plastic tip van de aspirator tot aan de bodem van het gecoate buisje komt zodat alle vloeistof verwijderd wordt.
- 7. Was de buisjes met 2 ml werk-wasvloeistof (met uitzondering van de totaal tellingen) en zuig op. Vermijd schuimvorming tijdens toevoeging van de werk-wasvloeistof.
- 8. Was de buisjes met 2 ml werk-wasvloeistof (met uitzondering van de totaal tellingen) en zuig op. Vermijd schuimvorming tijdens toevoeging van de werk-wasvloeistof.
- 9. Na de wasfase moeten de buisjes gedurende twee minuten rechtop blijven staan en zuig daarna de overblijvende vloeistof op.
- 10. Tel de buisjes in een gammateller gedurende 60 seconden.

XI. BEREKENING VAN DE RESULTATEN

- 1. Bereken het gemiddelde voor de bepalingen in duplo.
- 2. Bereken het percentage binding van de gebonden radioactiviteit, bepaald op het punt van de nulkalibrator (0), aan de hand van de volgende formule:

$$B/B0\text{ (}\%) = \frac{\text{cpm (Kalibrator of monster)}}{\text{cpm (Nulkalibrator)}} \times 100$$

- 3. Zet de (B/B0(%)) waarden uit voor elk kalibratorpunt, als een functie van de DHEA-S concentratie van elk kalibratorpunt verwerp hierbij de duidelijke uitschieters.
- 4. Ook computergestuurde methoden kunnen worden gebruikt om de kalibratiecurve te vormen. Indien de resultaten automatisch verwerkt

- worden, wordt de 4 parameter logistische functie aanbevolen voor de gepaste curve.
5. Bepaal de DHEA-S concentraties van de monsters uit de referentiecurve door de monsterwaarden (B/B0(%)) te interpoleren.
6. Voor elke bepaling moet het totaalpercentage van de tracer, gebonden in afwezigheid van ongelabeld DHEA-S (B0/T), gecontroleerd worden.

XII. KENMERKENDE GEGEVENS

De volgende gegevens dienen enkel ter illustratie en mogen in geen geval gebruikt worden ter vervanging van de real time kalibratiecurve.

DHEA-S-RIA-CT		Cpm	B/Bo (%)
Totaaltelling		164710	
Kalibrator	0,0 µg/dl	34266	100,0
	1,7 µg/dl	31393	91,6
	9,7 µg/dl	21411	62,5
	41,0 µg/dl	11078	32,3
	219,0 µg/dl	3398	9,9
	1090,0 µg/dl	877	2,6

Omrekeningsfactor:
Van µg/dl naar µmol/l: x 0,0271
Van µmol/l naar µg/dl: x 36,85

XIII. EIGENSCHAPPEN EN GRENZEN

- A. **Detectielimiet**
Twintig nulkalibrators werden bepaald, samen met de serie andere kalibrators. De detectielimiet, omschreven als de schijnbare concentratie van twee standaarddeviaties onder de gemiddelde tellingen bij nulbinding, bedroeg 1,23 µg/dl.
- B. **Specificiteit**

De percentages van kruisreactiviteit geschat naar de vergelijking van de concentraties (een remming van 50% toegevend) zijn respectievelijk:

Bestanddeel	Kruisreactiviteit (%)
DHEA-S	100,00
DHEA	< 0,05
DHEA-glucuronide	< 0,05
Androsteendiol	< 0,05
Estron-Sulfaat	0,08
5α-Dihydrotestosteron	< 0,05
Testosteron	< 0,05

Nota: Deze tabel toont de kruisreactiviteit voor het anti -DHEA-S

PRECISIE BINNEN EEN TEST				PRECISIE TUSSEN TESTEN			
Serum	N	<X> ± SD (µg/dl)	VC (%)	Serum	N	<X> ± SD (µg/dl)	VC (%)
A	20	32,1 ± 1,9	5,9	A	12	30,8 ± 2,0	6,5
B	20	107,4 ± 5,1	3,6	B	12	105,5 ± 6,5	6,5

SD: standaarddeviatie; VC: variatiecoëfficiënt

VERDUNNINGSTEST			
Monster	Verdunning	Theoretische concentratie (µg/dl)	Concentratie die bepaald werd (µg/dl)
Serum 1	1/1	389,6	
	1/2	194,8	168,1
	1/4	97,4	92,3
	1/8	48,7	50,7
	1/16	24,3	27,1
Serum 2	1/1		
	1/2	85,0	
	1/4	42,5	38,3
	1/8	21,2	19,0
	1/16	10,6	10,6
		5,3	7,0

Monsters werden verdund met de Nulkalibrator.

RECOVERY-TEST				
Monster	DHEA-S toegevoegd (µg/dl)	Theoretische DHEA-S (µg/dl)	Gemeten DHEA-S (µg/dl)	Recovery (%)
Serum	0	NA	26,0	NA
	25	51	59,7	117
	50	76	80,6	106
	100	126	128,1	101,6

Naar ons beste weten bestaat er geen internationaal referentiemateriaal voor deze parameter.

E. Tijdspanne tussen de laatste kalibrator en distributie van het monster

Zoals hieronder weergegeven wordt, blijven de resultaten van de bepaling nauwkeurig, zelfs wanneer een monster 30 minuten na toevoeging van de kalibrator over de gecoate buisjes gedistribueerd wordt.

TIJDSPANNE				
Serum (µg/dl)	0'	10'	20'	30'
Serum 1	30,8	33,8	31,5	31,2
Serum 2	98,5	113,5	118,2	102,5

XIV. INTERNE KWALITEITSCONTROLE

- Indien de resultaten, die verkregen werden voor controle 1 en/of controle 2, niet binnen het bereik vallen zoals vermeld op het flaconetiket, dan mogen de resultaten niet gebruikt worden tenzij een bevredigende uitleg gegeven wordt voor de discrepantie.
- Indien gewenst, kan elk laboratorium zijn eigen pools voor controlemonsters maken, die dan in aliquots bewaard moeten worden in de diepvriezer.
- Aanvaardingscriteria voor het verschil tussen de resultaten in duplo van stalen moeten steunen op gangbare laboratoriumpraktijken.

XV. REFERENTIE-INTERVALS

Deze waarden worden slechts als leidraad gegeven; elk laboratorium moet zijn eigen normaal bereik van waarden uitmaken.
Bereik gebaseerd op 2.5% & 97.5% percentielen.

Patiënten (leeftijdsgroep)	N	Gemiddelde (µg/dl)	Bereik
Vrouwen			
< 15	15	129,7	37,8 - 264,5
15-19	19	276,7	117,3 - 531,0
20-24	16	244,0	118,7 - 428,9
25-29	33	197,5	70,2 - 413,4
30-34	27	175,1	75,2 - 398,7
35-39	23	162,0	63,3 - 291,4
40-44	19	144,4	37,3 - 255,8
45-49	13	109,8	20,9 - 198,0
50-54	16	117,0	26,8 - 375,4
55-59	13	102,9	34,5 - 178,1
60-64	10	92,8	24,6 - 182,3
> 65	15	114,3	6,3 - 377,0
Mannen			
< 15	14	138,9	34,9 - 284,1
15 - 50	42	262,2	80,5 - 479,4
> 50	37	177,6	51,8 - 470,7

XVI. VOORZORGSMAATREGELEN EN WAARSCHUWINGEN

Veiligheid

Uitsluitend voor in vitro diagnostisch gebruik.

Deze kit bevat ¹²⁵I (halfwaardetijd: 60 dagen) , dat ioniserende X- (28 keV) en γ-stralen (35.5 keV) uitzendt.

Dit radioactieve product mag enkel overhandigd worden aan en gebruikt worden door bevoegd personeel; ontvangst, opslag, gebruik en overdracht van radioactieve producten zijn onderworpen aan de wetgeving van het land van de eindgebruiker. In geen geval mag het product toegediend worden aan mensen of dieren.

Alle handelingen met radioactief materiaal moeten plaatsvinden in een daartoe bestemde ruimte, waar uitsluitend bevoegd personeel toegelaten wordt. Een logboek met ontvangst en opslag van radioactieve materialen moet worden bijgehouden in het laboratorium. Laboratoriumapparatuur en glaswerk, dat eventueel gecontamineerd werd met radioactieve bestanddelen, moeten worden gesegregeerd om kruisbesmetting van verschillende radioisotopen te vermijden.

Als radioactief materiaal gemorst werd, dan moet dat onmiddellijk gereinigd worden in overeenstemming met de procedure voor stralingsveiligheid. Het radioactieve afval moet worden weggegooid in overeenstemming met de plaatselijke voorschriften en richtlijnen van de autoriteiten waaronder het laboratorium valt. Naleving van de basisregels van stralingsveiligheid zorgt voor een juiste bescherming.

De componenten, afkomstig van menselijk bloed, in deze kit werden getest door in Europa goedgekeurde en/of door de Amerikaanse FDA goedgekeurde methoden op aanwezigheid van HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 en 2 en gaven een negatief resultaat. Geen enkele bekende methode kan echter volledige garantie bieden dat derivaten van menselijk bloed geen hepatitis, aids of andere infecties overdragen. Daarom moet men reagentia, serum- of plasmamonsters behandelen in overeenstemming met de plaatselijke veiligheidsprocedures.

Alle producten en derivaten van dierlijke oorsprong zijn afkomstig van gezonde dieren. Boviene componenten komen uit landen waar BSE niet gerapporteerd werd. Toch moeten componenten die bestanddelen van dierlijke oorsprong bevatten, behandeld worden als potentieel besmettelijk.

Vermijd dat de reagentia (natriumazide als conserveermiddel) in contact komen met de huid. Azide in deze kit kan reageren met lood en koper in de afvoerleidingen en op die manier zeer explosieve metaalaziden vormen. Tijdens de wasfase moeten de afvoerleidingen ruimschoots met water nagespoeld worden om ophoping van azide te vermijden.

Niet roken, drinken, eten of cosmetica aanbrengen in de werkruimte. Niet met de mond pipetteren. Draag beschermende kleding en gebruik wegwerphandschoenen.

Zie veiligheidsinformatieblad (MSDS) voor meer informatie

XVII. BIBLIOGRAFIE

- Orentreich N, BrindJ, Rizer R, Vogelmann J : **Age changes and sex differences in serum dehydroepiandrosterone sulphate concentrations throughout adulthood.** J Clin Endocrinol Metab 59:551-555, 1984.
- Orentreich N, Brind J, Vogelmann J, Andres R, Baldwin H. : **Long-term**

longitudinal measurements of plasma dehydroepiandrosterone sulphate in normal men. J Clin Endocrinol Metab 75:1002-1004, 1992.

- Abbasi A, Drinka P, Mattson D, Rudman D : **Low circulating levels of insulin-like growth factors and testosterone in chronically institutionalized elderly men.** J Am Geriatr Soc 41:975-981, 1993.
- Belanger A, Candas B, Dupont A et al. : **Changes in serum concentrations of conjugated and unconjugated steroid in 40 to 80 year old men.** J Clin Endocrinol Metab 79:1086-1090, 1994.
- Borst S, Millard W, Lowenthal D : **Growth hormone, exercise, and aging : the future of therapy for the frail elderly.** J Am Geriatr Soc 42:528-535, 1994.
- Morales A, Nolan J, Nelson J, Yen S : **Effects of replacement dose of dehydroepiandrosterone in men and women of advancing age.** J Clin Endocrinol Metab 78:1360-1367, 1994.
- Tenover J : **Androgen administration to aging men.** Clin Andol 23:877-892, 1994.
- Rosenfeld R, Rosenberg B, Fukushima D, Heuman L : **24 hour secretory pattern of dehydroepiandrosterone and dehydroandrosterone sulphate.** J Clin Endocrinol 40:850-855, 1975.
- Liu C, Laughlin G, Fischer U, Yen S : **Marked attenuation of ultradian and circadian rhythms of dehydroepiandrosterone in postmenopausal women : evidence for a reduced 17,20-desmolase enzymatic activity.** J Clin Endocrinol Metab 71:900-906, 1990.
- Thomas G, Frenoy N, Legrain S, Sebag-Lanoe R, Baulieu E, Debuire B : **Serum dehydroepiandrosterone sulphate levels as an individual marker.** J Clin Endocrinol Metab 79:1273-1276, 1994.
- Tissandier O, Peres G, Fiet J, Piette F : **Testosterone, dehydroepiandrosterone, insulin-like growth factor 1, and insulin in sedentary and physically trained aged men.** Eur J Appl Physiol 85:177-184; 2001.
- Guagnano MT, Del Ponte A, Manigrasso MR, Merlitti D, Pace-Palitti V, Sensis S : **Age-related circadian rhythm of DHEA-S plasma levels in male subjects.** Biological Rhythm Research 32,3:323-331, 2001.
- Derksen J, Nagesser S.K, Meinders A.E, Haak H.R, Van De Velde C.J.H : **Identification of virilizing adrenal tumors in hirsute women.** New Engl J Med 331(15):968-973, 1994.
- Lobo R.A, Paul W.L, Goebelsmann U : **dehydroepiandrosterone sulphate as an indicator of adrenal androgen function.** Obstet Gynecol 57:69-73, 1981.
- Cacciari E : **Gonadal and adrenal secretion of dehydroepiandrosterone sulphate in prepubertal and pubertal subjects.** J Endocrinol Invest 4:197-202, 1981.
- Ebeling P, Koivisto V.A : **Physiological importance of dehydroepiandrosterone.** Lancet 343:1479-1481, 1994.

XVIII. SAMENVATTING VAN HET PROTOCOL

	TOTAAL- TELLINGEN (µl)	KALIBRATORS (µl)	MONSTER(S) CONTROLES (µl)
Kalibrators (0 tot 5)	-	10	-
Monsters, controles	-	-	10
Tracer	500	500	500
Incubatie	1 uur bij 37°C in een waterbad		
Scheiding	-	Opzuigen	
Werk-wasoplossing		2,0 ml	
Scheiding		Opzuigen	
Werk-wasoplossing		2,0 ml	
Scheiding		Voorzichtig opzuigen	
Telling	Tel buisjes gedurende 60 seconden		

Vor Gebrauch des Kits lesen Sie bitte diese Packungsbeilage.

DHEA-S-RIA-CT

I. VERWENDUNGSZWECK

Ein Radio-Immunoassay für die quantitative *in vitro* Bestimmung von humanem 5-Androsten-3 β -OL-17-Dione Sulfat (Dehydroepiandrosteron - Sulfat oder DHEA - Sulfat) in Serum.

II. ALLGEMEINE INFORMATION

- A. **Handelsbezeichnung :** DIAsource DHEA-S-RIA-CT Kit
- B. **Katalognummer :** KIP0481 : 96 Tests
- C. **Hergestellt von :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgien.

Für technische Unterstützung oder Bestellungen wenden Sie sich bitte an:

Tel : +32 (0)10 84.99.11

Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. KLINISCHER HINTERGRUND

A. Biologische Aktivität

Dehydroepiandrosteron (DHEA) und seine sulfatierte Form (DHEA-S), sind die am reichlichst vorhandenen steroiden Produkte der Nebennierendrüsen. Die Nebenniere ist die Hauptquelle dieser Steroide bei Frauen, während bei Männern eine geringe Abgabe über die Hoden erfolgt. Die Freisetzung von DHEA wird durch ACTH stimuliert, das eine signifikante tägliche Schwankung der Serumkonzentrationen hervorruft. DHEA wird mittels eines Enzyms, das in der Nebenniere, der Leber und im Dünndarm vorhanden ist, schnell in DHEA-S umgewandelt. DHEA-S kommt in bis über 200 mal höheren Konzentrationen vor als DHEA und hat eine längere Halbwertszeit, was die Tagesschwankung größtenteils neutralisiert.

Die Einflüsse des Alterns auf die endokrine temporale Struktur, einschließlich auch auf DHEA-S, das deswegen als ein Biomarker des Alters angesehen werden kann, wird durch den schrittweisen Rückgang der Bildung dieser Substanzen bei älteren Subjekten bewiesen. Die Plasma-Level von DHEA-S steigen stetig ab dem siebten Lebensjahr und sinken schrittweise nach dem dritten Jahrzehnt.

DHEA ist ein 19-carbon Steroid mit einem Molekulargewicht von 288 Kd und einer Halbwertszeit in Plasma von ungefähr 1 – 3 Stunden. Das Molekulargewicht von DHEA-S beträgt 368.5 Kd und die Halbwertszeit liegt bei ungefähr 10 – 20 Stunden. DHEA wird aus Pregnenolon durch das Enzym 17, 20 Desmolase gebildet und metabolisiert zu Androstendion oder Testosteron durch jeweils 3 Beta- oder 17 Beta-Hydrosteroid Dehydrogenase. Hydrosteroid Sulphatase wandelt DHEA in DHEA-S und Sulphohydrolase kehrt diese Reaktion um.

B. Klinische Anwendungen

Steigende Werte von DHEA-S werden im Plasma von Patienten mit Nebennierentumoren oder beim adrenogenitalen Syndrom gefunden. DHEA-S kann auch leicht erhöht sein bei Patienten mit polyzystischem Ovarialsyndrom, begleitet von einer adrenalen Komponente, was unter diesen Bedingungen zur Virilisierung führt. HCG-produzierende Tumore beim Mann können zu einer erhöhten testikulären Produktion von DHEA führen.

DHEA-S wird oft untersucht in Verbindung mit freiem Testosteron als Anfangsbild der Hyperandrogenämie bei Hirsutismus. Manchmal ist DHEA-S das einzig zirkulierende Hormon, dessen Werte über normal liegen, und es ist anscheinend eher erhöht während der frühen Stadien des Hirsutismus als die meisten anderen Androgene.

DHEA-S ist normalerweise bei adrener Insuffizienz oder Panhypopituitarismus nicht nachweisbar. Leicht vermindert sind die Konzentrationen in der Schwangerschaft oder bei oraler Einnahme von Kontrazeptiva und ausgesprochen vermindert nach exogener Glukokortikoid-Gabe.

Niedrig zirkulierende Konzentrationen werden bei schweren Erkrankungen oder bei Patienten mit AIDS gefunden.

IV. GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

Eine festgesetzte Menge an ¹²⁵I-markiertem DHEA-S konkurriert mit dem zu messenden, in der Probe oder in dem Kalibrator vorhandenen DHEA-S um eine festgesetzte Menge an Antikörperbindungsstellen, die an der Wand des Polystyren Röhrchens fixiert sind. Nach 1 Stunde Inkubation bei 37°C im Wasserbad, beendet das Absaugen die Verdrängungsreaktion. Die Röhrchen werden dann zweimal mit je 2 ml Waschlösung gewaschen und abgesaugt. Eine Standardkurve wird gedruckt und die DHEA-S-Konzentrationen der Proben werden über Dosis Interpolation der Kalibrationskurve bestimmt.

V. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

Reagenz	96 Test Kit	Farbcode	Rekonstitution			
 Mit anti DHEA-S - beschichtete Röhrchen	2 x 48	Elfenbein	gebrauchsfertig			
<table border="1"><tr><td>Ag</td><td>¹²⁵I</td></tr></table> TRACER: ¹²⁵ Iod-markiertes DHEA-S (HPLC grade) in Puffer mit Rinderserum Albumin und Azid (<0,1%)	Ag	¹²⁵ I	1 Gefäß 55 ml 450 kBq	Rot	gebrauchsfertig	
Ag	¹²⁵ I					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Null-Kalibrator: Humanserum und Thymol	CAL	0	1 Gefäß lyophilisiert	Gelb	0,5 ml dest. Wasser zugeben	
CAL	0					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Kalibratoren - N = 1 bis 5 (genaue Werte auf Gefäß-Etiketten) in Humanplasma und Thymol	CAL	N	5 Gefäße lyophilisiert	Gelb	0,5 ml dest. Wasser zugeben	
CAL	N					
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Waschlösung (TRIS-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 Gefäß 10 ml	Braun	70x mit dest. Wasser (Magnetrührer verwenden) verdünnen
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Kontrollen - N = 1 oder 2 in Humanplasma, und Thymol (genaue Werte auf Gefäß-Etiketten)	CONTROL	N	2 Gefäße lyophilisiert	Silber	0,5 ml dest. Wasser zugeben	
CONTROL	N					

Bemerkung: Benutzen Sie den Null-Kalibrator für Serumverdünnungen.

VI. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

Folgendes Material wird benötigt, aber nicht mit dem Kit mitgeliefert:

- 1. Dest. Wasser
- 2. Pipetten: 10 µl und 500 µl (Verwendung von Präzisionspipetten mit Einwegpipettenspitzen wird empfohlen)
- 3. Vortexmixer
- 4. Magnetrührer
- 5. Wasserbad bei 37°C
- 6. 5 ml automatische Spritze (Cornwall-Typ) zum Waschen
- 7. Absaugsystem (optional)
- 8. Jeder Gamma-Counter, der ¹²⁵I messen kann, kann verwendet werden. Maximale Messeffizienz sollte gewährleistet sein.

VII. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- A. **Kalibratoren:** Rekonstituieren Sie die Kalibratoren mit 0,5 ml dest. Wasser.
- B. **Kontrollen:** Rekonstituieren Sie die Kontrollen mit 0,5 ml dest. Wasser.
- C. **Waschlösung:** Zur Vorbereitung eines angemessenen Volumens nutzbarer Waschlösung, mischen Sie zu einem Volumen Waschlösung (70x) 69 Volumen destilliertes Wasser. Benutzen Sie einen Magnetrührer. Entsorgen Sie nach jedem Arbeitstag die überflüssige Waschlösung.

VIII. AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Vor dem Öffnen und Rekonstituieren sind alle Kitkomponenten bei 2 bis 8°C bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum haltbar.
- Nach der Rekonstitution sind die Kalibratoren und Kontrollen eine Woche bei 2 bis 8°C stabil. Für eine längere Aufbewahrung sollten diese Reagenzien aliquotiert und bei -20°C eingefroren werden während max. 3 Monaten. Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.
- Die Waschlösung sollte frisch hergestellt und am selben Tag aufgebraucht werden.
- Wenn der Tracer nach der ersten Benutzung wieder im gutverschlossenen Originalgefäß bei 2 bis 8°C aufbewahrt wird, ist er bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.
- Veränderungen im Aussehen der Kitkomponenten können auf Instabilität bzw. Zerfall hindeuten.

IX. PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG

- Serumproben müssen bei 2-8°C aufbewahrt werden.
- Falls der Test nicht innerhalb von 24 Std. durchgeführt wird, müssen die Proben bei -20°C aufgehoben werden.
- Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.

X. DURCHFÜHRUNG

- A. **Bemerkungen zur Durchführung**
Verwenden Sie den Kit oder dessen Komponenten nicht nach dem Verfallsdatum.
Vermischen Sie nie Materialien von unterschiedlichen Kit-Chargen.
Bringen Sie alle Reagenzien vor der Verwendung auf Raumtemperatur (18-28°C).
Mischen Sie alle Reagenzien und Proben gründlich durch sanftes Schütteln oder Rühren.
Verwenden Sie saubere Einwegpipettenspitzen, um Kreuzkontamination zu vermeiden. Präzisionspipetten oder ein automatisches Pipettiersystem erhöhen die Präzision.
Achten Sie auf die Einhaltung der Inkubationszeiten.
Erstellen Sie für jeden Durchlauf eine Kalibrationskurve, verwenden Sie nicht die Daten von früheren Durchläufen.
Jede Tube kann nur einmal verwendet werden.

- B. **Durchführung**
 1. Beschriften Sie je 2 beschichtete Röhrchen für jeden Kalibrator, jede Kontrolle und jede Probe. Zur Bestimmung der Gesamtaktivität, beschriften Sie 2 normale Röhrchen.
 2. Vortexen Sie Kalibratoren, Kontrollen und Proben kurz und geben Sie 10 µl von jedem in ihre Röhrchen.
 3. Geben Sie 500 µl des ¹²⁵Iod-markierten DHEA-S in jedes Röhrchen, einschließlich der unbeschichteten Röhrchen für die Gesamtaktivität.
 4. Schütteln Sie vorsichtig die Halterung mit den Röhrchen um Blasen zu entfernen.
 5. Inkubieren Sie 1 Stunde bei 37° C im Wasserbad
 6. Saugen Sie den Inhalt jedes Röhrchens ab (oder dekantieren Sie) (außer Gesamtaktivität). Vergewissern Sie sich, dass die Plastikspitze des Absaugers den Boden des beschichteten Röhrchens erreicht, um die gesamte Flüssigkeit zu entfernen.
 7. Waschen Sie die Röhrchen mit 2 ml Waschlösung (außer Gesamtaktivität) und saugen Sie ab (oder dekantieren Sie). Vermeiden Sie Schaumbildung bei Zugabe der Waschlösung.
 8. Waschen Sie die Röhrchen mit 2 ml Waschlösung (außer Gesamtaktivität) und saugen Sie ab (oder dekantieren Sie). Vermeiden Sie Schaumbildung bei Zugabe der Waschlösung.
 9. Lassen Sie die Röhrchen 2 Minuten aufrecht stehen, und saugen Sie den verbleibenden Flüssigkeitstropfen ab.
 10. Werten Sie die Röhrchen in einem Gamma-Counter über 60 Sekunden aus.

XI. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

- 1. Berechnen Sie den Durchschnitt aus den Doppelbestimmungen.
- 2. Berechnen Sie die gebundene Radioaktivität als Prozentsatz des am Null-Kalibratorpunkt (0) bestimmten Wertes nach folgender Formel:
$$B/B0 (\%) = \frac{\text{Aktivität (Kalibrator oder Probe)}}{\text{Aktivität (Null-Kalibrator)}} \times 100$$
- 3. Tragen Sie die (B/B0(%))- Werte für jeden Kalibratorpunkt ein als Funktion der DHEA-S Konzentration für jeden Kalibratorpunkt. Schließen Sie offensichtliche ‚Ausreißer‘ aus.
- 4. Computergestützte Methoden können ebenfalls zur Erstellung der Kalibrationskurve verwendet werden. Falls die Ergebnisberechnung mit dem Computer durchgeführt wird, empfehlen wir die Berechnung mit einer, 4 Parameter'-Kurvenfunktion.

5. Bestimmen Sie die DHEA-S Konzentrationen der Proben durch Interpolation der Probenwerte (B/B0(%)) aus der Referenzkurve.
6. Bei jedem Assay muss der Prozentsatz des gesamten gebundenen Tracers ohne unmarkiertes DHEA-S (B0/T) geprüft werden.

XII. TYPISCHE WERTE

Die folgenden Daten dienen nur zu Demonstrationszwecken und können nicht als Ersatz für die Echtzeitkalibrationskurve verwendet werden.

DHEA-S-RIA-CT		cpm	B/Bo (%)
Gesamtaktivität		164710	
Kalibrator	0,0 µg/dl	34266	100,0
	1,7 µg/dl	31393	91,6
	9,7 µg/dl	21411	62,5
	41,0 µg/dl	11078	32,3
	219,0 µg/dl	3398	9,9
	1090,0 µg/dl	877	2,6

Konvertierungsfaktor:
Von µg/dl bis µmol/l : x 0,0271
Von µmol/l bis µg/dl : x 36,85

XIII. LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK

- A. Nachweisgrenze
Zwanzig Null-Kalibratoren wurden zusammen mit einem Satz anderer Kalibratoren gemessen.
Die Nachweisgrenze, definiert als die scheinbare Konzentration bei zwei Standardabweichungen unterhalb des gemessenen Durchschnittswerts bei Nullbindung, entsprach 1,23 µg/dl.

B. Spezifität

Der Prozentsatz der Kreuzreaktion, der im Vergleich der Konzentration geschätzt wurde, welche eine 50%ige Inhibition ergibt, beträgt respektive:

Substanz	Kreuzreaktivität (%)
DHEA-S	100,00
DHEA	< 0,05
DHEA-Glukurinid	< 0,05
Androstenediol	< 0,05
Estronsulfat	0,08
5α-Dihydro Testosteron	< 0,05
Testosteron	< 0,05

Bemerkung: Diese Tabelle zeigt die Kreuzreaktivität für die anti-DHEA-S

C. Präzision

INTRA-ASSAY PRÄZISION				INTER-ASSAY PRÄZISION			
Serum	N	<X> ± SD (µg/dl)	CV (%)	Serum	N	<X> ± SD (µg/dl)	CV (%)
A	20	32,1 ± 1,9	5,9	A	12	30,8 ± 2,0	6,5
B	20	107,4 ± 5,1	3,6	B	12	105,5 ± 6,5	6,5

SD: Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

D. Genauigkeit

VERDÜNNUNGSTEST			
Probe	Verdünnung	Theoretische Konzent. (µg/dl)	Gemessene Konzent. (µg/dl)
Serum 1	1/1	389,6	
	1/2	194,8	168,1
	1/4	97,4	92,3
	1/8	48,7	50,7
	1/16	24,3	27,1
Serum 2	1/1	85,0	
	1/2	42,5	38,3
	1/4	21,2	19,0
	1/8	10,6	10,6
	1/16	5,3	7,0

Die Proben wurden mit Null-Kalibrator verdünnt.

WIEDERFINDUNGSTEST				
Probe	Zugeg. DHEA-S (µg/dl)	Theoretisch DHEA-S (µg/dl)	Gemessen DHEA-S (µg/dl)	Wiedergefunden (%)
Serum	0	NA	26,0	NA
	25	51	59,7	117
	50	76	80,6	106
	100	126	128,1	101,6

Laut unserem Wissen, gibt es keine internationale Referenzen zu diesen Parametern.

- E. Zeitverzögerung zwischen letzter Kalibrator- und Probenzugabe
Es wird im Folgenden gezeigt, dass die Genauigkeit der Tests selbst dann gewährleistet ist, wenn die Probe 30 Minuten nach Zugabe des Kalibrators in die beschichteten Röhrchen zugegeben wird.

ZEITDIFFERENZ				
Serum (µg/dl)	0'	10'	20'	30'
Serum 1	30,8	33,8	31,5	31,2
Serum 2	98,5	113,5	118,2	102,5

XIV. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

- Entsprechen die Ist-Werte nicht den auf den Fläschchen angegebenen Soll-Werten, können diese Werte, ohne treffende Erklärung für die Abweichungen, nicht weiterverarbeitet werden.
- Falls zusätzliche Kontrollen erwünscht sind, kann jedes Labor seinen eigenen Pool herstellen, der in Aliquots eingefroren werden sollte.
- Akzeptanzkriterien für die Differenz zwischen den Resultaten der Wiederholungstests anhand der Proben müssen auf Guter Laborpraxis beruhen.

XV. ZU ERWARTENDER BEREICH

Diese Werte sind nur Richtwerte; jedes Labor muss seinen eigenen Normalwertbereich ermitteln.
Bereich auf Basis der 2,5% und 97,5% Perzentile

Subjekte (Altersgruppe)	N	Mittelwert (µg/dl)	Bereich
Frauen			
< 15	15	129,7	37,8 - 264,5
15-19	19	276,7	117,3 - 531,0
20-24	16	244,0	118,7 - 428,9
25-29	33	197,5	70,2 - 413,4
30-34	27	175,1	75,2 - 398,7
35-39	23	162,0	63,3 - 291,4
40-44	19	144,4	37,3 - 255,8
45-49	13	109,8	20,9 - 198,0
50-54	16	117,0	26,8 - 375,4
55-59	13	102,9	34,5 - 178,1
60-64	10	92,8	24,6 - 182,3
> 65	15	114,3	6,3 - 377,0
Männer			
< 15	14	138,9	34,9 - 284,1
15 - 50	42	262,2	80,5 - 479,4
> 50	37	177,6	51,8 - 470,7

XVI. VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

Sicherheit

Nur für *in vitro* diagnostische Zwecke.

Dieser Kit enthält ¹²⁵I (Halbwertszeit: 60 Tagen), das ionisierende X (28 keV) und γ (35.5 keV) Strahlungen emittiert.

Dieses radioaktive Produkt kann nur an autorisierte Personen abgegeben und darf nur von diesen angewendet werden; Erwerb, Lagerung, Verwendung und Austausch radioaktiver Produkte sind Gegenstand der Gesetzgebung des Landes des jeweiligen Endverbraucher. In keinem Fall darf das Produkt an Menschen oder Tieren angewendet werden.

Der Umgang mit radioaktiven Substanzen sollte fern von Durchgangsverkehr in einem speziell ausgewiesenen Bereich stattfinden. Ein Logbuch für Protokolle und Aufbewahrung muss im Labor sein. Die Laborausstattung und die Glasbehälter, die mit radioaktiven Substanzen kontaminiert werden können, müssen gesondert werden, um Kreuzkontaminationen mit unterschiedlichen Radioisotopen zu verhindern.

Verschüttete radioaktive Substanzen müssen sofort den Sicherheitsbestimmungen entsprechend entfernt werden. Radioaktive Abfälle müssen entsprechend den lokalen Bestimmungen und Richtlinien der für das Labor zuständigen Behörden gelagert werden. Das Einhalten der Sicherheitsbestimmungen für den Umgang mit radioaktiven Substanzen gewährleistet ausreichenden Schutz.

Die menschlichen Blutkomponenten in diesem Kit wurden mit europäischen und in den USA erprobten FDA-Methoden getestet, sie waren negativ für HBsAg, anti-HCV und anti-HIV-1 und -2. Keine bekannte Methode kann jedoch vollkommene Sicherheit darüber liefern, dass menschliche Blutbestandteile nicht Hepatitis, AIDS oder andere Infektionen übertragen. Deshalb sollte der Umgang mit Reagenzien, Serum oder Plasmaproben in Übereinstimmung mit den Sicherheitsbestimmungen erfolgen.

Alle tierischen Produkte und deren Derivate wurden von gesunden Tieren gesammelt. Komponenten von Rindern stammen aus Ländern in denen BSE nicht nachgewiesen wurde. Trotzdem sollten Komponenten, die tierische Substanzen enthalten, als potentiell ansteckend behandelt werden.

Vermeiden Sie Hautkontakt mit den Reagenzien (Natriumazid als Konservierungsmittel). Das Azid in diesem Kit kann mit Blei oder Kupfer in den Abflüßrohren reagieren und so hochexplosive Metallazide bilden. Spülen Sie während der Waschschrte den Abflüß gründlich mit viel Wasser, um die Metallazidbildung zu verhindern.

Bitte rauchen, trinken, essen Sie nicht in Ihrem Arbeitsbereich, und ver wenden Sie keine Kosmetika. Pipettieren Sie nicht mit dem Mund. Tragen Sie Schutzkleidung und Wegwerfhandschuhe.

Weitere Informationen finden Sie im Sicherheitsdatenblatt (MSDS).

XVII. LITERATUR

- Orentreich N, BrindJ, Rizer R, Vogelmann J : **Age changes and sex differences in serum dehydroepiandrosterone sulphate concentrations throughout adulthood.** J Clin Endocrinol Metab 59:551-555, 1984.
- Orentreich N, Brind J, Vogelmann J, Andres R, Baldwin H. : **Long-term longitudinal measurements of plasma dehydroepiandrosterone sulphate in normal men.** J Clin Endocrinol Metab 75:1002-1004, 1992.

- Abbasi A, Drinka P, Mattson D, Rudman D : **Low circulating levels of insulin-like growth factors and testosterone in chronically institutionalized elderly men.** J Am Geriatr Soc 41:975-981, 1993.
- Belanger A, Candas B, Dupont A et al. : **Changes in serum concentrations of conjugated and unconjugated steroid in 40 to 80 year old men.** J Clin Endocrinol Metab 79:1086-1090, 1994.
- Borst S, Millard W, Lowenthal D : **Growth hormone, exercise, and aging : the future of therapy for the frail elderly.** J Am Geriatr Soc 42:528-535, 1994.
- Morales A, Nolan J, Nelson J, Yen S : **Effects of replacement dose of dehydroepiandrosterone in men and women of advancing age.** J Clin Endocrinol Metab 78:1360-1367, 1994.
- Tenover J : **Androgen administration to aging men.** Clin Andol 23:877-892, 1994.
- Rosenfeld R, Rosenberg B, Fukushima D, Heuman L : **24 hour secretory pattern of dehydroepiandrosterone and dehydroandrosterone sulphate.** J Clin Endocrinol 40:850-855, 1975.
- Liu C, Laughlin G, Fischer U, Yen S : **Marked attenuation of ultradian and circadian rhythms of dehydroepiandrosterone in postmenopausal women : evidence for a reduced 17,20-desmolase enzymatic activity.** J Clin Endocrinol Metab 71:900-906, 1990.
- Thomas G, Frenoy N, Legrain S, Sebag-Lanoe R, Baulieu E, Debuire B : **Serum dehydroepiandrosterone sulphate levels as an individual marker.** J Clin Endocrinol Metab 79:1273-1276, 1994.
- Tissandier O, Peres G, Fiet J, Piette F : **Testosterone, dehydroepiandrosterone, insulin-like growth factor 1, and insulin in sedentary and physically trained aged men.** Eur J Appl Physiol 85:177-184; 2001.
- Guagnano MT, Del Ponte A, Manigrasso MR, Merlitti D, Pace-Palitti V, Sensis S : **Age-related circadian rhythm of DHEA-S plasma levels in male subjects.** Biological Rhythm Research 32,3:323-331, 2001.
- Derksen J, Nagesser S.K, Meinders A.E, Haak H.R, Van De Velde C.J.H : **Identification of virilizing adrenal tumors in hirsute women.** New Engl J Med 331(15):968-973, 1994.
- Lobo R.A, Paul W.L, Goebelsmann U : **dehydroepiandrosterone sulphate as an indicator of adrenal androgen function.** Obstet Gynecol 57:69-73, 1981.
- Cacciari E : **Gonadal and adrenal secretion of dehydroepiandrosterone sulphate in prepubertal and pubertal subjects.** J Endocrinol Invest 4:197-202, 1981.
- Ebeling P, Koivisto V.A : **Physiological importance of dehydroepiandrosterone.** Lancet 343:1479-1481, 1994.

XVIII.ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

	GESAMT- AKTIVITÄT (µl)	KALIBRA- TOREN (µl)	PROBE(N)- KONTROLLEN (µl)
Kalibratoren (0 to 5)	-	10	-
Proben, Kontrollen	-	-	10
Tracer	500	500	500
Inkubation	1 Std bei 37°C im Wasserbad		
Separation	-	Absaugen	
Waschlösung	-	2,0 ml	
Separation	-	Absaugen	
Waschlösung		2,0 ml	
Separation		Absaugen	
Auswertung	Messen der Röhrchen 60 Sekunden		

Prima di utilizzare il kit leggere attentamente le istruzioni per l'uso

DHEA-S-RIA-CT

I. USO DEL KIT

Kit radioimmunologico per la determinazione quantitativa in vitro del 5-Androstene-3 β -OL-17-dione solfato umano (Deidroepiandrosterone solfato o DHEA solfato) in siero.

II. INFORMAZIONI DI CARATTERE GENERALE

- A. Nome commerciale:** DIAsource DHEA-S-RIA-CT Kit
- B. Numero di catalogo:** KIP0481: 96 test
- C. Prodotto da:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgio.

Per informazioni tecniche o su come ordinare il prodotto contattare:

Tel: +32 (0)10 84.99.11

Fax: +32 (0)10 84.99.91

III. INFORMAZIONI CLINICHE

A. Attività biologica

Il deidroepiandrosterone (DHEA) e la sua forma solfato, DHEA-S, rappresentano gli steroidi maggiormente prodotti dalle ghiandole surrenali. La ghiandola surrenale è l'unica fonte di questi steroidi nelle donne, mentre nell'uomo è presente anche una piccola quota prodotta dai testicoli. La produzione di DHEA viene stimolata dall'ACTH, che ne provoca una variazione diurna significativa nelle concentrazioni sieriche. Il DHEA viene rapidamente convertito in DHEA-S da un enzima presente in surrenali, fegato e piccolo intestino. Il DHEA-S è presente a concentrazioni superiori di 200 volte rispetto al DHEA e presenta un'emivita più lunga, che non risente in maniera evidente della variazione diurna.

Il progredire dell'età influenza la struttura temporale endocrina, tra cui il DHEA-S che può essere considerato come biomarker dell'età, dal momento che i suoi livelli diminuiscono gradualmente nei soggetti più anziani. I livelli plasmatici di DHEA-S aumentano in maniera evidente dal settimo anno di età, mentre calano gradualmente dopo i trent'anni.

Il DHEA è uno steroide a 19 atomi di carbonio con peso molecolare di 288 Kd ed emivita plasmatica di circa 1-3 ore. Il peso molecolare del DHEA-S è di 368,5 Kd e l'emivita è di circa 10-20 ore. Il DHEA viene prodotto a partire dal pregnenolone dall'enzima 17,20 desmolasi e metabolizzato in androstenedione o testosterone dalla 3 beta- o 17 beta-idrosteroido deidrogenasi rispettivamente. La idrosteroido solfatasi converte il DHEA in DHEA-S e la solfoidrolasi inverte questa reazione.

B. Applicazioni cliniche

Livelli più alti di DHEA-S si riscontrano nel plasma di pazienti con tumori surrenalici o iperplasia surrenalica congenita. Il DHEA-S può inoltre aumentare leggermente nelle pazienti con ovaie policistiche, contribuendo con la componente surrenalica alla virilizzazione che spesso accompagna questa condizione. I tumori HCG-secerntenti negli uomini possono portare ad un incremento della produzione di DHEA testicolare.

Il DHEA-S viene spesso testato insieme al testosterone libero come screening iniziale per l'iperandrogenismo nell'irsutismo. A volte il DHEA-S è l'unico ormone circolante che supera il livello normale e sembra che sia quello che più probabilmente si elevi durante le fasi iniziali dell'irsutismo rispetto alla maggior parte degli altri androgeni.

Il DHEA-S non è generalmente rilevabile in corso di insufficienza surrenalica o panipopituitarismo. Le concentrazioni sono leggermente diminuite durante la gravidanza e per uso di contraccettivi orali, mentre calano in maniera evidente dopo somministrazione di glucocorticoidi.

Basse concentrazioni circolanti sono presenti in corso di malattie debilitanti e nei pazienti con AIDS.

IV. PRINCIPIO DEL METODO

Una quantità definita di DHEA-S marcata con ¹²⁵I compete con il DHEA-S presente in calibratore e campioni per un numero definito di siti di un anticorpo adsorbito sulla superficie interna di provette di polistirene. Dopo 1 ore di incubazione a 37°C a bagnomaria, la reazione di competizione viene interrotta per aspirazione della miscela di reazione. Le provette vengono quindi lavate 2 volte con 2 ml di tampone di lavaggio diluito e aspirate. La concentrazione di DHEA-S nei campioni viene calcolata per interpolazione sulla curva calibratore.

V. REATTIVI FORNITI

Reattivi	Kit da 96 test	Codice colore	Volume di ricostituzione			
 Provette sensibilizzate con anticorpo anti DHEA-S	2 x 48	avorio	Pronte per l'uso			
<table border="1"><tr><td>Ag</td><td>¹²⁵I</td></tr></table> Marcato: DHEA-Smarcato con ¹²⁵ I (grado HPLC),) in tampone contenente albumina bovina e sodio azide (<0,1%)	Ag	¹²⁵ I	1 flacone 55 ml 450 kBq	rosso	Pronte per l'uso	
Ag	¹²⁵ I					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Calibratore zero in siero umano e timolo	CAL	0	1 flacone liofilizzati	giallo	Aggiungere 0,5 ml di acqua distillata	
CAL	0					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Calibratore 1-5 di DHEA-S, (le concentrazioni esatte degli calibratore sono riportate sulle etichette dei flaconi) , in plasma umano e timolo	CAL	N	5 flaconi liofilizzati	giallo	Aggiungere 0,5 ml di acqua distillata	
CAL	N					
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Tampone di lavaggio (TRIS-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 flacone 10 ml	bruno	Diluire 70 x con acqua distillata usando un agitatore magnetico
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Controlli: N = 1 o 2, in plasma umano e timolo Weitere Informationen finden Sie im Sicherheitsdatenblatt (MSDS).	CONTROL	N	2 flaconi liofilizzati	argento	Aggiungere 0,5 ml di acqua distillata	
CONTROL	N					

Note : Usare lo calibratore zero per diluire i campioni

VI. REATTIVI NON FORNITI

Il seguente materiale è richiesto per il dosaggio ma non è fornito nel kit.

- 1. Acqua distillata.
- 2. Pipette per dispensare 10 µl e 500 µl (Si raccomanda di utilizzare pipette accurate con puntale in plastica monouso).
- 3. Agitatore tipo vortex.
- 4. Agitatore magnetico.
- 5. Bagnomaria a 37°C
- 6. Pipetta a ripetizione automatica 5 ml per i lavaggi.
- 7. Sistema di aspirazione dei campioni (facoltativo).
- 8. Contatore gamma con finestra per ¹²⁵I (efficienza minima 70%)

VII. PREPARAZIONE DEI REATTIVI

- A. **Calibratori:** Ricostituire i calibratori con 0,5 ml di acqua distillata.
- B. **Controlli:** Ricostituire i controlli con 0,5 ml di acqua distillata.
- C. **Soluzione di lavoro del tampone di lavaggio:** Preparare la quantità necessaria di soluzione di lavoro del tampone di lavaggio aggiungendo 69 parti di acqua distillata ad una parte di tampone di lavaggio concentrato (70x). Usare un agitatore magnetico per rendere la soluzione omogenea. La soluzione di lavoro va scartata al termine della giornata.

VIII. CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI

- I reattivi non utilizzati sono stabili a 2-8°C fino alla data riportata su ciascuna etichetta.

- Dopo ricostituzione, calibratore e controlli sono stabili 1 settimana a 2-8°C e, suddivisi in aliquote a -20°C per periodi più lunghi. Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelo dei campioni.
- La soluzione di lavoro del tampone di lavaggio deve essere preparata fresca ogni volta e usata nello stesso giorno della preparazione.
- Dopo apertura del flacone, il marcato è stabile fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta, se conservato a 2-8°C nel flacone originale ben tappato.
- Alterazioni dell'aspetto fisico dei reattivi possono indicare una loro instabilità o deterioramento.

IX. RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

- Conservare i campioni di siero a 2-8°C.
- Se non si desidera eseguire il dosaggio entro 24 ore dal prelievo, si raccomanda di conservare i campioni a -20°C.
- Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelo dei campioni.

X. METODO DEL DOSAGGIO

- A. **Avvertenze generali**
Non usare il kit o suoi componenti oltre la data di scadenza. Non mescolare reattivi di lotti diversi. Prima dell'uso portare tutti i reattivi a temperatura ambiente (18-25°C). Mescolare delicatamente i campioni per inversione o rotazione. Per evitare cross-contaminazioni, cambiare il puntale della pipetta ogni volta che si usi un nuovo reattivo o campione. L'uso di pipette ben tarate e ripetibili o di sistemi di pipettamento automatici migliora la precisione del dosaggio. Rispettare i tempi di incubazione. Allestire una curva di taratura per ogni seduta analitica, in quanto non è possibile utilizzare per un dosaggio curve di taratura di sedute analitiche precedenti. Ogni tubo può essere utilizzato una sola volta.

- B. **Metodo del dosaggio**
 1. Numerare le provette sensibilizzate necessarie per dosare in duplicato ogni calibratore, campione o controllo. Numerare 2 provette non sensibilizzate per la determinazione dell'attività totale.
 2. Agitare brevemente su vortex calibratore, campioni e controlli. Dispensare 10 µl di calibratore, campioni e controlli nelle rispettive provette.
 3. Dispensare 500 µl di DHEA-S marcato con ¹²⁵I in tutte le provette, comprese quelle per l'attività totale.
 4. Scuotere gentilmente il portaprovette per liberare eventuali bolle d'aria intrappolate nel liquido contenuto nelle provette.
 5. Incubare 1 ore a 37°C a bagnomaria.
 6. Aspirare il liquido contenuto in tutte le provette, tranne in quelle per l'attività totale, facendo attenzione che il puntale dell'aspiratore raggiunga il fondo delle provette e che aspiri tutto il liquido.
 7. Lavare tutte le provette, tranne quelle per l'attività totale, con 2 ml di soluzione di lavoro di tampone di lavaggio, evitando di provocare la formazione di schiuma.
 8. Lavare tutte le provette, tranne quelle per l'attività totale, con 2 ml di soluzione di lavoro di tampone di lavaggio, evitando di provocare la formazione di schiuma.
 9. Lasciare decantare le provette in posizione verticale per due minuti circa e aspirare eventuali gocce di liquido residue.
 10. Contare tutte le provette per 1 minuto con il contatore gamma.

XI. CALCOLO DEI RISULTATI

- 1. Calcolare la media delle determinazioni in duplicato.
- 2. Calcolare il rapporto (rapporto di competizione) tra radioattività legata alle provette di calibratore 1-5, campioni e controlli (B) e la radioattività legata alle provette dello calibratore zero (B0).

$$B/B0 (\%) = \frac{\text{cpm (Calibratore, campioni o controlli)}}{\text{cpm (Zero Calibratore)}} \times 100$$

- 3. Ponendo in ordinata i rapporti di competizione. B/B0 (%) per ogni calibratore e in ascissa le rispettive concentrazioni di DHEA-S, tracciare la curva di taratura, scartare i valori palesemente discordanti.
- 4. È possibile utilizzare un sistema di interpolazione dati automatizzato. Con un sistema automatico di interpolazione dati, utilizzare la curva a 4 parametri.
- 5. Per interpolazione sulla curva di taratura dei rapporti di competizione di campioni e controlli, determinare le rispettive concentrazioni di DHEA-S.
- 6. Per ogni dosaggio determinare la capacità legante B0/T.

XII. CARATTERISTICHE TIPICHE

I sotto riportati sono forniti a titolo di esempio e non devono essere utilizzati per calcolare le concentrazioni di DHEA-S in campioni e controlli al posto della curva calibratore eseguita contemporaneamente.

DHEA-S-RIA-CT		cpm	B/Bo (%)
Attività totale		164710	
Calibratore	0,0 µg/dl	34266	100,0
	1,7 µg/dl	31393	91,6
	9,7 µg/dl	21411	62,5
	41,0 µg/dl	11078	32,3
	219,0 µg/dl	3398	9,9
	1090,0 µg/dl	877	2,6

Fattore di conversione:
Da µg/dl a µmol/l : x 0,0271
Da µmol/l a µg/dl : x 36,85

XIII. CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO

A. Sensibilità
La sensibilità, calcolata come concentrazione apparente di un campione con cpm pari alla media meno 2 deviazioni calibratore di 20 replicati dello calibratore zero, è risultata essere 1,23 µg/dl.

B. Specificità

Le percentuali di cross-reattività stimata rispetto alla concentrazione in grado di produrre un’inibizione al 50% sono rispettivamente:

Composto	Cross-Reattività (%)
DHEA-S	100,00
DHEA	< 0,05
DHEA-Glucuronide	< 0,05
Androstenediolo	< 0,05
Estrone-solfato	0,08
5α-Diidrotestosterone	< 0,05
Testosterone	< 0,05

Nota : Questa tabella mostra la cross-reattività relativa all’anti DHEA-S

C. Precisione

INTRA SAGGIO				INTER SAGGIO			
Siero	N	<X> ± SD (µg/dl)	CV (%)	Siero	N	<X> ± SD (µg/dl)	CV (%)
A B	20	32,1 ± 1,9	5,9	A B	12	30,8 ± 2,0	6,5
	20	107,4 ± 5,1	3,6		12	105,5 ± 6,5	6,5

SD : Deviazione Standard; CV: Coefficiente di Variazione

D. Accuratezza

TEST DI DILUIZIONE			
Campione	Diluizione	Concentrazione teorica (µg/dl)	Concentrazione misurata (µg/dl)
Siero 1	1/1	389,6	
	1/2	194,8	168,1
	1/4	97,4	92,3
	1/8	48,7	50,7
	1/16	24,3	27,1
Siero 2	1/1	85,0	
	1/2	42,5	38,3
	1/4	21,2	19,0
	1/8	10,6	10,6
	1/16	5,3	7,0

I campioni sono stati diluiti con calibratore zero.

TEST DI RECUPERO

Campio ne	DHEA-S aggiunto (µg/dl)	DHEA-S (µg/dl) teorico	DHEA-S (µg/dl) misurato	Recupero (%)
Siero	0	NA	26,0	NA
	25	51	59,7	117
	50	76	80,6	106
	100	126	128,1	101,6

Al momento non risulta disponibile uno calibratore di riferimento internazionale per questo parametro.

E. Tempo trascorso tra l’aggiunta dell’ultimo calibratore e il campione

Come mostrato nella seguente tabella, il dosaggio si mantiene accurato anche quando un campione viene aggiunto nelle provette sensibilizzate 30 minuti dopo l’aggiunta del calibratore.

TEMPO TRASCORSO

Serum (µg/dl)	0'	10'	20'	30'
Siero 1	30,8	33,8	31,5	31,2
Siero 2	98,5	113,5	118,2	102,5

XIV. CONTROLLO DI QUALITÀ INTERNO

- Se i risultati ottenuti dosando il Controllo 1 e il Controllo 2 non sono all’interno dei limiti riportati sull’etichetta dei flaconi, non è opportuno utilizzare i risultati ottenuti per i campioni, a meno che non si trovi una giustificazione soddisfacente.
- Ogni laboratorio può preparare un proprio pool di sieri da utilizzare come controllo, da conservare congelato in aliquote.
- I criteri di accettazione delle differenze tra i risultati in duplicato dei campioni devono basarsi sulla buona prassi di laboratorio.

XV. INTERVALLI DI RIFERIMENTO

Questi valori sono puramente indicativi, ciascun laboratorio potrà stabilire i propri intervalli normali.
Intervallo basati su 2,5% e 97,5% percentili.

Soggetti (gruppo età)	N	Media (µg/dl)	Intervallo
FEMMINE			
< 15	15	129,7	37,8 - 264,5
15-19	19	276,7	117,3 - 531,0
20-24	16	244,0	118,7 - 428,9
25-29	33	197,5	70,2 - 413,4
30-34	27	175,1	75,2 - 398,7
35-39	23	162,0	63,3 - 291,4
40-44	19	144,4	37,3 - 255,8
45-49	13	109,8	20,9 - 198,0
50-54	16	117,0	26,8 - 375,4
55-59	13	102,9	34,5 - 178,1
60-64	10	92,8	24,6 - 182,3
> 65	15	114,3	6,3 - 377,0
MASCHI			
< 15	14	138,9	34,9 – 284,1
15 – 50	42	262,2	80,5 – 479,4
> 50	37	177,6	51,8 – 470,7

XVI. PRECAUZIONI PER L'USO

Sicurezza

Il kit è solo per uso diagnostico in vitro.
Il kit contiene ¹²⁵I (emivita: 60 giorni) emettente raggi X (28 keV) e γ (35.5 keV) ionizzanti.
L'acquisto, la detenzione, l'utilizzo e il trasporto di materiale radioattivo sono soggetti a regolamentazione locale. In nessun caso il prodotto può essere somministrato ad esseri umani o animali.
Usare sempre guanti e camici da laboratorio quando si manipola materiale radioattivo. Le sostanze radioattive devono essere conservate in propri contenitori in appositi locali che devono essere interdetti alle persone non autorizzate. Deve essere tenuto un registro di carico e scarico del materiale radioattivo. Il materiale di laboratorio e la vetreria deve essere dedicato all'uso di isotopi specifici per evitare cross-contaminazioni.
In caso di contaminazione o dispersione di materiale radioattivo, fare riferimento alle norme locali di radioprotezione. I rifiuti radioattivi devono essere smaltiti secondo le norme locali di radioprotezione. Lo scrupoloso rispetto delle norme per l'uso di sostanze radioattive fornisce una protezione adeguata agli utilizzatori. I reattivi di origine umana presenti nel kit sono stati dosati con metodi approvati da organismi di controllo europei o da FDA e si sono rivelati negativi per HBs Ag, anti HCV, anti HIV1 e anti HIV2. Non sono disponibili metodi in grado di offrire la certezza assoluta che derivati da sangue umano non possano provocare epatiti, AIDS o trasmettere altre infezioni. Manipolare questi reattivi o i campioni di siero o plasma secondo le procedure di sicurezza vigenti.
Tutti i prodotti di origine animale o loro derivati provengono da animali sani. I componenti di origine bovina provengono da paesi dove non sono stati segnalati casi di BSE. E' comunque necessario considerare i prodotti di origine animale come potenziali fonti di infezioni.
Evitare ogni contatto dell'epidermide con i reattivi contenenti sodio azide come conservante. La sodio azide può reagire con piombo rame o ottone presenti nelle tubature di scarico per formare metallo-azidi esplosive. Smaltire questi reattivi facendo scorrere abbondante acqua negli scarichi.
Nei luoghi dove si usano sostanze radioattive non è consentito consumare cibi o bevande, fumare o usare cosmetici. Non pipettare i reattivi con pipette a bocca.
Per ulteriori informazioni, consultare la scheda di sicurezza (MSDS)

XVII. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. Orentreich N, BrindJ, Rizer R, Vogelma n J : Age changes and sex differences in serum dehydroepiandrosterone concentrations throughout adulthood. **J Clin Endocrinol Metab** 59:551-555, 1984.

2. Orentreich N, Brind J, Vogelma n J, Andres R, Baldwin H. : Long-term longitudinal measurements of plasma dehydroepiandrosterone sulphate in normal men. **J Clin Endocrinol Metab** 75:1002-1004, 1992.

3. Abbasi A, Drinka P, Mattson D, Rudman D : Low circulating levels of insulin-like growth factors and testosterone in chronically institutionalized elderly men. **J Am Geriatr Soc** 41:975-981, 1993.

4. Belanger A, Candas B, Dupont A et al. : Changes in serum concentrations of conjugated and unconjugated steroid in 40 to 80 year old men. **J Clin Endocrinol Metab** 79:1086-1090, 1994.

5. Borst S, Millard W, Lowenthal D : Growth hormone, exercise, and aging : the future of therapy for the frail elderly. **J Am Geriatr Soc** 42:528-535, 1994.

6. Morales A, Nolan J, Nelson J, Yen S : Effects of replacement dose of dehydroepiandrosterone in men and women of advancing age. **J Clin Endocrinol Metab** 78:1360-1367, 1994.

7. Tenover J : Androgen administration to aging men. **Clin Andol** 23:877-892, 1994.

8. Rosenfeld R, Rosenberg B, Fukushima D, Heuman L : 24 hour secretory pattern of dehydroepiandrosterone and dehydroandrosterone sulphate. **J Clin Endocrinol** 40:850-855, 1975.

9. Liu C, Laughlin G, Fischer U, Yen S : Marked attenuation of ultradian and circadian rhythms of dehydroepiandrosterone in postmenopausal women : evidence for a reduced 17,20-desmolase enzymatic activity. **J Clin Endocrinol Metab** 71:900-906, 1990.

10. Thomas G, Frenoy N, Legrain S, Sebag-Lanoe R, Baulieu E, Debuire B : Serum dehydroepiandrosterone sulphate levels as an individual marker. **J Clin Endocrinol Metab** 79:1273-1276, 1994.

11. Tissandier O, Peres G, Fiet J, Piette F : Testosterone, dehydroepiandrosterone, insulin-like growth factor 1, and insulin in sedentary and physically trained aged men. **Eur J Appl Physiol** 85:177-184; 2001.

12. Guagnano MT, Del Ponte A, Manigrasso MR, Merlitti D, Pace-Palitti V, Sensis S : Age-related circadian rhythm of DHEA-S plasma levels in male subjects. **Biological Rhythm Research** 32,3:323-331, 2001.

13. Derksen J, Nagesser S.K, Meinders A.E, Haak H.R, Van De Velde C.J.H : Identification of virilizing adrenal tumors in hirsute women. **New Engl J Med** 331(15):968-973, 1994.

14. Lobo R.A, Paul W.L, Goebelsmann U : dehydroepiandrosterone sulphate as an indicator of adrenal androgen function. **Obstet Gynecol** 57:69-73, 1981.

15. Cacciari E : Gonadal and adrenal secretion of dehydroepiandrosterone sulphate in prepubertal and pubertal subjects. **J Endocrinol Invest** 4:197-202, 1981.

16. Ebeling P, Koivisto V.A : Physiological importance of dehydroepiandrosterone. **Lancet** 343:1479-1481, 1994.

XVIII. SCHEMA DEL DOSAGGIO

	Attività totale µl	Calibratore µl	Campioni Controlli µl
Calibratore (0 - 5) Campioni, controlli Marcato	- - 500	10 - 500	- 10 500
Incubazione	1 ore a 37°C a bagnomaria.		
Separazione Soluzione di lavoro del tampone di lavaggio Separazione Soluzione di lavoro del tampone di lavaggio Separazione	Aspirare 2 ml Aspirare 2 ml Aspirare gentilmente		
Conteggio	Contare le provette per 1 minuto		

Leer el protocolo completo antes de usar.

DHEA-S-RIA-CT

I. INSTRUCCIONES DE USO

Radioinmunoensayo para la determinación cuantitativa in vitro de Sulfato de 5-Androsten-3 β -OL-17-Diona humana (Sulfato de Dehidroepiandrosterona o Sulfato de DHEA) en suero.

II. INFORMACIÓN GENERAL

- A. **Nombre:** DIAsource DHEA-S-RIA-CT Kit
- B. **Número de Catálogo:** KIP0481 : 96 tests
- C. **Fabricado por:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Para cuestiones técnicas y información sobre pedidos contactar :

Tel : +32 (0)10 84.99.11

Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. INFORMACIÓN CLÍNICA

A. Actividad biológica

La dehidroepiandrosterona (DHEA) y su forma sulfatada, el DHEA-S, son las sustancias esteroideas más abundantes producidas por las glándulas suprarrenales. La glándula suprarrenal es la única fuente de dichos esteroideos en la mujer, pero en el hombre los testículos contribuyen con la producción de pequeñas cantidades. La formación de DHEA es estimulada por la ACTH, produciendo una variación diurna significativa en las concentraciones séricas. La DHEA es convertida rápidamente en DHEA-S por una enzima presente en las suprarrenales, hígado e intestino delgado. El DHEA-S se encuentra presente en concentraciones 200 veces superiores a la DHEA y tiene un periodo de vida más largo, lo que disminuye notablemente su patrón de variación diurna.

El envejecimiento influye en la estructura temporal endocrina, incluyendo el DHEA-S que puede considerarse un marcador biológico del envejecimiento, ya que sus niveles disminuyen gradualmente en los sujetos de edad más avanzada. Los niveles plasmáticos de DHEA-S aumentan de forma consistente aproximadamente desde el séptimo año de la vida y, a partir de ahí, disminuyen gradualmente hasta la tercera década de la vida.

La DHEA es un esteroide con 19 átomos de carbono con un peso molecular de 288 Kd y una vida media en plasma de aproximadamente 1 a 3 horas. El peso molecular del DHEA-S es de 368,5 Kd y su vida media es aproximadamente de 10 a 20 horas. La DHEA es formada a partir de la pregnenolona por la enzima 17, 20 desmolasa y es metabolizada a androstendiona o a testosterona por la 3 β ó la 17 β -hidrosteroides-deshidrogenasa, respectivamente. La hidrosteroides-sulfatasa convierte la DHEA a DHEA-S y la sulfhidrolasa invierte esta reacción.

B. Aplicaciones clínicas

Los niveles plasmáticos de DHEA-S se encuentran aumentados en pacientes con tumores suprarrenales o con hiperprasia suprarrenal congénita. El DHEA-S también puede estar ligeramente elevado en enfermos con ovario poliquístico, lo que apoya la existencia de un componente suprarrenal en la virilización observada en esta enfermedad. Los tumores productores de GCH (Gonadotropina Coriónica Humana) en el varón pueden conducir a la producción elevada de DHEA.

A menudo se han estudiado los niveles del DHEA-S junto a los de la testosterona libre en la investigación inicial del hiperandrogenismo en el hirsutismo. A veces el DHEA-S constituye la única hormona circulante que presenta un nivel superior al normal y, aparentemente, es más probable encontrarla elevada durante las primeras fases del hirsutismo que cualquier otro andrógeno.

El DHEA-S normalmente no se detecta en la insuficiencia suprarrenal o panhipopituitarismo. Normalmente su concentración disminuye ligeramente en el embarazo y también con el uso de anticonceptivos orales, y disminuye notablemente tras la administración de glucocorticoides.

Se observan bajos niveles circulantes en casos de enfermedad grave, así como en enfermos de SIDA.

IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

Una cantidad fija de DHEA-S marcada con I¹²⁵ compete con el DHEA-S a medir, presente en la muestra ó en el calibrador, por los puntos de unión del anticuerpo inmovilizado en las paredes de un tubo de poliestireno. Después de 1 hora de incubación a 37°C en baño de agua, una aspiración termina con la reacción de competición. A continuación los tubos se lavan dos veces con 2 ml de solución de trabajo de lavado y se aspiran. Se dibuja la curva de calibración y las concentraciones de DHEA-S de las muestras se determinan por interpolación de la dosis en la curva de calibración.

V. REACTIVOS SUMINISTRADOS

Reactivos	Kit 96 test	Código de Color	Reconstitución
 Tubos recubiertos con anti DHEA-S	2 x 48	Marfil	Listo para uso
Ag I¹²⁵I TRAZADOR: DHEA-S marcado con I ¹²⁵ (grado HPLC) en tampón con albúmina bovina y azida (<0,1%)	1 vial 55 ml 450 kBq	rojo	Listo para uso
CAL 0 Calibrador cero en suero humano con thymol	1 vial liofilizados	amarillo	Añadir 0,5 ml de agua destilada
CAL N Calibradores DHEA-S - N = 1 al 5 (mirar los valores exactos en las etiquetas) en plasma humano con thymol	5 viales lío­filizados	amarillo	Añadir 0,5 ml de agua destilada
WASH SOLN CONC Solución de lavado (TRIS-HCl)	1 vial 10 ml	marrón	Diluir 70 x con agua destilada (utilizar agitador magnético)
CONTROL N Controles - N = 1 o 2 en plasma humano con thymol y gentamicina Per ulteriori informazioni, consultare la scheda di sicurezza (MSDS)	2 viales lío­filizados	plateado	Añadir 0,5 ml de agua destilada

Nota: Para diluciones de muestras utilizar calibrador cero.

VI. MATERIAL NO SUMINISTRADO

- El material mencionado a continuación es necesario y no esta incluido en el kit
1. Agua destilada
 2. Pipetas de 10 µl y 500 µl (Se recomienda el uso de pipetas precisas con puntas desechables de plástico)
 3. Vortex
 4. Agitador magnético
 5. Baño de agua a 37°C
 6. Jeringa automática 5 ml (tipo Cornwall) para el lavado
 7. Sistema de aspiración (opcional)
 8. Contador de radiaciones gamma para medir I¹²⁵ (mínima eficiencia 70%)

VII. PREPARACIÓN REACTIVOS

- A. **Calibradores:** Reconstituir los calibradores con 0,5 ml de agua destilada.
- B. **Controles:** Reconstituir los controles con 0,5 ml de agua destilada.
- C. **Solución de lavado de trabajo:** Preparar el volumen necesario de Solución de lavado de trabajo mezclando 69 partes de agua destilada por 1 parte de Solución de lavado (70x). Utilizar un agitador magnético para homogeneizar. Desechar la solución de lavado de trabajo no utilizada al final del día.

VIII. ALMACENAJE Y CADUCIDADES DE LOS REACTIVOS

- Antes de abrir ó reconstituir todos los componentes de los kits son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, si se guardan a 2-8°C.
- Después de su reconstitución los calibradores y controles son estables durante una semana a 2-8°C. Para periodos más largos, alícuotar y guardar a –20°C. Evitar congelar y descongelar sucesivamente.
- La solución de lavado de trabajo recién preparada solo debe utilizarse en el mismo día.
- Después del primer uso, el trazador es estable hasta la fecha de caducidad, si se guarda en el vial original cerrado a 2-8°C.
- Las alteraciones de los reactivos en el aspecto físico pueden indicar inestabilidad ó deterioro.

IX. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

- Las muestras de suero deben ser guardadas a 2-8°C.
- Si el ensayo no se realiza en 24 hrs., almacenar las muestras a –20°.
- Evitar congelar y descongelar sucesivamente.

X. PROTOCOLO

- A. **Notas de manejo**
No utilizar el kit ó componentes después de la fecha de caducidad. No mezclar reactivos de diferente numero de lote. Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente (18-25°C) antes de su uso.
Agitar municiosamente todos los reactivos y muestras, agitándolos o girándolos suavemente. Con el fin de evitar ninguna contaminación utilizar puntas de pipetas desechables y limpias para la adición de cada reactivo y muestra.
El uso de pipetas de precisión ó equipamiento de dispensación automática mejorara la precisión. Respetar los tiempos de incubación.
Preparar la curva de calibración en cada ensayo, no utilizar los datos de un ensayo previo.
Cada tubo solo se puede usar una vez.

- B. **Protocolo**
 1. Marcar los tubos recubiertos por duplicado para cada unos de los estándares, muestras y controles. Para la determinación de las Cuentas Totales, marcar 2 tubos normales.
 2. Agitar brevemente los calibradores, muestras y controles y dispensar 10 µl de cada uno en sus respectivos tubos.
 3. Dispensar 500 µl de DHEA-S marcado con I¹²⁵ en cada tubo, incluyendo los tubos no recubiertos a las Cuentas Totales.
 4. Agitar suavemente la gradilla de tubos para soltar cualquier burbuja cautiva de las paredes de los tubos.
 5. Incubar durante 1 hora a 37°C en baño de agua.
 6. Aspirar el contenido de cada tubo (excepto los de Cuentas Totales). Asegurarse que la punta de la pipeta de aspiración toca el fondo del tubo con el fin de aspirar todo el líquido.
 7. Lavar los tubos con 2 ml de Solución de lavado de trabajo (excepto los de Cuentas Totales) y aspirar. Evitar la formación de espuma durante la adición de la Solución de lavado
 8. Lavar los tubos con 2 ml de Solución de lavado de trabajo (excepto los de Cuentas Totales) y aspirar. Evitar la formación de espuma durante la adición de la Solución de lavado
 9. Dejar los tubos en posición inversa durante 2 minutos y aspirar el liquido restante.
 10. Medir la actividad de cada tubo durante 60 segundos en un Contador Gamma.

XI. CALCULO DE RESULTADOS

1. Calcular la media de los duplicados.
2. Calcular la radiactividad enlazada como un porcentaje de la unión con respecto al calibrador cero (0) de acuerdo con la siguiente formula:

$$B/B0\ (\%) = \frac{\text{Cuentas (Calibrado r ó muestra)}}{\text{Cuentas (Calibrador Cero)}} \times 100$$

3. Representar los valores de (B/B0%) de cada calibrador frente a las contraciones del DHEA-S de cada calibrador, rechazando los extremos claros.
4. Métodos computarizados de computación de resultados pueden ser utilizados para la construcción de la curva de calibración. Si se utiliza un sistema automático de calculo de resultados, se recomienda usar la representación gráfica “ 4 parámetros”.

5. Por interpolación de los valores (B/B%) de las muestras, se determinan los valores de las concentraciones de las mismas desde la curva de calibración.
6. El porcentaje total de enlace del trazador en ausencia de DHEA-S no marcado (B0/T) debe ser calculado en cada ensayo.

XII. EJEMPLO DE RESULTADOS

Los datos mostrados a continuación sirven como ejemplo y nunca deberán ser usados como una calibración real.

DHEA-S-RIA-CT		cpm	B/Bo (%)
Cuentas Totales		164710	
Calibrador	0,0 µg/dl	34266	100,0
	1,7 µg/dl	31393	91,6
	9,7 µg/dl	21411	62,5
	41,0 µg/dl	11078	32,3
	219,0 µg/dl	3398	9,9
	1090,0 µg/dl	877	2,6

Factor de conversión:

De µg/dl a µmol/l: x0,0271

De µmol/l a µg/dl: x 36,85

XIII. REALIZACIÓN Y LIMITACIONES

A. Limite de detección

Veinte calibradores cero fueron medidos en una curva con otros calibradores.

El limite de detección, definido como la concentración aparente resultante de dos desviaciones estándares debajo de la media de enlace del calibrador cero, fue de 1,23 µg/dl.

B. Especificidad

El porcentaje de reacción cruzada estimada por la comparación de la concentración (indicando una inhibición de 50 %) es respectivamente :

Componente	Reacción-cruzada (%)
DHEA-S	100,00
DHEA	< 0,05
DHEA-Glucurónido	< 0,05
Androstenediol	< 0,05
Sulfato de estrona	0,08
5α-Dihidrottestosterona	< 0,05
Testosterona	< 0,05

Nota: Esta tabla presenta la reacción cruzada para el anti DHEA-S

C. Precision

PRECISION INTRA-ENSAYO				PRECISION INTER-ENSAYO			
Suero	N	<X> ± SD (µg/dl)	CV (%)	Suero	N	<X> ± SD (µg/dl)	CV (%)
A	20	32,1 ± 1,9	5,9	A	12	30,8 ± 2,0	6,5
B	20	107,4 ± 5,1	3,6	B	12	105,5 ± 6,5	6,5

SD : Desviación Estándar; CV: Coeficiente de Variación

D. Exactitud

TEST DILUCIÓN			
Muestra	Dilución	Concent. Teórica (µg/dl)	Concent. Medida (µg/dl)
Suero 1	1/1	389,6	
	1/2	194,8	168,1
	1/4	97,4	92,3
	1/8	48,7	50,7
	1/16	24,3	27,1
Suero 2	1/1	85,0	
	1/2	42,5	38,3
	1/4	21,2	19,0
	1/8	10,6	10,6
	1/16	5,3	7,0

Las muestras fueron diluidas con el Calibrador cero.

TEST DE RECUPERACIÓN

Muestra	DHEA-S añadido (µg/dl)	DHEA-S (µg/dl) teórica	DHEA-S (µg/dl) medida	Recuperado (%)
Suero	0	NA	26,0	NA
	25	51	59,7	117
	50	76	80,6	106
	100	126	128,1	101,6

De acuerdo con nuestros conocimientos, no existe ninguna preparación de referencia internacional de este parámetro.

E. Tiempo de espera entre la dispensación del último calibrador y la de la muestra

Como se muestra a continuación la precisión del ensayo se mantiene incluso en el caso de dispensar la muestra 30 minutos después de haberse adicionado el calibrador a los tubos cubiertos.

TIEMPO DE ESPERA

Suero (µg/dl)	0'	10'	20'	30'
Suero 1	30,8	33,8	31,5	31,2
Suero 2	98,5	113,5	118,2	102,5

XIV. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

- Si los resultados obtenidos para el Control 1 y/o Control 2 no están dentro del rango especificado en la etiqueta del vial, los resultados obtenidos no podrán ser utilizados a no ser que se pueda dar una explicación convincente de dicha discrepancia
- Si es conveniente, - cada laboratorio puede utilizar sus propios pools de controles, lo cuales se guardan en alícuotas congeladas.
- Los criterios de aceptación de la diferencia entre los resultados in duplo de las muestras se apoyan en las prácticas de laboratorio corrientes.

XV. INTERVALOS DE REFERENCIA

Estos valores solamente sirven de pauta; cada laboratorio tiene que establecer sus propios valores normales.

Alcance basados en percentilos de 2.5% & 97.5%

Sujetos (grupo de edad)	N	Media(µg/dl)	Alcance
MUJERES			
< 15	15	129,7	37,8 - 264,5
15-19	19	276,7	117,3 - 531,0
20-24	16	244,0	118,7 - 428,9
25-29	33	197,5	70,2 - 413,4
30-34	27	175,1	75,2 - 398,7
35-39	23	162,0	63,3 - 291,4
40-44	19	144,4	37,3 - 255,8
45-49	13	109,8	20,9 - 198,0
50-54	16	117,0	26,8 - 375,4
55-59	13	102,9	34,5 - 178,1
60-64	10	92,8	24,6 - 182,3
> 65	15	114,3	6,3 - 377,0
HOMBRES			
< 15	14	138,9	34,9 – 284,1
15 – 50	42	262,2	80,5 – 479,4
> 50	37	177,6	51,8 – 470,7

XVI. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Seguridad

Para uso solo en diagnóstico in vitro.
Este kit contiene I¹²⁵ (vida media : 60 días) emisor de rayos X (28 keV) y de rayos γ (35.5 keV) ionizantes.
Este producto radiactivo solo puede ser manejado y utilizado por personas autorizadas; la compra, almacenaje, uso y cambio de productos radiactivos están sujetos a la legislación del país del usuario. En ningún caso el producto deberá ser suministrado a humanos y animales.
Todo el manejo de producto radiactivo se hará en una área señalizada, diferente de la de paso regular. Deberá de utilizarse un libro de registros de productos radiactivos utilizados. El material de laboratorio, vidrio que podría estar contaminado radiactivamente deberá de descontaminarse para evitar la contaminación con otros isótopos.
Cualquier derramamiento radiactivo deberá ser limpiado de inmediato de acuerdo con los procedimientos de seguridad. Los desperdicios radiactivos deberán ser almacenados de acuerdo con las regulaciones y normativas vigentes de la legislación a la cual pertenezca el laboratorio. El ajustarse a las normas básicas de seguridad radiológica facilita una protección adecuada.
Los componentes de sangre humana utilizados en este kit han sido testados por métodos aprobados por la CEE y/o la FDA dando negativo a HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 y 2. No se conoce ningún método que asegure que los derivados de la sangre humana no transmitan hepatitis, SIDA ó otras infecciones. Por lo tanto el manejo de los reactivos y muestras se hará de acuerdo con los procedimientos de seguridad locales.
Todos los productos animales y derivados han sido obtenidos a partir de animales sanos. Componentes bovinos originales de países donde BSE no ha sido informado. Sin embargo, los componentes conteniendo sustancias animales deberán ser consideradas como potencialmente infecciosas.
Evitar cualquier contacto de los reactivos con la piel (azida sódica como conservante). La azida en este kit puede reaccionar con el plomo y cobre de las cañerías y producir azidas metálicas altamente explosivas. Durante el proceso de lavado, hacer circular mucha cantidad de agua por el sumidero para evitar el almacenamiento de la azida.
No fumar, beber, comer ó utilizar cosméticos en el área de trabajo. No pipetear con la boca. Utilizar ropa de protección y guantes.
Para obtener más información, consulte la Hoja de datos de seguridad del material (MSDS)

XVII. BIBLIOGRAFIA

1. Orentreich N, BrindJ, Rizer R, Vogelman J : **Age changes and sex differences in serum dehydroepiandrosterone sulphate concentrations throughout adulthood.** J Clin Endocrinol Metab 59:551-555, 1984.

2. Orentreich N, Brind J, Vogelman J, Andres R, Baldwin H. : **Long-term longitudinal measurements of plasma dehydroepiandrosterone sulphate in normal men.** J Clin Endocrinol Metab 75:1002-1004, 1992.

3. Abbasi A, Drinka P, Mattson D, Rudman D : **Low circulating levels of insulin-like growth factors and testosterone in chronically institutionalized elderly men.** J Am Geriatr Soc 41:975-981, 1993.

4. Belanger A, Candas B, Dupont A et al. : **Changes in serum concentrations of conjugated and unconjugated steroid in 40 to 80 year old men.** J Clin Endocrinol Metab 79:1086-1090, 1994.

5. Borst S, Millard W, Lowenthal D : **Growth hormone, exercise, and aging : the future of therapy for the frail elderly.** J Am Geriatr Soc 42:528-535, 1994.

6. Morales A, Nolan J, Nelson J, Yen S : **Effects of replacement dose of dehydroepiandrosterone in men and women of advancing age.** J Clin Endocrinol Metab 78:1360-1367, 1994.

7. Tenover J : **Androgen administration to aging men.** Clin Andol 23:877-892, 1994.

8. Rosenfeld R, Rosenberg B, Fukushima D, Heuman L : **24 hour secretory pattern of dehydroepiandrosterone and dehydroandrosterone sulphate.** J Clin Endocrinol 40:850-855, 1975.

9. Liu C, Laughlin G, Fischer U, Yen S : **Marked attenuation of ultradian and circadian rhythms of dehydroepiandrosterone in postmenopausal women : evidence for a reduced 17,20-desmolase enzymatic activity.** J Clin Endocrinol Metab 71:900-906, 1990.

10. Thomas G, Frenoy N, Legrain S, Sebag-Lanoe R, Baulieu E, Debuire B : **Serum dehydroepiandrosterone sulphate levels as an individual marker.** J Clin Endocrinol Metab 79:1273-1276, 1994.

11. Tissandier O, Peres G, Fiet J, Piette F : **Testosterone, dehydroepiandrosterone, insulin-like growth factor 1, and insulin in sedentary and physically trained aged men.** Eur J Appl Physiol 85:177-184; 2001.

12. Guagnano MT, Del Ponte A, Manigrasso MR, Merlitti D, Pace-Palitti V, Sensis S : **Age-related circadian rhythm of DHEA-S plasma levels in male subjects.** Biological Rhythm Research 32,3:323-331, 2001.

13. Derksen J, Nagesser S.K, Meinders A.E, Haak H.R, Van De Velde C.J.H : **Identification of virilizing adrenal tumors in hirsute women.** New Engl J Med 331(15):968-973, 1994.

14. Lobo R.A, Paul W.L, Goebelsmann U : **dehydroepiandrosterone sulphate as an indicator of adrenal androgen function.** Obstet Gynecol 57:69-73, 1981.

15. Cacciari E : **Gonadal and adrenal secretion of dehydroepiandrosterone sulphate in prepubertal and pubertal subjects.** J Endocrinol Invest 4:197-202, 1981.

16. Ebeling P, Koivisto V.A : **Physiological importance of dehydroepiandrosterone.** Lancet 343:1479-1481, 1994.

XVIII.RESUMEN DEL PROTOCOLO

	CUENTAS TOTALES (µl)	CALIBRA DORES (µl)	MUESTRA(S) CONTROL(S) (µl)
Calibradores (0 al 5)	-	10	-
Muestras, controles	-	-	10
Trazador	500	500	500
Incubación	1 hora a 37°C en baño de agua.		
Separación	-	aspirar	
Solución de lavado de trabajo	-	2,0 ml	
Separación	-	aspirar	
Solución de lavado de trabajo	-	2,0 ml	
Separación		Aspirar suavemente	
Contaje	Contar los tubos durante 60 segundos		



Leia todo o protocolo antes de utilizar.

DHEA-S-RIA-CT

I. UTILIZAÇÃO PREVISTA

Radioimunoensaio para adeterminação quantitativa *in vitro* do 5-Androsten-3 β -OL-17-Dione Sulfato (Deidroepiandrosterona Sulfato ou DHEA Sulfato) humano no soro.

II. INFORMAÇÕES GERAIS

- A. **Nome do proprietário :** DIAsource DHEA-S-RIA-CT
- B. **Número do catálogo :** KIP0481 : 96 testes
- C. **Produzido por :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Bélgica.

Para obter informações sobre aquisição ou assistência técnica , contacte :
Bélgica Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.91
Ou o representante local

III. SIGNIFICADO CLÍNICO

A. Atividade Biológica

Deidroepiandrosterona (DHEA) e sua forma sulfatada, DHEA-S, são os esteróides mais abundantes produtos da glândula adrenal. A adrenal é a principal fonte destes esteróides em mulheres, mas em homens também tem uma pequena contribuição para os testes. A formação de DHEA é estimulada pela ACTH produzindo uma variação diurna significativa nas concentrações de soro. DHEA é rapidamente convertida em DHEA-S pela enzima presente na adrenal, fígado e intestino delgado. DHEA-S está presente em concentrações 200x maior que DHEA e tem uma meia-vida maior, que remove largamente as variações diurnas.

A influência da idade na estrutura temporal endócrina, incluindo DHEA-S a qual pode ser considerada como marcador biológico de idade, desde que seus níveis decresçam gradualmente em pessoas mais velhas. Níveis plasmáticos de DHEA-S aumentam significativamente por volta dos dezessete anos e, então declinam gradualmente após a terceira idade.

DHEA é um esteróide carbono 19 com peso molecular de 288 Kd e meia vida plasmática em torno de 1-3 horas. O peso molecular de DHEA-S é 368,5 Kd e a meia-vida em torno de 10-20 horas. DHEA é formado de pregnenolona pela enzima 17,20 desmolase e metabolizada para androstenediona ou testosterona por 3 beta- ou 17 beta-hidrosteróide dehidrogenase, respectivamente. Hidrosteróide sulfatase converte DHEA em DHEA-S e a sulfohidrolase reverte esta reação.

B. Aplicações Clínicas

Níveis aumentados de DHEA-S são encontrados no plasma de pacientes com tumores adrenais ou hiperplasia congênita da adrenal. DHEA-S pode estar um pouco elevado em pacientes com ovários policísticos, auxiliando o componente da adrenal para virilização visto nestas condições. A produção de tumores HCG em homens pode levar ao aumento testicular da produção de DHEA.

DHEA-S é muitas vezes analisada em conjunto com a testosterona livre como um screen inicial para hiperandrogenismo em hirsutismo. Algumas vezes a DHEA-S é o único hormônio circulando em níveis acima do normal, e é aparentemente mais elevado durante os estágios iniciais de hirsutismo que os outros andrógenos.

DHEA-S é usualmente indetectável com insuficiência adrenal ou panipopituitarismo. Concentrações são ligeiramente diminuídas na gravidez e com o uso de contraceptivos orais e fortemente diminuídos na administração de glicocorticóides.

Concentrações baixas circulando são vistas em pacientes com doenças severas e pacientes com AIDS.

IV. PRINCÍPIO DO MÉTODO

Uma quantidade fixa DHEA-S marcado com ¹²⁵I compete com o DHEA-S a ser medido, que esteja presente na amostra ou no calibrador, para uma quantidade fixa de locais de anticorpo, que é imobilizado nas paredes dos tubos de poliestireno. Após uma incubação de 1 hora a 37°C em banho maria, a reacção de competição termina com a operação de aspiração. Os tubos são então lavados duas vezes com 2 ml de solução trabalho de lavagem e aspirados. Traça-se uma curva de calibração e as concentrações de DHEA-S nas amostras são determinadas por interpolação da dose a partir da curva de calibração.

V. REAGENTES FORNECIDOS

Reagentes	Kit 96 Testes	Código de cor	Reconstituição			
 Tubos revestidos com anti DHEA-S	2 x 48	marfim	Pronto para utilizar			
<table border="1"><tr><td>Ag</td><td>¹²⁵I</td></tr></table> Marcador: DHEA-S marcado com ¹²⁵ I (grau HPLC) em tampão com albumina bovina e azida (<0,1%)	Ag	¹²⁵ I	1 recipiente 55ml 450 kBq	vermelho	Pronto para utilizar	
Ag	¹²⁵ I					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Calibrador Zero no soro humano, timol	CAL	0	1 recipiente liofilizado	amarelo	Adicione 0,5 ml de água destilada	
CAL	0					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Calibradores DHEA-S - N = 1 para 5 (ver os valores exactos nos rótulos do recipiente) no plasma humano, timol	CAL	N	5 recipientes liofilizados	amarelo	Adicione 0,5 ml de água destilada	
CAL	N					
<table border="1"><tr><td>WAS</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Solução de lavagem (TRIS-HCl)	WAS	SOLN	CONC	1 recipiente 10 ml	castanho	Dilua 70 x com água destilada (use um agitador magnético).
WAS	SOLN	CONC				
<table border="1"><tr><td>CONTR</td><td>N</td></tr></table> Controlos - N = 1 ou 2 No plasma humano, timol (ver os valores exactos nos rótulos do recipiente)	CONTR	N	2 recipientes liofilizados	prateado	Adicione 0,5 ml de água destilada	
CONTR	N					

Note : Use o calibrador zero para diluições de amostras.

VI. MATERIAL NÃO FORNECIDO

O seguinte material é necessário, mas não fornecido com o kit:

- 1. Água destilada
- 2. Pipetas automáticas: 10 µl e 500 µl (recomenda-se a utilização de pipetas precisas, com pontas descartáveis)
- 3. Misturador de vortex
- 4. Agitador magnético
- 5. Banho maria 37°C
- 6. Pipeta automática de 5 ml para lavagem (tipo Cornwall)
- 7. Sistema de aspiração (opcional)
- 8. Qualquer contador gamma capaz de medir ¹²⁵I pode ser utilizado (min alcance de 70%).

VII. PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

- A. **Calibradores** : Reconstitua os calibradores com 0,5 ml de água destilada.
- B. **Controlos** : Reconstitua os controlos com 0,5 ml de água destilada.
- C. **Solução de lavagem de trabalho** : Prepare um volume adequado de Solução de lavagem de trabalho ao adicionar 69 volumes de água destilada para 1 volume de solução de lavagem (70x). Use um agitador magnético para homogeneizar. Rejeite a solução não utilizada no final do dia.

VIII. ARMAZENAMENTO E PRAZO DE VALIDADE DOS REAGENTES

- Antes de abrir e reconstituir, todos os componentes do kit são estáveis até ao final do prazo de validade, indicado no rótulo desde que mantido entre 2 to 8°C.
- Após reconstituição, os calibradores e os controlos são estáveis durante 1 semana entre 2 a 8°C. Durante períodos de armazenamento mais longos, devem ser feitas alíquotas e mantidas a -20°C por no máximo 3 meses. Evite sucessivos congelamentos e descongelamentos.
- A solução de lavagem de trabalho deve ser feita e utilizada no mesmo dia.
- Depois da 1ª utilização o marcador é estável até final do prazo de validade,

desde que mantido no recipiente original, bem fechado entre 2 a 8°C.

- Alterações no aspecto dos reagentes do kit podem indicar instabilidade ou degradação.

IX. RECOLHA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

- Amostras de soro devem ser mantidas entre 2-8°C.
- Se a análise não for realizada em 24 hrs, recomenda-se conservar em alíquotas a -20°C.
- Evite ciclos de congelamento e descongelamento sucessivos.

X. PROCEDIMENTO

- A. **Notas de manipulação**
Não utilize o kit ou qualquer componente depois da expiração do prazo de validade. Não misture componentes de diferentes lotes Antes de utilizar todos os componentes devem estar à temperatura ambiente (18-25°C). Misture bem os reagentes e as amostras, por agitação ou rotação suaves. Para evitar contaminações cruzadas utilize uma ponta de pipeta limpa e descartável, para adição de cada componente. Pipetas de alta precisão ou equipamento automático de pipetagem melhoram a precisão. Respeite os períodos de incubação. Prepare uma curva de calibração para cada análise, não utilize dados de análises prévias. Cada tubo pode ser usado apenas uma vez.

- B. **Procedimento**
 1. Rotule os tubos revestidos em duplicado, para cada calibrador, amostra, controlo. Para a determinação das contagens totais, rotule 2 tubos normais.
 2. Agite ligeiramente no vortex calibradores, amostras e controlos e dispense 10 µl de cada, para os tubos respectivos.
 3. Dispense 500 µl de DHEA-S marcado com I ¹²⁵ para cada tubo, incluindo os tubos normais para as contagens totais.
 4. Agite manualmente suavemente o suporte dos tubos, para libertar possíveis bolhas de ar.
 5. Incube durante 1 hora a 37°C em banho maria.
 6. Aspire (ou despreze) o conteúdo de cada tubo (excepto os das contagens totais). Assegure-se que a ponta plástica do aspirador atinge o fundo do tubo revestido, para remover todo o líquido.
 7. Lave os tubos com 2 ml de solução de lavagem de trabalho (excepto os das contagens totais) e aspire (ou despreze). Evite formação de espuma quando adiciona a solução de lavagem.
 8. Lave os tubos com 2 ml de solução de lavagem de trabalho (excepto os das contagens totais) e aspire (ou despreze). Evite formação de espuma quando adiciona a solução de lavagem.
 9. Deixe os tubos direitos durante 2 minutos e seguidamente aspire a última porção de líquido.
 10. Conte os tubos num contador gamma durante 60 segundos.

XI. CÁLCULO DOS RESULTADOS

- 1. Calcule a média das determinações em duplicado.
- 2. Calcule a radioactividade de ligação como uma percentagem da ligação determinada no ponto do calibrador zero (0), de acordo com a fórmula seguinte:

$$B/B0\text{ (}\%) = \frac{\text{Contagens (Calibrador ou amostra)}}{\text{Contagens (calibrador Zero)}} \times 100$$

- 3. Traçe os valores (B/B0(%)) para cada ponto de calibração como uma função da concentração do DHEA-S em cada ponto. Rejeitando os “outliers” (casos marginais) óbvios.
- 4. Os métodos informáticos também podem ser utilizados para construir a curva de calibração. Se o processamento dos resultados for automático, recomenda-se a curva com função de ajuste de “4 parâmetros”.
- 5. Por interpolação dos valores das amostras (B/B0(%)), determine as concentrações de DHEA-S das amostras da curva de referência.
- 6. Para cada análise, a percentagem de marcador total ligado na ausência de DHEA-S (B0/T) marcado, deve ser verificada.

XII. DADOS TÍPICOS

Os dados seguintes são apenas para exemplificação e nunca devem ser utilizados em detrimento dos dados reais da curva de calibração.

DHEA-S-RIA-CT		cpm	B/Bo (%)
Contagens total		164710	
Calibrador	0,0 µg/dl	34266	100,0
	1,7 µg/dl	31393	91,6
	9,7 µg/dl	21411	62,5
	41,0 µg/dl	11078	32,3
	219,0 µg/dl	3398	9,9
	1090,0 µg/dl	877	2,6

Fator de conversão:
De µg/dl para µmol/l : x 0,0271
De µmol/l para µg/dl : x 36,85

XIII. DESEMPENHO E LIMITES

A. Limite de detecção
Foram analisados 20 calibradores zero , juntamente com um conjunto de outros calibradores.
O limite de detecção, definido como a concentração aparente, 2 DP abaixo das contagens médias com zero ligações, foi de 1,23 µg/dl.

B. Especificidade

A especificidade de anticorpos policlonais usados neste ensaio foram avaliadas por RIA. A quantidade média de DHEA-S, a qual permite a inibição de 50% de ligação de DHEA-S marcado e a quantidade de reações cruzadas dos compostos (análogos) dão a mesma inibição.

Composto	Reactividade-cruzada (%)
S-DHEA	100,00
DHEA	< 0,05
Glucorinide-DHEA	< 0,05
Androstenediol	< 0,05
Sulfato de Estrona	0,08
5α-Dihidrotestosterona	< 0,05
Testosterona	< 0,05

Nota : Esta tabela mostra a reactividade-cruzada para o anti DHEA-S.

C. Precisão

PRECISÃO INTRA-ENSAIO				PRECISÃO INTER-ENSAIO			
Soro	N	<X> ± DP (µg/dl)	CV (%)	Soro	N	<X> ± DP (µg/dl)	CV (%)
A	20	32,1 ± 1,9	5,9	A	12	30,8 ± 2,0	6,5
B	20	107,4 ± 5,1	3,6	B	12	105,5 ± 6,5	6,5

DP: Desvio Padrão; CV: Coeficiente de variação

D. Exactidão

TESTE DE DILUIÇÃO			
Amostra	Diluição	Conc. teórico. (µg/dl)	Conc. medida (µg/dl)
Soro 1	1/1	389,6	
	1/2	194,8	168,1
	1/4	97,4	92,3
	1/8	48,7	50,7
	1/16	24,3	27,1
Soro 2	1/1	85,0	
	1/2	42,5	38,3
	1/4	21,2	19,0
	1/8	10,6	10,6
	1/16	5,3	7,0

As amostras foram diluídas com calibrador zero.

TESTE DE RECUPERAÇÃO				
Amostra	S-DHEA adicionado (µg/dl)	Teórico S - DHEA (µg/dl)	Medido S - DHEA (µg/dl)	Recuperação (%)
Soro	0	NA	26,0	NA
	25	51	59,7	117
	50	76	80,6	106
	100	126	128,1	101,6

Para nosso entendimento, não existe material de referência para este parâmetro.

E. Intervalo de atraso de tempo entre o ultimo calibrador e a dispensa de amostra
Conforme demonstrado a seguir, os resultados das analyses continuam precisos, mesmo quando é dispensada uma amostra 30 minutos depois da adição do calibrador aos tubos revestidos.

INTERVALO DE ATRASO DE TEMPO				
Soro (µg/dl)	0'	10'	20'	30'
Soro 1	30,8	33,8	31,5	31,2
Soro 2	98,5	113,5	118,2	102,5

XIV. CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO

- Se os resultados obtidos para o controlo 1 e/ou controlo 2 não estão dentro do intervalo especificado no rótulo do recipiente, os resultados não podem ser utilizados, a menos que seja dada uma explicação satisfatória para a discrepância encontrada.
- Se for desejável, cada laboratório pode fazer os seus próprios conjuntos de amostras de controlo, que podem ser mantidas congeladas em alíquotas.
- CrITÉrios de aceitação para as diferenças entre os resultados duplicados das amostras dependem das Boas Práticas de Laboratório.

XV. INTERVALOS DE REFERÊNCIA

Este valores são dados apenas como referência; cada laboratório deve estabelecer seu próprios valores normais..
Os valores são expressos como 2,5% para 97,5% .

Sujeitos (grupo idade)	N	Média (µg/dl)	Intervalo*
Mulheres			
< 15	15	129,7	37,8 - 264,5
15-19	19	276,7	117,3 - 531,0
20-24	16	244,0	118,7 - 428,9
25-29	33	197,5	70,2 - 413,4
30-34	29	175,1	75,2 - 398,7
35-39	23	162,0	63,3 - 291,4
40-44	19	144,4	37,3 - 255,8
45-49	13	109,8	20,9 - 198,0
50-54	16	117,0	26,8 - 375,4
55-59	13	102,9	34,5 - 178,1
60-64	10	92,8	24,6 - 182,3
> 65	15	114,3	6,3 - 377,0
Homens			
< 15	14	138,9	34,9 – 284,1
15 – 50	42	262,2	80,5 – 479,4
> 50	37	177,6	51,8 – 470,7

XVI. AVISOS E PRECAUÇÕES

Segurança

Apenas para uso em diagnóstico *in vitro*.
Este kit contém ¹²⁵I (meia-vida: 60 dias), emitindo radiações X (28 keV) e γ (35.5 keV) ionizantes.

Este produto radioactivo pode apenas ser transportado e utilizado por pessoal autorizado: a compra, armazenamento, utilização e troca de produtos radioactivos estão sujeitas à legislação nacional vigente. Em nenhum caso, este produto pode ser administrados a seres humanos ou a animais.

Toda a manipulação readioactiva deve ser efectuada em local próprio e exclusivo para tal. Deve ser mantido no laboratório, um livro de registo para a recepção e armazenamento de material radioactivo. O equipamento do laboratório e equipamento de vidro que possa ser contaminado com radioactividade, deve ser segregado para evitar contaminação cruzada com diferentes isótopos. Qualquer derrame de material radioactivo deve ser imediatamente limpo, de acordo com os procedimentos de radioprotecção. O lixo radioactivo deve ser rejeitado de acordo com a legislação vigente e as regras do laboratório. A adesão às regras básicas da radiosegurança, fornece a protecção adequada

Os componentes de sangue humano incluídos neste kit foram testados por métodos aprovados pela legislação europeia e/ou FDA e dados como negativos para o HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 e 2. Não existe nenhum método, até agora conhecido, que oferece total segurança quanto à impossibilidade de transmissão de hepatite, HIV ou outras infecções, por via do sangue humano. Por isso, deve manipular os reagentes, o soro ou o plasma de acordo com as regras locais de segurança, quanto a materiais potencialmente infecciosos.

Todos os produtos de origem animal e seus derivados foram recolhidos de animias saudáveis. Os componentes bovinos, vieram de países sem casos notificados de BSE. No entanto, todos estes components devem ser manipulados como potencialmente infecciosos.

Evite o contacto da pele e mucosas com os reagentes (azida sódica como conservante). A azida pode reagir com o chumbo e o cobre das canalizações e formar compostos explosivos. Rejeitar com abundante quantidade de água corrente para evitar acumulações destes compostos.

Não fume, coma, beba ou aplique cosméticos na area de trabalho. Não pipette com o auxilio da boca. Use vestuário adequado de protecção e luvas.

Para obter mais informações, consulte Folha de dados de segurança do material (MSDS)

XVII. BIBLIOGRAFIA

1. Orentreich N, BrindJ, Rizer R, Vogelman J : **Age changes and sex differences in serum dehydroepiandrosterone sulphate concentrations throughout adulthood.** J Clin Endocrinol Metab 59:551-555, 1984.

2. Orentreich N, Brind J, Vogelman J, Andres R, Baldwin H. : **Long-term longitudinal measurements of plasma dehydroepiandrosterone sulphate in normal men.** J Clin Endocrinol Metab 75:1002-1004, 1992.

3. Abbasi A, Drinka P, Mattson D, Rudman D : **Low circulating levels of insulin-like growth factors and testosterone in chronically institutionalized elderly men.** J Am Geriatr Soc 41:975-981, 1993.

4. Belanger A, Candas B, Dupont A et al. : **Changes in serum concentrations of conjugated and unconjugated steroid in 40 to 80 year old men.** J Clin Endocrinol Metab 79:1086-1090, 1994.

5. Borst S, Millard W, Lowenthal D : **Growth hormone, exercise, and aging : the future of therapy for the frail elderly.** J Am Geriatr Soc 42:528-535, 1994.

6. Morales A, Nolan J, Nelson J, Yen S : **Effects of replacement dose of dehydroepiandrosterone in men and women of advancing age.** J Clin Endocrinol Metab 78:1360-1367, 1994.

7. Tenover J : **Androgen administration to aging men.** Clin Andol 23:877-892, 1994.

8. Rosenfeld R, Rosenberg B, Fukushima D, Heuman L : **24 hour secretory pattern of dehydroepiandrosterone and dehydroandrosterone sulphate.** J Clin Endocrinol 40:850-855, 1975.

9. Liu C, Laughlin G, Fischer U, Yen S : **Marked attenuation of ultradian and circadian rhythms of dehydroepiandrosterone in postmenopausal women : evidence for a reduced 17,20-desmolase enzymatic activity.** J Clin Endocrinol Metab 71:900-906, 1990.

10. Thomas G, Frenoy N, Legrain S, Sebag-Lanoe R, Baulieu E, Debuire B : **Serum dehydroepiandrosterone sulphate levels as an individual marker.** J Clin Endocrinol Metab 79:1273-1276, 1994.

11. Tissandier O, Peres G, Fiet J, Piette F : **Testosterone, dehydroepiandrosterone, insulin-like growth factor 1, and insulin in sedentary and physically trained aged men.** Eur J Appl Physiol 85:177-184; 2001.

12. Guagnano MT, Del Ponte A, Manigrasso MR, Merlitti D, Pace-Palitti V, Sensis S : **Age-related circadian rhythm of DHEA-S plasma levels in male subjects.** Biological Rhythm Research 32,3:323-331, 2001.

13. Derksen J, Nagesser S.K, Meinders A.E, Haak H.R, Van De Velde C.J.H : **Identification of virilizing adrenal tumors in hirsute women.** New Engl J Med 331(15):968-973, 1994.

14. Lobo R.A, Paul W.L, Goebelsmann U : **dehydroepiandrosterone sulphate as an indicator of adrenal androgen function.** Obstet Gynecol 57:69-73, 1981.

15. Cacciari E : **Gonadal and adrenal secretion of dehydroepiandrosterone sulphate in prepubertal and pubertal subjects.** J Endocrinol Invest 4:197-202, 1981.

16. **Ebeling P, Koivisto V.A :** Physiological importance of dehydroepiandrosterone. **Lancet 343:1479-1481, 1994.**

XVIII. RESUMO DO PROTOCOLO

	CONTAGENS TOTAIS (µl)	CALIBRA- DORES (µl)	CONTROLO S DAS AMOSTRAS (µl)
Calibradores (0 to 5) Amostras, controlos e marcadores	- - 500	10 - 500	- 10 500
Incubação	1 hora a 37°C em banho maria		
Separação Solução de lavagem de trabalho Separação Solução de lavagem de trabalho Separação	-	aspirar 2,0 ml aspirar 2,0 ml Aspire cuidadosamente	
Contagem	Contar os tubos durante 60 segundos		

Διαβάστε ολόκληρο το πρωτόκολλο πριν από τη χρήση.

DHEA-S-RIA-CT

I. ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ

Ραδιοανοσοπροσδιορισμός για την *in vitro* ποσοτική μέτρηση της ανθρώπινης θεικής 5-ανδροστεν-3β-OL-17-διόνης (Θεική δεϋδροεπιανδροστερόνη ή DHEA-S) στον ορό.

II. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

- A. Εμπορική ονομασία: Kit DHEA-S-RIA-CT της DAsource
- B. Αριθμός καταλόγου: KIP0481: 96 προσδιορισμοί
- Γ. Κατασκευάζεται από την: DAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Για τεχνική βοήθεια ή πληροφορίες σχετικά με παραγγελίες επικοινωνήστε στα:

Τηλ.: +32 (0)10 84.99.11

Φαξ: +32 (0)10 84.99.91

III. ΚΛΙΝΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

A. Βιολογική δράση

Η δεϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA) και η θεική της μορφή, η DHEA-S, είναι τα στεροειδή προϊόντα των επινεφριδίων που υπάρχουν σε μεγαλύτερη αφθονία. Το επινεφρίδιο είναι η μοναδική πηγή αυτών των στεροειδών στις γυναίκες, αλλά στους άνδρες υπάρχει επίσης μικρή συμβολή από τους όρχεις. Η ανάπτυξη της DHEA διεγείρεται από την ACTH, προκαλώντας σημαντική ημερήσια διακύμανση στις συγκεντρώσεις του ορού. Η DHEA μετατρέπεται ταχέως σε DHEA-S από ένα ένζυμο που υπάρχει στα επινεφρίδια, το ήπαρ και το λεπτό έντερο. Η DHEA-S είναι παρούσα σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες κατά 200 φορές από εκείνες της DHEA και έχει μεγαλύτερη ημιζωή, κάτι που καταργεί σε μεγάλο βαθμό την ημερήσια διακύμανση.

Η γήρανση επηρεάζει τα δομικά στοιχεία των ενδοκρινών που σχετίζονται με την ηλικία, όπως είναι η DHEA-S, η οποία μπορεί να θεωρηθεί ως βιοδείκτης γήρανσης, εφόσον τα επίπεδά της μειώνονται σταδιακά σε άτομα μεγαλύτερης ηλικίας. Τα επίπεδα της DHEA-S στο πλάσμα αυξάνονται σταθερά από περίπου το έβδομο έτος της ζωής, έπειτα μειώνονται σταδιακά μετά την τρίτη δεκαετία.

Η DHEA είναι ένα στεροειδές C19 με μοριακό βάρος 288 Kd και ημιζωή στο πλάσμα περίπου 1-3 ώρες. Το μοριακό βάρος της DHEA-S είναι 368,5 Kd και η ημιζωή είναι περίπου 10-20 ώρες. Η DHEA σχηματίζεται από την προγενεολόνη μέσω του ενζύμου 17,20 δεσμολάση και μεταβολίζεται σε ανδροστενεδιόνη ή τεστοστερόνη μέσω της 3 β- ή 17 β-υδροστεροειδούς δεϋδρογενάσης αντίστοιχα. Η υδροστεροειδής σουλφατάση μετατρέπει τη DHEA σε DHEA-S και η σουλφοϋδρολάση αντιστρέφει αυτήν την αντίδραση.

B. Κλινικές εφαρμογές

Αυξημένα επίπεδα DHEA-S βρίσκονται στο πλάσμα ασθενών με όγκους των επινεφριδίων ή με συγγενή υπερπλασία των επινεφριδίων. Η DHEA-S ενδέχεται να είναι επίσης ελαφρά αυξημένη σε ασθενείς με πολυκυστικές ωοθήκες, γεγονός που υποστηρίζει κάποιο συμμετοχή των επινεφριδίων στην αρρενοποίηση που παρατηρείται στην κατάσταση αυτή. Όγκοι με παραγωγή HCG στους άνδρες ενδέχεται να οδηγήσουν σε αυξημένη παραγωγή DHEA από τους όρχεις.

Η DHEA-S προσδιορίζεται συχνά σε συνδυασμό με την ελεύθερη τεστοστερόνη ως αρχική εξέταση γενικού ελέγχου για υπερανδρογονισμό σε περίπτωση δασυτρίχισμού. Μερικές φορές η DHEA-S είναι η μόνη ορμόνη που κυκλοφορεί σε επίπεδο πάνω από το φυσιολογικό και είναι προφανώς πιο πιθανό να αυξάνεται κατά τη πρώτα στάδια δασυτρίχισμού από ότι τα περισσότερα ανδρογόνα.

Η DHEA-S είναι συνήθως μη ανιχνεύσιμη σε περίπτωση ανεπάρκειας των επινεφριδίων ή πανυποϋποφυσισμού. Οι συγκεντρώσεις μειώνονται ελαφρά κατά την κύηση και με τη χρήση αντισυλληπτικών που λαμβάνονται από το στόμα και μειώνονται έντονα μετά την χορήγηση γλυκοκορτικοειδών.

Χαμηλές κυκλοφορούσες συγκεντρώσεις παρατηρούνται με σοβαρή ασθένεια και σε ασθενείς με AIDS.

IV. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Μια σταθερή ποσότητα DHEA-S σημασμένης με ¹²⁵I ανταγωνίζεται με τη DHEA-S που θα μετρηθεί, η οποία υπάρχει στο δείγμα ή στο βαθμονομητή, για σταθερή ποσότητα θέσεων αντισωμάτων που είναι ακινητοποιημένα στο τοίχωμα ενός σωληναρίου πολυστυρενίου. Μετά από 1 ώρα επώασης στους 37° C σε υδατόλουτρο, η αντίδραση ανταγωνισμού τερματίζεται με ένα βήμα αναρρόφησης. Τα σωληνάρια κατόπιν πλένονται δύο φορές με 2 ml διαλύματος πλύσης εργασίας και αναρροφούνται. Παριστάνεται γραφικά μια καμπύλη βαθμονόμησης και προσδιορίζονται οι συγκεντρώσεις της DHEA-S των δειγμάτων με αναγωγή συγκεντρώσεων από την καμπύλη βαθμονόμησης.

V. ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Αντιδραστήρια	Κιτ 96 προσδιορισμών	Χρωματικός κωδικός	Ανασύσταση			
 Σωληνάρια επιστρωμένα με αντι-DHEA-S	2 x 48	ελεφαντό δοντο	Έτοιμο για χρήση			
<table border="1"><tr><td>Ag</td><td>¹²⁵I</td></tr></table> ΙΧΝΗΘΕΤΗΣ: DHEA-S σημασμένη με ιώδιο (κατηγορίας HPLC) σε ρυθμιστικό διάλυμα με βόεια αλβουμίνη και αζίδιο (<0,1%)	Ag	¹²⁵ I	1 φιαλίδιο 55 ml 450 kBq	κόκκινο	Έτοιμο για χρήση	
Ag	¹²⁵ I					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Μηδενικός βαθμονομητής σε ανθρώπινο ορό, θυμόλη	CAL	0	1 φιαλίδιο λυοφιλοποιημένο	κίτρινο	Προσθέστε 0,5 ml απεσταγμένου νερού	
CAL	0					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Βαθμονομητές - N = 1 έως 5 (δείτε τις ακριβείς τιμές πάνω στις ετικέτες των φιαλιδίων) σε ανθρώπινο πλάσμα, θυμόλη	CAL	N	5 φιαλίδια λυοφιλοποιημένο	κίτρινο	Προσθέστε 0,5 ml απεσταγμένου νερού	
CAL	N					
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Διάλυμα πλύσης (TRIS-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 φιαλίδιο 10 ml	καφέ	Αραιώστε 70 x με απεσταγμένο νερό (χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα).
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Οροί ελέγχου - N = 1 ή 2 σε ανθρώπινο πλάσμα, θυμόλη (δείτε τις ακριβείς τιμές πάνω στις ετικέτες των φιαλιδίων)	CONTROL	N	2 φιαλίδια λυοφιλοποιημένο	ασημί	Προσθέστε 0,5 ml απεσταγμένου νερού	
CONTROL	N					

Σημείωση: Χρησιμοποιείτε το μηδενικό βαθμονομητή για αραιώσεις ορών.

VI. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

Τα ακόλουθα υλικά απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται στο κιτ:

- 1. Απεσταγμένο νερό
- 2. Πιπέτες για διανομή: 10 μl και 500 μl (συνιστάται η χρήση πιπετών ακριβείας με αναλώσιμα πλαστικά ρύγχη)
- 3. Αναμείκτης στροβιλισμού
- 4. Μαγνητικός αναδευτήρας
- 5. Υδατόλουτρο στους 37° C
- 6. Αυτόματη σύριγγα των 5 ml (τύπου Cornwall) για πλύση
- 7. Σύστημα αναρρόφησης (προαιρετικό)
- 8. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιοσδήποτε μετρητής γ ακτινοβολίας με δυνατότητα μέτρησης της ¹²⁵I (ελάχιστη απόδοση 70%).

VII. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ

- A. **Βαθμονομητές:** Ανασυστήστε τους βαθμονομητές με 0,5 ml απεσταγμένου νερού.
- B. **Οροί ελέγχου:** Ανασυστήστε τους ορούς ελέγχου με 0,5 ml απεσταγμένου νερού.
- Γ. **Διάλυμα πλύσης εργασίας:** Προετοιμάστε επαρκή όγκο διαλύματος πλύσης εργασίας με προσθήκη 69 όγκων απεσταγμένου νερού σε 1 όγκο διαλύματος πλύσης (70x). Χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα για την

ομογενοποίηση. Απορρίψτε το μη χρησιμοποιημένο διάλυμα πλύσης εργασίας στο τέλος της ημέρας.

VIII. ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΛΗΞΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- Πριν από το άνοιγμα ή την ανασύσταση, όλα τα συστατικά του κιτ παραμένουν σταθερά έως την ημερομηνία λήξης, η οποία αναγράφεται στην ετικέτα, εφόσον διατηρούνται σε θερμοκρασία 2 έως 8° C.
- Μετά την ανασύσταση, οι οροί ελέγχου παραμένουν σταθεροί επί 7 ημέρες στους 2-8° C. Για μεγαλύτερες περιόδους φύλαξης, θα πρέπει να δημιουργηθούν κλάσματα/δόσεις μιας χρήσης και να διατηρηθούν σε θερμοκρασία -20° C επί 3 μήνες το μέγιστο. Αποφεύγετε τους επακόλουθους κύκλους κατάψυξης-απόψυξης.
- Φρέσκο, παρασκευασμένο διάλυμα πλύσης εργασίας θα πρέπει να χρησιμοποιείται την ίδια ημέρα.
- Μετά την πρώτη χρήση του, ο ιχνηθέτης παραμένει σταθερός έως την ημερομηνία λήξης, εφόσον διατηρείται στο αρχικό, ερμητικά κλειστό φιαλίδιο σε θερμοκρασία 2 έως 8° C.
- Τυχόν μεταβολές της φυσικής εμφάνισης των αντιδραστηρίων του κιτ ενδέχεται να υποδηλώνουν αστάθεια ή αλλοίωση.

IX. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

- Τα δείγματα ορού πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία 2-8° C.
- Εάν η εξέταση δεν πραγματοποιηθεί εντός 24 ωρών, συνιστάται η φύλαξη στους -20° C.
- Αποφεύγετε τους επακόλουθους κύκλους κατάψυξης-απόψυξης.

X. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- A. **Σημειώσεις σχετικά με το χειρισμό**
Μη χρησιμοποιείτε το κιτ ή τα συστατικά μετά την ημερομηνία λήξης. Μην αναμειγνύετε υλικά από διαφορετικές παρτίδες κιτ. Φέρετε όλα τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία δωματίου (18-25°C) πριν από τη χρήση. Αναμείξτε καλά όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα με απαλή ανακίνηση ή ανάδευση. Χρησιμοποιείτε ένα καθαρό αναλώσιμο ρύγχος πιπέτας για την προσθήκη κάθε διαφορετικού αντιδραστηρίου και δείγματος προκειμένου να αποφύγετε την επιμόλυνση. Η ακρίβεια βελτιώνεται με χρήση πιπετών υψηλής ακρίβειας ή αυτοματοποιημένου εξοπλισμού διανομής με πιπέτες. Τηρείτε τους χρόνους επώασης. Προετοιμάστε μια καμπύλη βαθμονόμησης για κάθε ανάλυση και μη χρησιμοποιείτε δεδομένα από προηγούμενες αναλύσεις. Κάθε σωλήνας μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο μία φορά.

B. Διαδικασία

1. Σημάνετε επιστρωμένα σωληνάρια εις διπλούν για κάθε βαθμονομητή, ορό ελέγχου και δείγμα. Για τον προσδιορισμό των μετρήσεων του ιχνηθέτη ¹²⁵I ("total"), σημάνετε 2 κοινά (μη επιστρωμένα) σωληνάρια.
2. Αναμείξτε για λίγο (με αναμείκτη στροβιλισμού τύπου vortex) ορούς ελέγχου και δείγματα και διανείμετε 10 μl από έκαστο σε αντίστοιχα σωληνάρια.
3. Διανείμετε 500 μl DHEA-S σημασμένης με ¹²⁵I σε κάθε σωληνάριο, συμπεριλαμβάνοντας τα μη επιστρωμένα σωληνάρια που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ¹²⁵I ("total").
4. Ανακινήστε απαλά με το χέρι τη βάση στήριξης των σωληναρίων για να απελευθερώσετε τυχόν παγιδευμένες φυσαλίδες αέρα.
5. Επώαστε για 1 ώρα στους 37° C σε υδατόλουτρο.
6. Αναρροφήστε (ή μεταγγίστε) το περιεχόμενο κάθε σωληναρίου (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ¹²⁵I ["total"]) και βεβαιωθείτε ότι το πλαστικό ρύγχος του αναρροφητή φθάνει στον πυθμένα του επιστρωμένου σωληναρίου προκειμένου να αφαιρεθεί όλη η ποσότητα του υγρού.
7. Πλύνετε τα σωληνάρια με 2 ml διαλύματος πλύσης εργασίας (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ¹²⁵I ["total"]) και αναρροφήστε (ή μεταγγίστε). Αποφύγετε το σχηματισμό αφρού κατά τη διάρκεια της προσθήκης του διαλύματος πλύσης εργασίας.
8. Πλύνετε τα σωληνάρια με 2 ml διαλύματος πλύσης εργασίας (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ¹²⁵I ["total"]) και αναρροφήστε (ή μεταγγίστε). Αποφύγετε το σχηματισμό αφρού κατά τη διάρκεια της προσθήκης του διαλύματος πλύσης εργασίας.
9. Αφήστε τα σωληνάρια να σταθούν σε όρθια θέση για δύο λεπτά και αναρροφήστε τη σταγόνα υγρού που απομένει.
10. Μετρήστε τα σωληνάρια σε μετρητή γ ακτινοβολίας για 60 δευτερόλεπτα.

XI. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

- Υπολογίστε τη μέση τιμή των διπλών προσδιορισμών.
- Υπολογίστε τη δεσμευμένη ραδιενέργεια ως ποσοστό της δέσμευσης που προσδιορίζεται στο σημείο μηδενικού βαθμονομητή (0) σύμφωνα με τον ακόλουθο τύπο:

$$B / B0(\%) = \frac{\text{Κρούσεις(BΒαθμονομητής ή δείγμα)}}{\text{Κρούσεις(MΜηδενικβαθμονομητής)}} \times 100$$
- Παραστήστε γραφικά τις τιμές (B/B0(%)) για κάθε σημείο βαθμονομητή ως συνάρτηση της συγκέντρωσης της DHEA-S για κάθε σημείο βαθμονομητή. Απορρίψτε τις εμφανείς μη αποδεκτές τιμές.
- Για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν επίσης μέθοδοι με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή. Εάν χρησιμοποιείται αυτόματη επεξεργασία αποτελεσμάτων, συνιστάται προσαρμογή καμπύλης λογιστικής συνάρτησης 4 παραμέτρων.
- Με αναγωγή των τιμών των δειγμάτων (B/B0 (%)), προσδιορίστε τις συγκεντρώσεις DHEA-S των δειγμάτων από την καμπύλη βαθμονόμησης.
- Για κάθε προσδιορισμό, πρέπει να ελέγχεται το ποσοστό του συνολικού ιχνηθέτη που δεσμεύεται εν τη απουσία μη σημασμένης DHEA-S (B0/T).

XII. ΤΥΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα ακόλουθα δεδομένα προορίζονται μόνο ως παράδειγμα και δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται ποτέ αντί της καμπύλης βαθμονόμησης πραγματικού χρόνου.

DHEA-S-RIA-CT	cpm	B/Bo (%)
Κρούσεις του ιχνηθέτη ¹²⁵ I ("total")	164710	
Βαθμονομητής		
0,0 μg/dl	34266	100,0
1,7 μg/dl	31393	91,6
9,7 μg/dl	21411	62,5
41,0 μg/dl	11078	32,3
219,0 μg/dl	3398	9,9
1090,0 μg/dl	877	2,6

Συντελεστής μετατροπής:

Από μg/dl σε μmol/l: x 0,0271

Από μmol/l σε μg/dl: x 36,85

XIII. ΑΠΟΔΟΣΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

- A. Όριο ανίχνευσης**
 Μετρήθηκαν είκοσι μηδενικοί βαθμονομητές μαζί με ένα σύνολο άλλων βαθμονομητών.
 Το όριο ανίχνευσης, οριζόμενο ως η φαινομενική συγκέντρωση δύο τυπικών αποκλίσεων κάτω από τις μέσες μετρήσεις σε μηδενική δέσμευση, ήταν 1,23 μg/dl.

B. Ειδικότητα

Η ειδικότητα του πολυκλωνικού αντισώματος που χρησιμοποιείται στον προσδιορισμό αυτό αξιολογήθηκε μέσω της μεθόδου RIA, ως ο λόγος της ποσότητας DHEA-S, η οποία αποδίδει 50% αναστολή της δέσμευσης της σημασμένης DHEA-S, και της ποσότητας των ενώσεων που παρουσιάζουν διασταυρούμενη αντίδραση (ανάλογα), οι οποίες επιφέρουν την ίδια αναστολή.

Ένωση	Διασταυρούμενη αντίδραση (%)
DHEA-S	100,00
DHEA	< 0,05
Γλυκουρονίδιο της DHEA	< 0,05
Ανδροστενεδιόνη	< 0,05
Οιστρώνη - Θεϊκή	0,08
5α-διυδροτεστοστερόνη	< 0,05
Τεστοστερόνη	< 0,05

Σημείωση: Στον πίνακα αυτό παρουσιάζεται η διασταυρούμενη αντιδραστικότητα για την αντι-DHEA-S.

Γ. Ακρίβεια

ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΙΔΙΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ				ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΜΕΤΑΞΥ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΩΝ			
Ορός	N	<X> ± T.A. (μg/dl)	Σ.Δ. (%)	Ορός	N	<X> ± T.A. (μg/dl)	Σ.Δ. (%)
A	20	32,1 ± 1,9	5,9	A	12	30,8 ± 2,0	6,5
B	20	107,4 ± 5,1	3,6	B	12	105,5 ± 6,5	6,5

T.A.: Τυπική απόκλιση, Σ.Δ.: Συντελεστής διακύμανσης

Δ. Ορθότητα

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΡΑΙΩΣΗΣ			
Δείγμα	Αραίωση	Θεωρητική συγκέντρωση (μg/dl)	Μετρηθείσα συγκέντρωση (μg/dl)
Ορός 1	1/1	389,6	
	1/2	194,8	168,1
	1/4	97,4	92,3
	1/8	48,7	50,7
	1/16	24,3	27,1
Ορός 2	1/1	85,0	
	1/2	42,5	38,3
	1/4	21,2	19,0
	1/8	10,6	10,6
	1/16	5,3	7,0

Τα δείγματα αραιώθηκαν με μηδενικό βαθμονομητή.

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ				
Δείγμα	Προσθεθείσα DHEA-S (μg/dl)	Θεωρητική συγκέντρωση DHEA-S (μg/dl)	Μετρηθείσα συγκέντρωση DHEA-S (μg/dl)	Ανακτηθ είσα (%)
Ορός	0	NA	26,0	NA
	25	51	59,7	117
	50	76	80,6	106
	100	126	128,1	101,6

Από όσο είναι δυνατό να γνωρίζουμε, δεν υπάρχει διεθνές υλικό αναφοράς για την παράμετρο αυτή.

- E. Μεσοδιάστημα μεταξύ της διανομής τελευταίου βαθμονομητή και δείγματος**
 Όπως φαίνεται στη συνέχεια, τα αποτελέσματα του προσδιορισμού παραμένουν αξιόπιστα ακόμα και όταν διανέμεται ένα δείγμα 30 λεπτά μετά την προσθήκη του βαθμονομητή στα επιστρωμένα σωληνάρια.

ΜΕΣΟΔΙΑΣΤΗΜΑ				
Ορός (μg/dl)	0'	10'	20'	30'
Ορός 1	30,8	33,8	31,5	31,2
Ορός 2	98,5	113,5	118,2	102,5

XIV. ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΣ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

- Εάν τα αποτελέσματα που λαμβάνονται για τον ορό ελέγχου 1 ή/και τον ορό ελέγχου 2 δε βρίσκονται εντός του πεδίου τιμών που καθορίζεται στην ετικέτα του φιαλιδίου, τα αποτελέσματα δεν είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν, εκτός εάν έχει δοθεί ικανοποιητική εξήγηση για την ασυμφωνία.
- Εάν είναι επιθυμητό, κάθε εργαστήριο μπορεί να δημιουργήσει τα δικά του μείγματα δειγμάτων ελέγχου (pools), τα οποία πρέπει να διατηρούνται κατεψυγμένα σε κλάσματα/δόσεις μιας χρήσης.
- Τα κριτήρια αποδοχής για τη διαφορά μεταξύ των διπλών αποτελεσμάτων των δειγμάτων θα πρέπει να βασίζονται σε ορθές εργαστηριακές πρακτικές.

XV. ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Οι τιμές αυτές παρέχονται μόνον ως οδηγός. Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να καθιερώσει το δικό του πεδίο φυσιολογικών τιμών.
Το πεδίο τιμών εκφράζεται ως ποσοστά επί τοις εκατό 2,5 % και 97,5 %.

Υποκείμενα (ηλικιακή ομάδα)	N	Μέση τιμή µg/dl	Πεδίο τιμών
Γυναίκες			
< 15	15	129,7	37,8 - 264,5
15-19	19	276,7	117,3 - 531,0
20-24	16	244,0	118,7 - 428,9
25-29	33	197,5	70,2 - 413,4
30-34	27	175,1	75,2 - 398,7
35-39	23	162,0	63,3 - 291,4
40-44	19	144,4	37,3 - 255,8
45-49	13	109,8	20,9 - 198,0
50-54	16	117,0	26,8 - 375,4
55-59	13	102,9	34,5 - 178,1
60-64	10	92,8	24,6 - 182,3
> 65	15	114,3	6,3 - 377,0
Άνδρες			
< 15	14	138,9	34,9 - 284,1
15 – 50	42	262,2	80,5 - 479,4
> 50	37	177,6	51,8 - 470,7

XVI. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

Ασφαλείας

Μόνο για διαγνωστική χρήση *in vitro*.
Το kit αυτό περιέχει το ¹²⁵I (Χρόνος ημιζωής: 60 ημέρες), μια ραδιενεργή ουσία η οποία εκπέμπει ιονίζουσα ακτινοβολία Χ (28 keV) και γ (35.5 keV). Αυτό το ραδιενεργό προϊόν είναι δυνατό να μεταφερθεί και να χρησιμοποιηθεί μόνο από εξουσιοδοτημένα άτομα. Η αγορά, φύλαξη, χρήση και ανταλλαγή ραδιενεργών προϊόντων υπόκεινται στη νομοθεσία της χώρας του τελικού χρήστη. Σε καμία περίπτωση δεν πρέπει να χορηγείται το προϊόν σε ανθρώπους ή ζώα.
Όλος ο χειρισμός του ραδιενεργού υλικού θα πρέπει να εκτελείται σε καθορισμένο χώρο, μακριά από χώρους τακτικής διέλευσης. Στο εργαστήριο πρέπει να διατηρείται ημερολόγιο για την παραλαβή και τη φύλαξη ραδιενεργών υλικών. Εξοπλισμός και γυάλινα σκεύη του εργαστηρίου, τα οποία θα μπορούσαν να μολυνθούν με ραδιενεργές ουσίες, θα πρέπει να φυλάσσονται σε ξεχωριστό χώρο για την πρόληψη επιμόλυνσης των διαφόρων ραδιοϊσοτόπων. Τυχόν διαρροές ραδιενεργών υγρών πρέπει να καθαρίζονται αμέσως σύμφωνα με τις διαδικασίες ασφαλείας από ραδιενέργεια. Τα ραδιενεργά απόβλητα πρέπει να απορρίπτονται σύμφωνα με τους τοπικούς κανονισμούς και τις κατευθυντήριες οδηγίες των αρχών που έχουν δικαιοδοσία στο εργαστήριο. Η τήρηση των βασικών κανόνων ασφαλείας από ραδιενέργεια παρέχει επαρκή προστασία. Τα συστατικά ανθρώπινου αίματος που περιλαμβάνονται στο kit αυτό έχουν ελεγχθεί με μεθόδους εγκεκριμένες στην Ευρώπη ή/και από τον FDA και έχει διαπιστωθεί ότι είναι αρνητικά ως προς την παρουσία HbsAg, αντι-HCV, αντι-HIV-1 και 2. Καμία γνωστή μέθοδος δεν είναι δυνατό να παρέχει πλήρη διασφάλιση ότι παράγωγα του ανθρώπινου αίματος δε θα μεταδώσουν ηπατίτιδα, AIDS ή άλλες λοιμώξεις. Επομένως, ο χειρισμός αντιδραστηρίων, δειγμάτων ορού ή πλάσματος θα πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τις τοπικές διαδικασίες περί ασφαλείας.
Όλα τα ζωικά προϊόντα και παράγωγα έχουν συλλεχθεί από υγιή ζώα. Τα βόεια συστατικά προέρχονται από χώρες όπου δεν έχει αναφερθεί BSE. Παρ' όλ' αυτά, συστατικά που περιέχουν ζωικές ουσίες θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικώς μολυσματικά.
Αποφεύγετε οποιαδήποτε επαφή του δέρματος με αντιδραστήρια (χρησιμοποιείται αζίδιο του νατρίου ως συντηρητικό). Το αζίδιο στο kit αυτό ενδέχεται να αντιδράσει με μόλυβδο και χαλκό των υδραυλικών σωληνώσεων και να σχηματίσει με τον τρόπο αυτό ιδιαίτερα εκρηκτικά αζίδια μετάλλων. Κατά τη διάρκεια του βήματος πλύσης, εκπλύνετε την αποχέτευση με μεγάλη ποσότητα νερού, για την πρόληψη τυχόν συσσώρευσης αζιδίου.
Μην καπνίζετε, μην πίνετε, μην τρώτε και μη χρησιμοποιείτε καλλυντικά στο χώρο εργασίας. Μην διανέμετε με πιπέτα χρησιμοποιώντας το στόμα σας. Χρησιμοποιείτε προστατευτικό ρουχισμό και γάντια μιας χρήσης.
Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στο Φύλλο δεδομένων ασφαλείας υλικού (MSDS)

XVII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Orentreich N, BrindJ, Rizer R, Vogelmann J : **Age changes and sex differences in serum dehydroepiandrosterone sulphate concentrations throughout adulthood.** J Clin Endocrinol Metab 59:551-555, 1984.

2. Orentreich N, Brind J, Vogelmann J, Andres R, Baldwin H. : **Long-term longitudinal measurements of plasma dehydroepiandrosterone sulphate in normal men.** J Clin Endocrinol Metab 75:1002-1004, 1992.

3. Abbasi A, Drinka P, Mattson D, Rudman D : **Low circulating levels of insulin-like growth factors and testosterone in chronically institutionalized elderly men.** J Am Geriatr Soc 41:975-981, 1993.

4. Belanger A, Candas B, Dupont A et al. : **Changes in serum concentrations of conjugated and unconjugated steroid in 40 to 80 year old men.** J Clin Endocrinol Metab 79:1086-1090, 1994.

5. Borst S, Millard W, Lowenthal D : **Growth hormone, exercise, and aging : the future of therapy for the frail elderly.** J Am Geriatr Soc 42:528-535, 1994.

6. Morales A, Nolan J, Nelson J, Yen S : **Effects of replacement dose of dehydroepiandrosterone in men and women of advancing age.** J Clin Endocrinol Metab 78:1360-1367, 1994.

7. Tenover J : **Androgen administration to aging men.** Clin Andol 23:877-892, 1994.

8. Rosenfeld R, Rosenberg B, Fukushima D, Heuman L : **24 hour secretory pattern of dehydroepiandrosterone and dehydroandrosterone sulphate.** J Clin Endocrinol 40:850-855, 1975.

9. Liu C, Laughlin G, Fischer U, Yen S : **Marked attenuation of ultradian and circadian rhythms of dehydroepiandrosterone in postmenopausal women : evidence for a reduced 17,20-desmolase enzymatic activity.** J Clin Endocrinol Metab 71:900-906, 1990.

10. Thomas G, Frenoy N, Legrain S, Sebag-Lanoe R, Baulieu E, Debuire B : **Serum dehydroepiandrosterone sulphate levels as an individual marker.** J Clin Endocrinol Metab 79:1273-1276, 1994.

11. Tissandier O, Peres G, Fiet J, Piette F : **Testosterone, dehydroepiandrosterone, insulin-like growth factor 1, and insulin in sedentary and physically trained aged men.** Eur J Appl Physiol 85:177-184; 2001.

12. Guagnano MT, Del Ponte A, Manigrasso MR, Merlitti D, Pace-Palitti V, Sensis S : **Age-related circadian rhythm of DHEA-S plasma levels in male subjects.** Biological Rhythm Research 32,3:323-331, 2001.

13. Derksen J, Nagesser S.K, Meinders A.E, Haak H.R, Van De Velde C.J.H : **Identification of virilizing adrenal tumors in hirsute women.** New Engl J Med 331(15):968-973, 1994.

14. Lobo R.A, Paul W.L, Goebelsmann U : **dehydroepiandrosterone sulphate as an indicator of adrenal androgen function.** Obstet Gynecol 57:69-73, 1981.

15. Cacciari E : **Gonadal and adrenal secretion of dehydroepiandrosterone sulphate in prepubertal and pubertal subjects.** J Endocrinol Invest 4:197-202, 1981.

16. Ebeling P, Koivisto V.A : **Physiological importance of dehydroepiandrosterone.** Lancet 343:1479-1481, 1994.

ΧVΙΙΙ. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ

	ΚΡΟΥΣΕΙΣ "TOTAL" μl	ΒΑΘΜΟΝΟ- ΜΗΤΕΣ μl	ΔΕΙΓΜΑ (ΤΑ) ΟΡΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ μl
Βαθμονομητές (0 έως 5) Δείγματα, οροί ελέγχου Ιχνηθέτης	- - 500	10 - 500	- 10 500
Επώαση	1 ώρα στους 37° C σε υδατόλουτρο.		
Διαχωρισμός Διάλυμα πλύσης εργασίας Διαχωρισμός Διάλυμα πλύσης εργασίας Διαχωρισμός	-	Αναρρόφηση 2,0 ml Αναρρόφηση 2,0 ml Αναρρόφηση προσεκτική	
Μέτρηση	Μέτρηση σωληναρίων επί 60 δευτερόλεπτα		

Przed zastosowaniem należy przeczytać cały protokół.

DHEA-S-RIA-CT

I. PRZEZNACZENIE

Oznaczenie radioimmunologiczne do ilościowego pomiaru in vitro ludzkiego Siarczan 5-androsteno-3 β -OL-17-dionu (siarczan dehydroepiandrosteronu lub siarczan DHEA) w ludzkiej surowicy.

II. INFORMACJE OGÓLNE

- A. **Nazwa firmowa:** DIASource DHEA-S-RIA-CT
- B. **Numer katalogowy:** KIP0481 : 96 oznaczeń
- C. **Wyprodukowano przez:** DIASource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgia.

Dział pomocy technicznej oraz informacje dotyczące zamówień:

Tel: +32 (0)10 84.99.11

Fax: +32 (0)10 84.99.91

III. INFORMACJE KLINICZNE

A. Aktywność biologiczna

Dehydroepiandrosteron (DHEA) oraz jego związek siarczanowy, DHEA-S, są głównymi produktami sterydowymi nadnerczy. Głównym źródłem tych sterydów u kobiet są nadnercza, natomiast u mężczyzn istnieje jeszcze niewielka produkcja tych substancji w jądrach. Produkcja DHEA jest stymulowana przez ACTH, w wyniku czego obserwuje się znacznego stopnia zmienność dobową, jeżeli chodzi o stężenia tego hormonu w surowicy. DHEA jest szybko przekształcane do DHEA-S przez enzym obecny w nadnerczach, wątrobie i jelicie cienkim. DHEA-S występuje w stężeniach przekraczających 200-krotność poziomu DHEA i charakteryzuje się dłuższym czasem półtrwania, w wyniku tego zmienność dobową poziomu tej substancji jest mniej istotna.

Z uwagi na wpływ starzenia na strukturę endokrynologiczną, w tym DHEA-S, poziom tego hormonu może być brany pod uwagę jako biomarker procesu starzenia, ponieważ poziomy substancji stopniowo maleją wraz z wiekiem. Poziomy DHEA-S w osoczu stopniowo wzrastają od około siódmego roku życia, następnie stopniowo maleją od trzeciej dekady.

DHEA jest 19-węglowym sterydem o masie cząsteczkowej 288 kD i czasie półtrwania około 1 – 3 godzin. Masa cząsteczkowa DHEA-S wynosi 368,5 kD a jego czas półtrwania wynosi około 10 – 20 godzin. DHEA jest wytwarzany z pregnenolonu za pomocą enzymu 17,20 desmolazy i metabolizowany do androstenodionu lub testosteronu przy pomocy (odpowiednio) 3-beta- lub 17-beta-dehydrogenazy sterydowej. Sulfataza sterydowa przekształca DHEA do DHEA-S a sulfohydrolaza odwraca tą reakcję.

B. Zastosowania kliniczne

Podwyższone poziomy DHEA-S stwierdza się u pacjentów z guzami nadnerczy lub z wrodzoną hiperplazją nadnerczy. Poziom DHEA-S może być również nieznacznie podwyższony u pacjentów z zespołem policystycznych jajników, co potwierdza rolę nadnerczy w wirylizacji obserwowanej w tym stanie chorobowym. Guzy wytwarzające HCG u mężczyzn mogą prowadzić do zwiększenia wytwarzania DHEA w jądrach.

DHEA-S jest często oznaczany razem z wolnym testosteronem w początkowym teście przesiewowym hiperandrogenizmu w hirsutyzmie. W niektórych przypadkach, DHEA-S jest jedynym hormonem we krwi krążącej, którego poziomy przekracza wartości prawidłowe. Do takiej sytuacji dochodzi najczęściej w początkowych stadiach hirsutyzmu i dotyczy to częściej DHEA-S, niż innych androgenów.

DHEA-S jest przeważnie niewykrywalny w stanach niedoczynności nadnerczy lub niedoczynności przysadki. Stężenia tego hormonu są nieznacznie obniżone w ciąży i w czasie przyjmowania doustnych środków antykoncepcyjnych, oraz znacząco obniżone w trakcie przyjmowania glikokortykosteroidów.

Niskie stężenia we krwi krążącej są obserwowane w ciężkich stanach chorobowych i u pacjentów z AIDS.

IV. ZAGADNIENIA DOTYCZĄCE METODY

W celu pomiaru substancji obecnej w próbce lub w kalibratorze, odpowiednia ilość cząsteczek DHEA-S oznakowanych ¹²⁵I współzawodniczy z DHEA-S o określonej ilości miejsc na przeciwciałach unieruchomionych na ścianie próbówki polistyrenowej. Po jednogodzinnej inkubacji w temperaturze 37°C w łaźni wodnej, przebiegającej w temperaturze pokojowej reakcja współzawodnictwa jest przerywana przez aspirację. Probówki są wtedy myte dwa razy 2 ml roboczego roztworu płuczącego i odsysane. Wykreślana jest krzywa kalibracyjna a stężenia DHEA-S w próbkach są określane na podstawie nałożenia dawki na krzywą kalibracyjną.

V. ODCZYNNIKI DOSTARCZONE

Odczynniki	Zestaw 96 oznaczeń	Kolor	Rekonstytucja			
 Probówki opłaszczone anty-DHEA-S	2 x 48	kość słoniowa	Gotowe do zastosowania.			
<table border="1"><tr><td>Ag</td><td>¹²⁵I</td></tr></table> ZNACZNIK IZOTOPOWY: DHEA-S oznakowany jodem ¹²⁵ (poziom HPLC) w buforze z albuminą bydlęcą i azydkiem (<0,1%).	Ag	¹²⁵ I	1 fiolka 55 ml 450 kBq	czerwony	Gotowy do zastosowania.	
Ag	¹²⁵ I					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Kalibrator zerowy w surowicy ludzkiej, tymolem.	CAL	0	1 fiolka materiał liofilizowany	żółty	Dodać 0,5 ml wody destylowanej	
CAL	0					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Kalibratory DHEA-S - N = od 1 do 5 (dokładne wartości na etykietach fiolek) w plazma ludzkiej, tymolem.	CAL	N	5 fiolek materiał liofilizowany	żółty	Dodać 0,5 ml wody destylowanej	
CAL	N					
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Roztwór płuczący (TRIS HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 fiolka 10 ml	brązowy	Rozcieńczyć 70x wodą destylowaną (wykorzystać mieszadło magnetyczne).
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Kontrole - N = od 1 do 2 w plazma ludzkiej, tymolem (dokładne wartości na etykietach fiolek)	CONTROL	N	2 fiołki materiał liofilizowany	srebrny	Dodać 0,5 ml wody destylowanej	
CONTROL	N					

Uwaga: Do rozcieńczania próbek używać kalibrator zerowy.

VI. MATERIAŁY WYMAGANE, ALE NIEDOSTARCZONE

Poniższe materiały są wymagane, ale nie są dostarczone w zestawie:

- 1. Woda destylowana
- 2. Pipety do dozowania: 10 µl i 500 µl (zaleca się korzystanie z dokładnych pipet z jednorazowymi końcówkami plastikowymi)
- 3. Mieszadło wirowe
- 4. Mieszadło magnetyczne
- 5. Łaźnia wodna w 37°C
- 6. Strzykawka automatyczna o objętości 5 ml (rodzaj Cornwall) do płukania
- 7. Układ do aspiracji (opcjonalnie)
- 8. Może być wykorzystywany jakikolwiek licznik gamma odpowiedni do pomiaru ¹²⁵I (minimalny uzysk 70%)

VII. PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

- A. **Kalibratory:** Rozpuścić kalibratory przy pomocy 0,5 ml wody destylowanej.
- B. **Kontrole:** Kontrole należy rekonstruować przy pomocy 0,5 ml wody destylowanej.
- C. **Roboczy roztwór płuczący:** Właściwą objętość roboczego roztworu płuczącego należy przygotować dodając 69 objętości wody destylowanej do 1 objętości roztworu płuczącego (70x). Do homogenizacji należy wykorzystać mieszadło magnetyczne. Niewykorzystany roboczy roztwór płuczający należy wylać pod koniec dnia.

VIII. PRZECHOWYWANIE I DATA WAŻNOŚCI ODCZYNNIKÓW

- Przed otwarciem lub rekonstytucją wszystkie składniki zestawu zachowują trwałość do daty ważności przedstawionej na etykiecie, jeżeli są przechowywane w temperaturze od 2 do 8°C.
- Po rekonstytucji, kalibratory i kontrole zachowują trwałość przez 1 tydzień, pod warunkiem przechowywania w temperaturze od 2 do 8°C.
- Świeżo przygotowany roboczy roztwór płuczający powinien być wykorzystany w tym samym dniu. W razie konieczności przechowywania przez dłuższy okres czasu, należy przygotować niewielkie objętości kontroli, co pozwala przechowywać je w temperaturze -20 °C przez 3 miesiące. Unikać powtarzanych cykli zamrażania-odmrażania
- Po jego pierwszym zastosowaniu, znacznik izotopowy zachowuje trwałość do podanej daty ważności jeżeli jest przechowywany w oryginalnej, dobrze zamkniętej fiolce w temperaturze od 2 do 8°C.
- Zmiany w wyglądzie fizycznym odczynników w zestawie mogą wskazywać na ich niestabilność lub zużycie.

IX. POBIERANIE I PRZYGOTOWANIE MATERIAŁU DO BADANIA

- Probki surowicy muszą być przechowywane w temperaturze 2-8°C.
- Jeżeli oznaczenie nie jest wykonywane w ciągu 24 godzin, zaleca się przechowywanie w temperaturze -20°C.
- Unikać powtarzanych cykli zamrażania-odmrażania.

X. PROCEDURA

- A. **Uwagi dotyczące obsługi**
Nie wolno wykorzystywać składników zestawu po upływie daty ważności.
Nie wolno mieszać materiałów pochodzących z różnych serii zestawów. Przed wykorzystaniem wszystkie odczynniki powinny osiągnąć temperaturę pokojową (18-25°C). Wszystkie odczynniki i próbki należy dokładnie wymieszać przez delikatne potrząsanie lub obracanie.
Aby uniknąć zanieczyszczenia krzyżowego, do dodawania poszczególnych odczynników i próbek należy wykorzystywać czyste końcówki jednorazowe pipet. Pipety wysokiej precyzji lub pipety automatyczne poprawiają precyzję wykonania oznaczenia.
Przestrzegać czasów inkubacji.
Przygotować krzywą kalibracyjną dla każdego cyklu pomiarowego, nie wolno wykorzystywać danych z poprzednich oznaczeń.
Każda rura może być użyta tylko raz.

- B. **Procedura**
 1. Dla każdego kalibratora, próbki i kontroli należy oznaczyć opłaszczono próbówki w badaniach podwójnych. W celu określenia całkowitych zliczeń należy oznaczyć 2 standardowe próbówki.
 2. Szybko wymieszać wirując: kalibratory, próbki i kontrole, i dozować po 10 µl każdej substancji do odpowiednich próbek.
 3. Do każdej próbówki, w tym do próbek nieopłaszczonych do całkowitego zliczania, dodać po 500 µl DHEA-S oznakowanego jodem¹²⁵.
 4. Delikatnie potrząsnąć statywem w celu uwolnienia uwięzionych pęcherzyków powietrza.
 5. Inkubować przez 1 godzinę w temperaturze 37°C w łaźni wodnej.
 6. Aspirować (lub odlać) zawartość każdej próbówki (z wyjątkiem próbek do całkowitego zliczania). Aby usunąć cały płyn należy upewnić się, że plastikowa końcówka aspiratora osiągnęła dno opłaszczonych próbówki.
 7. Przeplukać próbówki przy pomocy 2 ml roboczego roztworu płuczącego (z wyjątkiem próbek do całkowitego zliczania) i aspirować zawartość (lub odlać ją). W trakcie dodawania roboczego roztworu płuczącego należy unikać wytwarzania piany.
 8. Przeplukać próbówki przy pomocy 2 ml roboczego roztworu płuczącego (z wyjątkiem próbek do całkowitego zliczania) i aspirować zawartość (lub odlać ją). W trakcie dodawania roboczego roztworu płuczącego należy unikać wytwarzania piany.
 9. Pozostawić próbówki w pozycji stojącej do góry na dwie minuty i aspirować pozostałe krople płynu.
 10. Zliczać próbówki w liczniku gamma przez 60 sekund.

XI. OBLICZANIE WYNIKÓW

- 1. Obliczyć średnią oznaczeń podwójnych.
- 2. Obliczyć związaną radioaktywność jako odsetek wiązania określonego w zerowym punkcie kalibracji (0) zgodnie z poniższym wzorem:

$$B/B0(\%) = \frac{\text{Liczba zliczeń (dla kalibratora lub próbki)}}{\text{Liczba zliczeń (dla kalibratora zerowego)}} \times 100$$

3. Wartości (B/B0(%)) dla każdego punktu kalibratora jako funkcję stężenia DHEA-S każdego punktu kalibratora. Odrzucić oczywiste wartości graniczne.
4. Do opracowania krzywej kalibracyjnej mogą być wykorzystane również metody wspomagania komputerowego. Jeżeli ma być zastosowane automatyczne przetwarzanie wyników, zaleca się dopasowanie krzywej logistycznej 4 parametrowej.
5. Nakładając wartości (B/B0 (%)) próbki należy określić stężenia DHEA-S w próbkach z krzywej kalibracyjnej.
6. Dla każdego oznaczenia należy sprawdzić odsetek całkowitego związanego znacznika izotopowego przy braku nieoznakowanego DHEA-S (B0/T).

XII. PRZYKŁAD DANYCH TYPOWYCH

Poniższe dane są przedstawione wyłącznie w celach przykładowych i nie powinny być nigdy stosowane zamiast rzeczywistych krzywych kalibracyjnych.

DHEA-S-RIA-CT		cpm	B/Bo (%)
Zliczanie całkowite		164710	
Kalibrator	0,0 µg/dl	34266	100,0
	1,7 µg/dl	31393	91,6
	9,7 µg/dl	21411	62,5
	41,0 µg/dl	11078	32,3
	219,0 µg/dl	3398	9,9
	1090,0 µg/dl	877	2,6

Współczynnik konwersji:
Z µg/dl na µmol/l : x 0,0271
Z µmol/l na µg/dl : x 36,85

XIII. DZIAŁANIE I OGRANICZENIA

A. Granica wykrywania

Dwadzieścia kalibratorów zerowych oznaczano wraz z zestawem innych kalibratorów.

Granica wykrywania, zdefiniowana jako odmienne stężenie dwóch odchyłeń standardowych poniżej przeciętnej wartości zliczania przy wiązaniu zerowym kształtowała się na poziomie 1,23 µg/dl.

B. Swoistość

Odsetek reaktywności krzyżowej, oceniany przez porównanie stężenia prowadzącego do 50% zahamowania, przedstawia się następująco:

Związek	Reaktywność krzyżowa (%)
DHEA-S	100,00
DHEA	< 0,05
DHEA-glukuronid	< 0,05
Androstendiol	< 0,05
Siarczan estronu	0,08
5α-Dihydrotestosteron	< 0,05
Testosteron	< 0,05

Nota : W tej tabeli przedstawiono reaktywność krzyżową dla anty-DHEA-S.

C. Precyzja

PRECYZJA W SERII				PRECYZJA MIĘDZY SERIAMI			
Surowica	N	<X> ± SD (µg/dl)	CV (%)	Surowica	N	<X> ± SD (µg/dl)	CV (%)
A	20	32,1 ± 1,9	5,9	A	12	30,8 ± 2,0	6,5
B	20	107,4 ± 5,1	3,6	B	12	105,5 ± 6,5	6,5

SD: Odchylenie standardowe; CV: Współczynnik zmienności

D. Dokładność

BADANIE ROZCIEŃCZENIA			
Próbka	Rozcieńczenie	Stęż. teoretyczne (µg/dl)	Stęż. zmierzone (µg/dl)
Surowica 1	1/1	389,6	
	1/2	194,8	168,1
	1/4	97,4	92,3
	1/8	48,7	50,7
	1/16	24,3	27,1
Surowica 2	1/1	85,0	
	1/2	42,5	38,3
	1/4	21,2	19,0
	1/8	10,6	10,6
	1/16	5,3	7,0

Próbki zostały rozcieńczone przy pomocy kalibratora zerowego.

BADANIE ODZYSKU				
Próbka	Dodano DHEA-S (µg/dl)	Stęż. teoretyczne DHEA-S (µg/dl)	Stęż. zmierzone DHEA-S (µg/dl)	Odzysk (%)
Surowica	0	NA	26,0	NA
	25	51	59,7	117
	50	76	80,6	106
	100	126	128,1	101,6

Według naszej wiedzy, dla tego parametru nie ma żadnego międzynarodowego materiału referencyjnego.

E. Opóźnienie pomiędzy oznaczeniem ostatniego kalibratora i dozowaniem próbki

Jak wykazano, wyniki pomiaru pozostają dokładne nawet wówczas, gdy od momentu dodania kalibratora do opłaszczonych próbek minęło 30 minut.

OPÓŹNIENIE				
Surowica (µg/dl)	0'	10'	20'	30'
Surowica 1	30,8	33,8	31,5	31,2
Surowica 2	98,5	113,5	118,2	102,5

XIV. WEWNĘTRZNA KONTROLA JAKOŚCI

- Jeżeli wyniki uzyskane dla kontroli 1 i 2 nie znajdują się w zakresie określonym na etykiecie fiołki, wyniki nie mogą zostać wykorzystane dopóki nie uda się znaleźć właściwego wyjaśnienia tego odchylenia.
- Jeżeli to konieczne, każde laboratorium może wykonać własne próbki zbiorcze w celach kontrolnych, które powinny być zamrożone w małych objętościach.
- Dopuszczalne kryteria dotyczące różnicy pomiędzy wynikami oznaczeń podwójnych próbek powinny być zgodne z zasadami prawidłowej pracy w laboratorium.

XV. ZAKRESY REFERENCYJNE

Wartości są przedstawione wyłącznie w celach orientacyjnych, każde laboratorium powinno opracować własne wartości referencyjne. Zakres jest oparty na percentylach od 2,5% do 97,5%.

Osobnicy (grupa wiekowa)	N	Średnia(µg/dl)	Zakres *
Kobiety			
< 15	15	129,7	37,8 - 264,5
15-19	19	276,7	117,3 - 531,0
20-24	16	244,0	118,7 - 428,9
25-29	33	197,5	70,2 - 413,4
30-34	29	175,1	75,2 - 398,7
35-39	23	162,0	63,3 - 291,4
40-44	19	144,4	37,3 - 255,8
45-49	13	109,8	20,9 - 198,0
50-54	16	117,0	26,8 - 375,4
55-59	13	102,9	34,5 - 178,1
60-64	10	92,8	24,6 - 182,3
> 65	15	114,3	6,3 - 377,0
Mężczyźni			
< 15	14	138,9	34,9 - 284,1
15 - 50	42	262,2	80,5 - 479,4
> 50	37	177,6	51,8 - 470,7

XVI. ŚRODKI OSTROŻNOŚCI I OSTRZEŻENIA

Bezpieczeństwo

Tylko do diagnostyki *in vitro*.

Zestaw zawiera ¹²⁵I (Okres połowicznego rozpadu: 60 dni), emitujący promieniowanie jonizujące X (28 keV) i γ (35,5 keV).

Ten produkt radioaktywny może być transportowany i wykorzystany wyłącznie przez osoby autoryzowane; zakup, przechowywanie, stosowanie i wymiana produktów radioaktywnych podlega regulacjom prawnym kraju użytkownika końcowego. W żadnym wypadku produkt nie może być podawany ludziom lub zwierzętom.

Obsługa materiałów radioaktywnych powinno być przeprowadzana w miejscach do tego przeznaczonych, z dala od miejsc ogólnej użyteczności. W laboratorium musi być przechowywany rejestr przyjęć i przechowywania materiałów radioaktywnych. Wyposażenie laboratorium oraz szkło, które może być skażone substancjami radioaktywnymi powinno być oddzielone w celu uniknięcia krzyżowego zanieczyszczenia różnych radioizotopów.

Wszelkie płamy z substancji radioaktywnych muszą być natychmiast oczyszczone zgodnie z procedurami dotyczącymi bezpieczeństwa radiologicznego. Odpady radioaktywne muszą być usuwane zgodnie z miejscowymi przepisami i ogólnie przyjętymi wytycznymi obowiązującymi w laboratorium. Przestrzeganie podstawowych zasad bezpieczeństwa radiologicznego zapewnia wystarczające zabezpieczenie.

Składniki zawierające ludzką krew, dostarczone w zestawie, zostały przebadane metodami zaaprobowanymi przez instytucje europejskie i/lub FDA. Stwierdzono, że nie zawierają one HbsAg, przeciwciał anti-HCV, anti-HIV-1 i 2. Żadna ze znanych metod nie może dać całkowitej pewności, że materiały pochodzenia ludzkiego nie przeniosą czynników zakaźnych wirusowego zapalenia wątroby, AIDS i innych. Dlatego postępowanie z odczynnikami i próbkami surowicy lub osocza powinno być zgodne z miejscowymi procedurami dotyczącymi bezpieczeństwa.

Produkty pochodzenia zwierzęcego były pobierane od zdrowych zwierząt. Składniki bydlęce pochodzą z krajów, w których nie odnotowano występowania BSE. Pomimo to, składniki zawierające substancje pochodzenia zwierzęcego powinny być traktowane jako potencjalnie zakaźne.

Unikać kontaktu skóry z odczynnikami (zawierają azydek sodowy jako środek konserwujący). Azydek znajdujący się w zestawie może reagować z miedzią i ołowiem w układzie kanalizacyjnym tworząc związki o właściwościach wybuchowych. W czasie płukania odprowadzany płyn należy płukać dużymi objętościami wody, aby zapobiec kumulacji azydków.

Nie wolno palić, spożywać napojów ani pokarmów, bądź używać kosmetyków w miejscu pracy. Nie pipetować ustami. Zakładać ubranie ochronne i rękawiczki jednorazowe.

Aby uzyskać więcej informacji, zobacz kartę charakterystyki materiału (MSDS)

XVII. BIBLIOGRAFIA

- Orentreich N, BrindJ, Rizer R, Vogelmann J : **Age changes and sex differences in serum dehydroepiandrosterone sulphate concentrations throughout adulthood.** J Clin Endocrinol Metab 59:551-555, 1984.

- Orentreich N, Brind J, Vogelmann J, Andres R, Baldwin H. : **Long-term longitudinal measurements of plasma dehydroepiandrosterone sulphate in normal men.** J Clin Endocrinol Metab 75:1002-1004, 1992.
- Abbasi A, Drinka P, Mattson D, Rudman D : **Low circulating levels of insulin-like growth factors and testosterone in chronically institutionalized elderly men.** J Am Geriatr Soc 41:975-981, 1993.
- Belanger A, Candas B, Dupont A et al. : **Changes in serum concentrations of conjugated and unconjugated steroid in 40 to 80 year old men.** J Clin Endocrinol Metab 79:1086-1090, 1994.
- Borst S, Millard W, Lowenthal D : **Growth hormone, exercise, and aging : the future of therapy for the frail elderly.** J Am Geriatr Soc 42:528-535, 1994.
- Morales A, Nolan J, Nelson J, Yen S : **Effects of replacement dose of dehydroepiandrosterone in men and women of advancing age.** J Clin Endocrinol Metab 78:1360-1367, 1994.
- Tenover J : **Androgen administration to aging men.** Clin Andol 23:877-892, 1994.
- Rosenfeld R, Rosenberg B, Fukushima D, Heuman L : **24 hour secretory pattern of dehydroepiandrosterone and dehydroandrosterone sulphate.** J Clin Endocrinol 40:850-855, 1975.
- Liu C, Laughlin G, Fischer U, Yen S : **Marked attenuation of ultradian and circadian rhythms of dehydroepiandrosterone in postmenopausal women : evidence for a reduced 17,20-desmolase enzymatic activity.** J Clin Endocrinol Metab 71:900-906, 1990.
- Thomas G, Frenoy N, Legrain S, Sebag-Lanoe R, Baulieu E, Debuire B : **Serum dehydroepiandrosterone sulphate levels as an individual marker.** J Clin Endocrinol Metab 79:1273-1276, 1994.
- Tissandier O, Peres G, Fiet J, Piette F : **Testosterone, dehydroepiandrosterone, insulin-like growth factor 1, and insulin in sedentary and physically trained aged men.** Eur J Appl Physiol 85:177-184; 2001.
- Guagnano MT, Del Ponte A, Manigrasso MR, Merlitti D, Pace-Palitti V, Sensis S : **Age-related circadian rhythm of DHEA-S plasma levels in male subjects.** Biological Rhythm Research 32,3:323-331, 2001.
- Derksen J, Nagesser S.K, Meinders A.E, Haak H.R, Van De Velde C.J.H : **Identification of virilizing adrenal tumors in hirsute women.** New Engl J Med 331(15):968-973, 1994.
- Lobo R.A, Paul W.L, Goebelsmann U : **dehydroepiandrosterone sulphate as an indicator of adrenal androgen function.** Obstet Gynecol 57:69-73, 1981.
- Cacciari E : **Gonadal and adrenal secretion of dehydroepiandrosterone sulphate in prepubertal and pubertal subjects.** J Endocrinol Invest 4:197-202, 1981.
- Ebeling P, Koivisto V.A : **Physiological importance of dehydroepiandrosterone.** Lancet 343:1479-1481, 1994.

XVIII. *PODSUMOWANIE PROTOKOŁU*

	CAŁKOWITA LICZBA ZLICZEŃ μl	KALIBRATORY μl	PRÓBK KONTROLE μl
Kalibratory (0 - 5) Próbki, kontrole Znacznik izotopowy	- - 500	10 - 500	- 10 500
Inkubacja	1 godzina w temperaturze 37°C w łaźni wodnej		
Rozdzielenie Roboczy roztwór płuczący Rozdzielenie Roboczy roztwór płuczący Rozdzielenie	-	Aspiracja 2,0 ml Aspiracja 2,0 ml Aspiracja ostrożnie	
Zliczanie	Zliczanie probówek przez 60 sekund		



Прочетете целия протокол преди употреба

DHEA-S-RIA-CT

I. УПОТРЕБА

Радиоимунно изследване за количествено измерване *in vitro* на съдържанието на човешки 5-андростен-3 β -OL-17-дион сулфат (дехидроепиандростерон сулфат или DHEA-S) в серум.

II. ОБЩА ИНФОРМАЦИЯ

- A. Патентовано име: DIAsource DHEA-S-RIA-CT Kit
- B. Каталоген номер: KIP0481: 96 теста
- C. Произведено от: DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

За техническа помощ или поръчка:
Тел.: +32 (0)10 84.99.11 Факс: +32 (0)10 84.99.91

III. КЛИНИЧЕН ПРЕГЛЕД

A. Биологична активност

Дехидроепиандростеронът (DHEA) и неговата сулфатирана форма, DHEA-S, са произвежданите в най-големи количества стероидни продукти на надбъбречните жлези. Надбъбречната жлеза е единственият източник на тези стероиди при жените, но при мъжете такива се произвеждат в малки количества и в тестисите. Образуването на DHEA се стимулира от адренкортикотропния хормон, предизвикващ значителна денонощна вариация в серумните концентрации. DHEA бързо се преобразува в DHEA-S от ензим, наличен в надбъбречните жлези, черния дроб и тънкото черво. DHEA-S е наличен в концентрации, надвишаващи 200 пъти тези на DHEA и има по-дълъг полуживот, което в значителна степен намалява денонощните вариации.

Старенето оказва влияние върху ендокринната преходна структура, включително върху DHEA-S, който може да се счита за биомаркер на старенето, тъй като неговите нива постепенно намаляват с възрастта. Плазмените нива на DHEA-S се увеличават стабилно от около седмата година на живота и постепенно започват да намаляват след третото десетилетие.

DHEA е 19-въглероден стероид с молекулно тегло от 288 Kd и полуживот в плазмата от около 1-3 часа. Молекулното тегло на DHEA-S е 368.5 Kd, а полуживотът - около 10-20 часа. DHEA се формира от прегненолона при наличието на ензима 17,20 десмолаза и се метаболизира в андростендион или тестостерон съответно от 3-бета или 17-бета-хидростероид дехидрогеназа. Хидростероид сулфатазата превръща DHEA в DHEA-S, а сулфохидролазата обръща посоката на тази реакция.

B. Клинични приложения

Повишени нива на DHEA-S се откриват в плазмата на пациенти с бъбречни тумори или с вродена хиперплазия на надбъбречните жлези. Нивата на DHEA-S могат да са леко повишени и при пациенти с поликистозни яйчници, поддържащи вирилизацията на надбъбречния компонент, наблюдавана при това състояние. Тумори в произвеждания ЧХГ при мъжете може да доведе до увеличено производство на DHEA в тестисите.

DHEA-S често пъти се изследва заедно със свободния тестостерон като начално скринингово изследване за хиперандрогенизъм при хирсутизъм. Понякога DHEA-S е единственият хормон, циркулиращ при нива над нормалните и очевидно е по-вероятно да бъде с по-високи нива през ранните стадии на хирсутизъм, отколкото тези на останалите андрогени.

Обикновено DHEA-S не се изявява при наличието на бъбречна недостатъчност или панхипопитуитаризъм. Концентрациите са леко понижени при бременност и при орално приемане на контрацептиви и подчертано понижени след прием на глюкокортикостероиди.

Ниски циркулиращи концентрации се наблюдават при остри заболявания и при пациенти със СПИН.

IV. ПРИНЦИПИ НА МЕТОДА

Определено количество натоварен с ¹²⁵I DHEA-S се конкурира с наличния в проба или калибратор DHEA-S, подлежащ на измерване, за определено количество центрове на специфични антитела, имобилизирани към стените на полистиролова епруветка. След едночасова инкубация при 37°C във водна баня конкурентната реакция приключва с аспирация. След това епруветките се измиват два пъти с 2 ml Работен Измиващ Разтвор и се аспирират. Начертава се калибрационна крива, а концентрациите на DHEA-S в пробите се определят чрез интерполация на дозата от калибрационната крива.

V. ИЗПОЛЗВАНИ РЕАГЕНТИ

Реагенти		Количество 96 теста	Цветен код	Приготвяне		
 Епруветки, покрити с анти-DHEA-S		2 x 48	Слонова кост	Готов за употреба		
<table border="1"><tr><td>Ab</td><td>¹²⁵I</td></tr></table>	Ab	¹²⁵ I	1 флакон 55 ml 450 kBq	червен	Готов за употреба	
Ab	¹²⁵ I					
ПРОСЛЕДЯВАЩО ВЕЩЕСТВО: DHEA-S, натоварен с ¹²⁵ йод (HPLC скала) в буфер с волски албумин и азид (<0.1%)						
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table>	CAL	0	1 флакон лиофилизирани	жълт	Добавете 0,5 ml дестилирана вода	
CAL	0					
Нулев Калибратор в човешки серум с тимол						
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table>	CAL	N	5 флакона лиофилизирани	жълт	Добавете 0,5 ml дестилирана вода	
CAL	N					
Калибратор - N = 1 до 5 (виж точните стойности на етикета на флаконите) в човешки плазма с тимол						
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table>	WASH	SOLN	CONC	1 флакон 10 ml	кафяв	Разредете 70x с дестилирана вода (използвайте магнитен сепаратор)
WASH	SOLN	CONC				
Измиващ разтвор (TRIS-HCl)						
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table>	CONTROL	N	2 флакона лиофилизирани	сребърен	Добавете 0.5 ml дестилирана вода	
CONTROL	N					
Контроли 1 и 2 в човешки плазма с тимол (виж точните стойности на етикета на флаконите)						

Забележка: Използвайте нулевия калибратор за серумните разреждания.

VI. СРЕДСТВА, КОИТО НЕ СЕ ОСИГУРЯВАТ

Следните материали са необходими, но не се осигуряват в набора:

- 1. Дестилирана вода
- 2. Пипети от: 10 µl и 500 µl (препоръчва се използването на прецизни пипети с накрайници за еднократна употреба).
- 3. Завихрящ смесител
- 4. Магнитен сепаратор
- 5. Водна баня при 37°C
- 6. 5 ml автоматична спринцовка (тип Comwall) за измиване
- 7. Аспирационна система (по избор).
- 8. Всякакъв гама брояч, който може да измери употребеното количество ¹²⁵I (минимален капацитет от 70%)

VII. ПРИГОТВЯНЕ НА РЕАГЕНТА

- A. **Калибратори** : Реконституирайте калибраторите с 0,5 ml дестилирана вода.
- B. **Контроли: Реконституирайте** контролите с 0,5 ml дестилирана вода.
- C. **Работен измиващ разтвор:** Подгответе адекватен обем от работния измиващ разтвор чрез добавянето на 69 обема дестилирана вода към 1 обем от измивания разтвор (70x). Използвайте магнитен сепаратор, за да хомогенизирате. Изхвърлете неупотребеното количество от работния измиващ разтвор в края на деня.

VIII. СЪХРАНЕНИЕ И СРОК НА ГОДНОСТ НА РЕАГЕНТИТЕ

- Всички компоненти на кита са стабилни до датата на срока на годност, посочен на опаковката, при температура на съхранение от 2 °C до 8°C преди отваряне или реконституиране.
- След реконституиране, калибраторите и контролите са стабилни за срок от 7 дни при температури 2-8°C. За по-дълги срокове на съхранение, се определя кратно и се съхранява при температура -20 °C за максимум 3 месеца. Избягвайте последващи цикли на замразяване-размразяване.
- Прясно приготвения Работен измиващ разтвор трябва да бъде използван същия ден.
- След първата употреба, трейсера е стабилен до изтичане срока на годност, ако се съхранява в оригиналния добре затворен флакон при температури 2-8°C.
- Промени във физическия вид на реагентите на кита индицират нестабилност или негодност.

IX. СЪБИРАНЕ НА ПРОБИТЕ И ОБРАБОТКА

- Серумът трябва да се съхранява при температури 2-8°C.
- Ако тестът не се направи в рамките на 24 часа, се препоръчва съхранение при температура -20°C.
- Избягвайте последващи цикли на замразяване-размразяване.

X. ПРОЦЕДУРА

A. Общи бележки

Не използвайте кита или компонентите му след датата на изтичане срока на годност. Не смесвайте материали от различни партии китове. Преди употреба оставете всички реагенти на стайна температура (18-25°C). Внимателно смесвайте всички реагенти с пробите чрез нежно раклащане или въртеливо размесване. За да избегнете кръстосана контаминация, използвайте чист пипетен накрайник за еднократна употреба за добавянето на всеки реагент към съответната проба. Високо прецизираните пипети или автоматичните пипети биха подобрили точността. Съобразявайте се с времето за инкубация. Подгответе калибрационна крива за всяко измерване и не използвайте данни от предишни измервания. Всяка епруветка може да се използва само веднъж.

B. Процедура

1. Означете две по две покритите епруветки за всеки калибратор, контрола и проба. За определяне на общия брой импулси, обозначете 2 нормални епруветки.
2. Разклатете за кратко време калибраторите, контролите и пробите и разпределете по 10 µl от всяко в съответните епруветки.
3. Разпределете 500 µl DHEA-S, натоварен с ¹²⁵йод във всяка епруветка, включително в непокритите епруветки за общото преброяване.
4. Разклатете нежно с ръка контейнера с епруветките, за да освободите всяко останало въздушно мехурче.
5. Инкубирайте за 1 час при 37°C във водна баня.
6. Аспирирайте (или прелейте) съдържанието на всяка епруветка (освен епруветките за определяне на общия брой импулси). Уверете се, че пластмасовият край на аспиратора достига дъното на покритата епруветка, за да може да отстрани цялата течност.
7. Измийте епруветките с 2 ml Работен Разтвор за измиване (с изключение на общия брой) и аспирирайте (или прелейте). Избягвайте разпенване по време на добавянето на Работния Разтвор за измиване.
8. Измийте епруветките с 2 ml Работен Разтвор за измиване (с изключение на общия брой) и аспирирайте (или прелейте). Избягвайте разпенване по време на добавянето на Работния Разтвор за измиване.
9. Оставете епруветките в изправено положение за две минути и аспирирайте останалите капки течност.
10. Отчетете епруветките в гама брояч за 60 секунди.

XI. ИЗЧИСЛЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

1. Изчислете средното аритметично на резултатите, получени от две по две епруветките.
2. Изчислете свързващата радиоактивност като процент от свързването, определен при нулевата калибрационна точка (0) според следната формула :
3. Нанесете (B/B0(%)) стойностите за всяка калибрационна точка като функция на DHEA-S концентрацията на всяка калибрационна точка. Отхвърлете очевидните отклонения..

$$B/B0 (\%) = \frac{\text{брой (Калибратор и проба)}}{\text{брой (Нулев Калибратор)}} \times 100$$

- Компютърно асистирани методи също могат да бъдат използвани, за да се построи калибрационната крива. Ако се използва автоматичен метод на обработка на резултатите, се препоръчва подходяща 4-параметрова логистична крива.
- Чрез интерполация на (B/B0 (%)) стойностите от пробата се определят DHEA-S концентрациите на пробите от калибрационната крива.
- Процентът на общото проследяващо вещество, свързано при липса на ненатоварен DHEA-S (B0/T), трябва да се провери за всяко изследване.

XII. ХАРАКТЕРНИ ДАННИ

Данните, изложени по-долу са само за илюстрация и никога не бива да се използват вместо истинската калибрационна крива.

DHEA-S-RIA-CT		cpm	B/Bo (%)
Общ брой		164710	
Калибратор	0,0 µg/dl	34266	100,0
	1,7 µg/dl	31393	91,6
	9,7 µg/dl	21411	62,5
	41,0 µg/dl	11078	32,3
	219,0 µg/dl	3398	9,9
	1090,0 µg/dl	877	2,6

Конверсионен фактор:

От µg/dl до µmol/L : x 0,0271

От µmol/L до µg/dl : x 36,85

XIII. ИЗПЪЛНЕНИЕ И ОГРАНИЧЕНИЯ

A. Определен лимит

Двадесет нулеви калибратора са били изпитани заедно с комплект от други калибратори. Определения лимит, дефиниран като явната концентрация на две стандартни отклонения над средния брой при нулево свързване, е бил 1,23 µg/dl.

B. Специфичност

Специфичността на използваното за това изследване поликлонално анти тяло бе определено на базата на радиоимунно изследване (RIA), като съотношение между количеството на DHEA-S, предизвикващ 50% инхибиране на свързването на натоварения DHEA-S, и количеството на съединенията с кръстосана реактивност (анализи), предизвикващи същото инхибиране.

Съединение	Кръстосана реактивност (%)
DHEA-S	100,00
DHEA	< 0,05
DHEA-глюкуронид	< 0,05
Андростенедиол	< 0,05
Естрон-сулфат	0,08
5α-дихидротестостерон	< 0,05
Тестостерон	< 0,05

Забележка: В тази таблица е показана кръстосаната реактивност на анти-DHEA-S.

C. Прецизност

ПО ВРЕМЕ НА ИЗПИТВАНЕТО

ПО ВРЕМЕ НА ИЗПИТВАНЕТО				МЕЖДУ ИЗПИТВАНЕТО			
Серум	N	<X> ± SD (µg/dl)	CV (%)	Серум	N	<X> ± SD (µg/dl)	CV (%)
A	20	32,1 ± 1,9	5,9	A	12	30,8 ± 2,0	6,5
B	20	107,4 ± 5,1	3,6	B	12	105,5 ± 6,5	6,5

SD : Стандартно отклонение; CV: Коефициент на вариация

D. Точност

ТЕСТ С РАЗРЕЖДАНЕ

Проба	Разреждане	Теоретична концентрация (µg/dl)	Измерена концентрация (µg/dl)
Серум 1	1/1	389,6	
	1/2	194,8	168,1
	1/4	97,4	92,3
	1/8	48,7	50,7
	1/16	24,3	27,1
Серум 2	1/1	85,0	
	1/2	42,5	38,3
	1/4	21,2	19,0
	1/8	10,6	10,6
	1/16	5,3	7,0

Пробите бяха разредени с нулев калибратор

ВЪЗСТАНОВИТЕЛЕН ТЕСТ

Проба	добавен DHEA-S (µg/dl)	Теоретично DHEA-S (µg/dl)	Измерено DHEA-S (µg/dl)	Възстановен (%)
Серум	0	NA	26,0	NA
	25	51	59,7	117
	50	76	80,6	106
	100	126	128,1	101,6

Доколкото ни е известно, за този параметър не съществува международен референтен материал.

E. Закъснение

Както е показано по-долу, резултатите от изпитването остават точни дори когато пробата е разпределена 30 минути след като калибраторът е бил добавен към покритата епруветка.

Закъснение

Серум µg/dl	0'	10'	20'	30'
Серум 1	30,8	33,8	31,5	31,2
Серум 2	98,5	113,5	118,2	102,5

XIV. ВЪТРЕШЕН КАЧЕСТВЕН КОНТРОЛ

- Ако резултатите, получени за Контрола 1 и/или Контрола 2 не са в рамките на нивото, указано на етикета на флакона, то резултатите не могат да бъдат използвани, освен ако не се предостави задоволително обяснение на това несъответствие.
- По желание, всяка лаборатория може да си направи собствен комплект от контролни проби, които трябва да се съхраняват замразени в кратни съотношения.
- Критериите за приемане на разликата от двойните резултати на пробите трябва да се опират на Добрата Лабораторна Практика.

XV. РЕФЕРЕНТНИ ИНТЕРВАЛИ

Стойностите, показани по-долу, са предоставени само за напътствие; всяка лаборатория трябва да установи свои собствен нормален обхват на стойности.

Интервалите са изразени като процентни стойности: от 2,5% до 97,5%.

Субекти (възрастови групи)	Брой	Средно аритметично (µg/dl)	Диапазон *
Жени			
< 15	15	129,7	37,8 - 264,5
15-19	19	276,7	117,3 - 531,0
20-24	16	244,0	118,7 - 428,9
25-29	33	197,5	70,2 - 413,4
30-34	29	175,1	75,2 - 398,7
35-39	23	162,0	63,3 - 291,4
40-44	19	144,4	37,3 - 255,8
45-49	13	109,8	20,9 - 198,0
50-54	16	117,0	26,8 - 375,4
55-59	13	102,9	34,5 - 178,1
60-64	10	92,8	24,6 - 182,3
> 65	15	114,3	6,3 - 377,0
Мъже			
< 15	14	138,9	34,9 - 284,1
15 - 50	42	262,2	80,5 - 479,4
> 50	37	177,6	51,8 - 470,7

XVI. ПРЕДПАЗНИ МЕРКИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

Безопасност

Само за *in vitro* диагностика.

Този набор съдържа ¹²⁵I (полуживот: 60 дни), емитиращ йонизиращи X (28 keV) и γ (35.5 keV) лъчения.

Този радиоактивен продукт може да се пренася и да се използва само от оторизирани лица; покупката, съхранението, употребата и размяната на радиоактивни продукти са предмет на законодателството на държавата, на крайния потребител. Този продукт не бива в никакъв случай да се прилага на хора или животни.

Боравенето с радиоактивния продукт трябва да се извършва в определена за целта територия, далеч от регулярни зони на преминаване. В лабораторията трябва да се поддържа дневник за получаването и съхранението на радиоактивни материали. Лабораторната екипировка и стъклария, които могат да бъдат контаминирани с радиоактивни субстанции, трябва да бъдат отделени с цел да се избегне кръстосана контаминация с различни радионуклиди.

Всякакви радиоактивни пръски трябва да се почистват незабавно в съответствие с процедурите за радиационна безопасност. Радиоактивните отпадъци трябва да се изхвърлят, следвайки местните наредби и ръководства на властите, упражняващи юрисдикцията, над лабораториите. Придържането към основните правила за радиационна безопасност осигуряват адекватна защита.

Човешките кръвни компоненти, включени в кита, са били тествани чрез одобрени от Европейски и/или FDA (Американска агенция по храните и лекарствата) методи и са дали отрицателен резултат за HbsAg, анти-HCV, анти-HIV-1 и 2. Няма известен метод, който да дава пълна гаранция за това, че човешките кръвни деривати не пренасят хепатит, СПИН или други инфекции. Ето защо, боравенето със реагентите, серумните или плазмените проби трябва да бъде в съответствие с местните процедури по безопасност.

Всички животински продукти и деривати са били събирани от здрави животни. Волските компоненти са с произход от страни, където BSE (волска серумна енцефалопатия) не е била установявана. Независимо от това, компонентите, съдържащи животински субстанции трябва да се третират като потенциално инфекциозни.

Избягвайте какъвто и да било кожен контакт с реагентите (съдържат натриев азид като консервант). Азидът в този кит може да реагира с оловото и медта във водопроводните инсталации като по този начин се получават силно експлозивни метални азиди. По време на измивния етап, промийте със силна и обилна струя вода канализацията, за да избегнете формирането на азиди.

Не пушете, не пийте, не яжте и не си слагайте козметика в работната територия. Не пипетирайте с уста. Използвайте защитно облекло и ръкавици за еднократна употреба.

За повече информация вижте Информационен лист за безопасност на материалите (MSDS)

XVII. БИБЛИОГРАФИЯ

- Orentreich N, BrindJ, Rizer R, Vogelmann J : **Age changes and sex differences in serum dehydroepiandrosterone sulphate concentrations**

throughout adulthood. J Clin Endocrinol Metab 59:551-555, 1984.

- Orentreich N, Brind J, Vogelmann J, Andres R, Baldwin H. : **Long-term longitudinal measurements of plasma dehydroepiandrosterone sulphate in normal men.** J Clin Endocrinol Metab 75:1002-1004, 1992.
- Abbasi A, Drinka P, Mattson D, Rudman D : **Low circulating levels of insulin-like growth factors and testosterone in chronically institutionalized elderly men.** J Am Geriatr Soc 41:975-981, 1993.
- Belanger A, Candas B, Dupont A et al. : **Changes in serum concentrations of conjugated and unconjugated steroid in 40 to 80 year old men.** J Clin Endocrinol Metab 79:1086-1090, 1994.
- Borst S, Millard W, Lowenthal D : **Growth hormone, exercise, and aging : the future of therapy for the frail elderly.** J Am Geriatr Soc 42:528-535, 1994.
- Morales A, Nolan J, Nelson J, Yen S : **Effects of replacement dose of dehydroepiandrosterone in men and women of advancing age.** J Clin Endocrinol Metab 78:1360-1367, 1994.
- Tenover J : **Androgen administration to aging men.** Clin Andol 23:877-892, 1994.
- Rosenfeld R, Rosenberg B, Fukushima D, Heuman L : **24 hour secretory pattern of dehydroepiandrosterone and dehydroandrosterone sulphate.** J Clin Endocrinol 40:850-855, 1975.
- Liu C, Laughlin G, Fischer U, Yen S : **Marked attenuation of ultradian and circadian rhythms of dehydroepiandrosterone in postmenopausal women : evidence for a reduced 17,20-desmolase enzymatic activity.** J Clin Endocrinol Metab 71:900-906, 1990.
- Thomas G, Frenoy N, Legrain S, Sebag-Lanoe R, Baulieu E, Debuire B : **Serum dehydroepiandrosterone sulphate levels as an individual marker.** J Clin Endocrinol Metab 79:1273-1276, 1994.
- Tissandier O, Peres G, Fiet J, Piette F : **Testosterone, dehydroepiandrosterone, insulin-like growth factor 1, and insulin in sedentary and physically trained aged men.** Eur J Appl Physiol 85:177-184; 2001.
- Guagnano MT, Del Ponte A, Manigrasso MR, Merlitti D, Pace-Palitti V, Sensi S : **Age-related circadian rhythm of DHEA-S plasma levels in male subjects.** Biological Rhythm Research 32,3:323-331, 2001.
- Derksen J, Nagesser S.K, Meinders A.E, Haak H.R, Van De Velde C.J.H : **Identification of virilizing adrenal tumors in hirsute women.** New Engl J Med 331(15):968-973, 1994.
- Lobo R.A, Paul W.L, Goebelsmann U : **dehydroepiandrosterone sulphate as an indicator of adrenal androgen function.** Obstet Gynecol 57:69-73, 1981.
- Cacciari E : **Gonadal and adrenal secretion of dehydroepiandrosterone sulphate in prepubertal and pubertal subjects.** J Endocrinol Invest 4:197-202, 1981.
- Ebeling P, Koivisto V.A : **Physiological importance of dehydroepiandrosterone.** Lancet 343:1479-1481, 1994.

XVIII. **ОБОБЩЕНИЕ НА ПРОТОКОЛА**

	ОБЩА АКТИВНОСТ µl	КАЛИБРАТОРИ µl	ПРОБА (II) КОНТРОЛИ µl
Калибратори (0-5) Проби, контроли Трейсър	- - 500	10 - 500	- 10 500
Инкубация	1 час при 37°C във водна баня.		
Сепарация Измиващ разтвор Сепарация Измиващ разтвор Сепарация	-	аспирирайте 2,0 ml аспирирайте 2,0 ml аспирирайте внимателно	
Броене	Отчетете епруветките за 60 секунди		



Olvassa el a teljes protokollt használat előtt!

DHEA-S-RIA-CT

I. FELHASZNÁLÁSI JAVASLAT

Humán 5-Androszten-3 β -OL-17-Dion Szulfát (Dehidro-epiandroszteron szulfát vagy DHEA Szulfát) in vitro mennyiségi meghatározása szérumból radioimmun módszerrel.

II. ÁLTALÁNOS INFORMÁCIÓ

- A. Védett név : DIAsource DHEA-S-RIA-CT Kit
- B. Katalógusszám : KIP0481 : 96 tests
- C. Gyártó : DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Technikai segítséget vagy rendeléssel kapcsolatos információt a következő elérhetőségeken kaphat:

Tel : +32 (0)10 84.99.11

Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. KLINIKAI HÁTTÉR

A. Biológiai szerepe

Dehidroepiandroszteron (DHEA) és a szulfát formája (DHEA-S), a mellékvese leggyakoribb szteroid termékei. A nőknél a mellékvese állítja elő egyedül ezeket a szteroid hormonokat, de a férfiaknál a heréknek is jut egy kis szerep e hormonok termelésében. Az ACTH hormon serkenti DHEA termelést, jelentős változás figyelhető meg a szérumban DHEA koncentrációjában naponta. DHEA gyorsan átalakul DHEA-S-tá a mellékvesékben, májban és vékonybélben lévő enzim hatására. A DHEA-S 200-szor nagyobb koncentrációban van jelen, mint a DHEA és hosszabb a felezési ideje is, ez nagymértékben eltűnteti a napi koncentrációváltozást.

Az öregedés hatással van az endokrin időbeli szerkezetére, beleértve a DHEA-S-ot is, mely tekinthető az öregedés biomarkerének, mivel a szintje fokozatosan csökken az öregedő alanyokban. A DHEA-S szintje a plazmában folyamatosan növekszik a hetedik életévtől, majd a szintje a harmadik évtized után fokozatosan csökkenni kezd.

DHEA egy 19 szénatomból álló szteroid, melynek molekula tömege 288 Kd, felezési ideje a plazmában körülbelül 1-3 óra. A DHEA-S molekula tömege 368.5 Kd, a felezési ideje körülbelül 10-20 óra. DHEA pregnenolonból származik, melyet a 17,20 demoláz enzim alakít át és metabolizál androsztenedionná vagy tesztoszteronná a 3 béta- vagy a 17 béta-hidroszteroid dehidrogenáz által. Hidroszteroid szulfatáz alakítja át DHEA-t DHEA-S-tá és a szulfohidroláz alakítja vissza ezt a reakciót.

B. Klinikai alkalmazás

Mellékvese daganat vagy veleszületett mellékvese hiperplázia esetén emelkedett DHEA-S szintje a beteg plazmájában. DHEA-S szintje szintén kissé emelkedett olyan betegeknél akiknek policisztás petefészkek van és virilizáció is megfigyelhető rajtuk melyet a mellékvese komponense okoz. A férfiakban lévő HCG-t termelő tumorok fokozzák a herék DHEA termelését.

DHEA-S gyakran együtt vizsgálják a szabad tesztoszteronnal, a hiperandrogenizmus és a vele együtt járó hirsutizmus kezdeti szűréseként. Néha DHEA-S az egyetlen hormon, mely a normál szintnél magasabb szinten kering a rendszerben, és nagy valószínűséggel emelkedett a szintje a hirsutizmus kezdeti stádiumában, mint a legtöbb más androgénnek.

A DHEA-S gyakran észrevehetetlen a mellékvese elégtelenségénél vagy panhipopituitarizmusnál. A DHEA-S koncentrációja enyhén csökken a terhesség alatt és orális fogamzásgátlók használata során, valamint jelentősen csökken a koncentrációja glükokortikoid beadásakor.

Az alacsony keringési koncentráció számos betegségre utal és az AIDS fertőzött betegekre is jellemző.

IV. A VIZSGÁLAT ELVE

A 125I-al jelzett állandó mennyiségű DHEA-S vetélkedik a mintában vagy a kalibrátorban jelenlévő (mérendő) jelzetlen DHEA-S-val a polisztirol cső falára immobilizált korlátozott számú antitest köthelyekért. 37°C-os vízfürdőben történő 1 órás inkubáció után a folyadék leszívás leállítja a kompetitív reakciót. A csöveket ezután kétszer mosóoldattal mossák és leszívják.

Egy kalibrációs görbét ábrázolva a minták DHEA-S koncentrációi meghatározhatóak a kalibrációs görbéről dózis interpolációval.

V. A REAGENSKÉSZLET TARTALMA

Reagens	96 teszt készlet	Színkód	Összetétel			
 DHEA-S-val bevont csövek	2 x 48	elefántcsont	Használatra kész.			
<table border="1"><tr><td>Ag</td><td>¹²⁵I</td></tr></table> TRACER: ¹²⁵ Jóddal jelzett DHEA-S (HPLC minőségű) szarvasmarha szérum albumin és azid (<0.1%) tartalmú pufferben	Ag	¹²⁵ I	1 ampulla 55 ml 450 kBq	piros	Használatra kész.	
Ag	¹²⁵ I					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Nulla kalibrator humán szérumban, timol	CAL	0	1 ampulla liofilizált	sárga	Adjon hozzá 0.5 ml disztillált vizet.	
CAL	0					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> DHEA-S - N Kalibrátorok = 1-től 5-ig (lásd az ampulla címkéjén a pontos mennyiséget) humán plazma, timol	CAL	N	5 ampulla liofilizált	sárga	Adjon hozzá 0.5 ml disztillált vizet.	
CAL	N					
Mosóoldat (TRIS-HCl)	1 ampulla 10 ml	barna	Hígítsa desztillált vízzel 70 x (használjon mágneses keverőt).			
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table>	WASH	SOLN	CONC			
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Kontrolok - N = 1 vagy 2 humán plazma, timol (lásd az ampulla címkéjén a pontos mennyiséget)	CONTROL	N	2 ampulla liofilizált	ezüst	Adjon hozzá 0.5 ml disztillált vizet.	
CONTROL	N					

Megjegyzés: A minták nulla kalibrátorral hígítottak.

VI. SZÜKSÉGES ANYAGOK ÉS ESZKÖZÖK

További szükséges anyagok a készlethez:

- 1. Disztillált víz
- 2. 10 µl-es és 500 µl-es pipetta (ajánlott eldobható, műanyag hegyeket alkalmazni a pipettákhoz)
- 3. Vortex keverő
- 4. Mágneses keverő
- 5. 37°C-os vízfürdő
- 6. 5 ml-es (Cornwall típusú) automata fecskendő a mosáshoz
- 7. Elszívó rendszer (nem kötelező)
- 8. ¹²⁵I izotóp mérésére alkalmas gamma számláló használható (minimális hozam 70%).

VII. REAGENSEK ELŐKÉSZÍTÉSE

- A. **Kalibrátorok** : Oldja fel a kalibrátorokat 0,5 ml disztillált vízben.
- B. **Kontrollak**: Oldja fel a kontrolokat 0,5 ml vízben.
- C. **Felhasználásra kész mosóoldat**: Készítsen megfelelő mennyiségű mosóoldatot, úgy hogy egy egységnyi mosóoldathoz 69 egység desztillált vizet ad (70x). A homogenizáláshoz használjon mágneses keverőt. A nap végén öntse ki a megmaradt mosófolyadékot.

VIII. REAGENSEK TÁROLÁSA ÉS ELTARTHATÓSÁGA

- A készletben megtalálható összes reagens - kinyitás és feloldás előtt – felhasználható a csomagoláson feltüntetett szavatossági ideig, amennyiben 2-8°C-on tárolják.
- Feloldás után a kalibrátorok és a kontrolok egy hétig 2-8 °C-on stabilak maradnak. Hosszabb tárolási idő esetén, aliquotolja és -20°C-on maximum 3 hónapig tárolja. Kerülje az egymást követő fagyasztást és felolvasztást.
- A frissen elkészített mosófolyadékot aznap fel kell használni.
- Az első használat után a tracer akkor marad stabil, ha az eredeti, jól záródó edényben 2-8°C-on tárolják.
- A kitben található reagensok instabilitását vagy megromlását fizikai tulajdonságainak megváltozása jelezheti.

IX. MINTAVÉTEL ÉS ELŐKÉSZÍTÉS

- A szérum mintákat 2-8°C-on kell tartani.
- Ha a minta 24 órán belül nem kerül futtatásra, -20°C-on aliquotoltan ajánlott tárolni.
- Kerülje az egymást követő fagyasztást és visszaolvasztást.

X. A VIZSGÁLAT MENETE

A. Tudnivalók

Ne használja a reagenset lejárati időn túl. Ne keverje össze a különböző gyártási számú reagenset. Használat előtt várja meg, hogy a reagens szobahőmérsékletűek (18-25°C) legyenek. Enyhe mozzgatással vagy keveréssel alaposan keverje össze a reagenset és mintákat. A keresztszennyeződés elkerülése érdekében használjon új eldobható pipetta hegyeket a minták és a reagens kimérésénél. Nagy precizitású vagy automata pipetták használata növeli a mérés precizitását. Tartsa be az inkubálási időket. Minden egyes futtatáshoz készítsen kalibrációs görbét, ne használja a korábbi mérések adatait. Minden cső csak egyszer használható fel.

B. A vizsgálat menete

- 1. Jelöljön meg két példányban bevonatos csövet minden egyes kalibrátornak, kontrollnak és mintának. Jelöljön meg két normál csövet a totál aktivitás meghatározásához.
- 2. Röviden vortex segítségével homogenizálja a kalibrátorokat, kontrolokat és mintákat. Pipettázon mindegyikből 10 µl-t a megfelelő csövekbe.
- 3. Mérjen 500 µl of ¹²⁵Jóddal jelzett DHEA-S-t minden egyes csöbe, beleértve a bevonat nélküli totál csöveket is.
- 4. Óvatosan rázza meg kézzel a csőtartó állványt, hogy felszabadítsa a légbuborékokat.
- 5. Inkubálja 1 órán át 37°C-os vízfürdőben.
- 6. Szívja le (vagy dekantálja) minden egyes cső tartalmát (kivéve a totálokat). Annak érdekében, hogy az összes folyadékot eltávolítsa, ügyeljen arra, hogy az aspirátor műanyag hegye elérje a bevonatos cső alját.
- 7. Mossa a csöveket 2 ml mosóoldattal (kivéve a totálokat) és szívja le (vagy dekantálja). Kerülje el a habképződést a mosóoldat hozzáadása közben.
- 8. Mossa a csöveket 2 ml mosóoldattal (kivéve a totálokat) és szívja le (vagy dekantálja). Kerülje el a habképződést a mosóoldat hozzáadása közben.
- 9. Tartsa a csöveket 2 percig felfelé állítva és szívja le a maradék folyadékcseppeket.
- 10. Mérje meg a csöveket gamma számlálóval 60 másodpercig.

XI. EREDMÉNYSZÁMÍTÁS

- 1. Számítsa ki a párhuzamos mérések középértékét.
- 2. Az alábbi képlettel számítsa ki a kötött radioaktivitást, a nulla kalibrátor pontnál mért kötési százalék alapján

$$B/B_0(\%) = \frac{\text{Beütésszám (Kalibrátor vagy minta)}}{\text{Beütésszám (Nulla Kalibrátor)}} \times 100$$

3. Ábrázolja az egyes kalibrátorok értékeit (B/B0(%)) minden egyes kalibrátor DHEA-S koncentrációjának függvényében. Ne használja az egyértelműen kiugró adatokat.
4. A kalibrációs görbe számítógép segítségével is szerkeszthető. Ha az automatikus adatfeldolgozást használja, négy paraméteres logisztikus görbeillesztés használata javasolt.
5. A minták (B/B0 (%)) értékeinek interpolációjával a minták DHEA-S koncentrációi leolvashatók a kalibrációs görbéről.
6. Minden egyes vizsgálatnál ellenőrizni kell a kötött totál tracer százalékot a jelöletlen DHEA-S hiányában.

XII. JELLEMZŐ ADATOK

A következő adatok csak tájékoztató jellegűek, ne használja kalibrációs görbe helyett a méréseknél.

DHEA-S-RIA-CT		cpm	B/Bo (%)
Totál		164710	
Kalibrátor	0,0 µg/dl	34266	100,0
	1,7 µg/dl	31393	91,6
	9,7 µg/dl	21411	62,5
	41,0 µg/dl	11078	32,3
	219,0 µg/dl	3398	9,9
	1090,0 µg/dl	877	2,6

Átváltási tényező:
µg/dl-ről µmol/l-re : x 0,0271
µmol/l-ről µg/dl-re : x 36,85

XIII. MINŐSÉGI JELLEMZŐK

- A. Kimutatási határ
20 nulla kalibrátort (vakoldatot) vizsgáltak egy másik sorozat kalibrátorral szemben. A kimutatási határ definíció szerint az a látszólagos koncentráció, ami a nulla kötődésre kapott átlag beütésszám két standard deviációval csökkentett értékének felel meg, jelen esetben 1,23 µg/dl.
- B. Specifititás

Ennél a vizsgálatnál használt poliklonális ellenanyag specifitása RIA-val került kiértékelésre a DHEA-S mennyiségének arányaként. Ez a jelölt DHEA-S kötési kapacitását 50%-al csökkenti és a keresztreagáló anyagok (analógok) mennyisége is ugyanezt a gátlást okozzák.

Anyag	Kereszt-reaktivitás (%)
DHEA-S	100,00
DHEA	< 0,05
DHEA-Glükuronid	< 0,05
Androsztendiol	< 0,05
Ösztön-Szulfát	0,08
5α-Dihidrtesztozteron	< 0,05
Tesztozteron	< 0,05

Megjegyzés : Ez a táblázat az anti DHEA-S kereszt-reaktivitását mutatja.

C. Pontosság (Precision)

VIZSGÁLATON BELÜLI				VIZSGÁLATOK KÖZÖTTI			
Szérum	N	<> ± SD (µg/dl)	CV (%)	Szérum	N	<> ± SD (µg/dl)	CV (%)
A	20	32,1 ± 1,9	5,9	A	12	30,8 ± 2,0	6,5
B	20	107,4 ± 5,1	3,6	B	12	105,5 ± 6,5	6,5

SD: Szórás; CV: Variációs koefficiens

D. Precizitás (Accuracy)

HÍGÍTÁSI TESZT			
Minta	Hígítás	Elméleti koncentráció (µg/dl)	Mért koncentráció (µg/dl)
Szérum 1	1/1	389,6	
	1/2	194,8	168,1
	1/4	97,4	92,3
	1/8	48,7	50,7
	1/16	24,3	27,1
Szérum 2	1/1	85,0	
	1/2	42,5	38,3
	1/4	21,2	19,0
	1/8	10,6	10,6
	1/16	5,3	7,0

A minták nulla kalibrátorral hígítottak.

VISSZANYERHETŐSÉGI TESZT				
Minta (µg/dl)	Hozzáadott DHEA-S (µg/dl)	Elméleti DHEA-S (µg/dl)	Mért DHEA-S (µg/dl)	Visszanyerhetőség %
Szérum	0	NA	26.0	NA
	25	51	59.7	117
	50	76	80.6	106
	100	126	128.1	101.6

A legjobb tudásunk szerint erre a paraméterre nem létezik nemzetközi referencia anyag.

E. Az utolsó kalibrátor és a minta bemérése között eltelt idő

A következő táblázatban látható, hogy a módszer eredményei még akkor is pontosak maradnak, ha a mintákat 30 percel a kalibrátor hozzáadása után adagolják a bevont csövekhez.

ELTELT IDŐ				
Szérum (µg/dl)	0'	10'	20'	30'
Szérum 1	30,8	33,8	31,5	31,2
Szérum 2	98,5	113,5	118,2	102,5

XIV. BELSŐ MINŐSÉGELLENŐRZÉS

- Ha a Kontrol 1 és/vagy Kontrol 2-nél kapott eredmények nem az üveg címkéjén feltüntetett tartományon belül esnek, az eredményt nem lehet felhasználni hacsak nem adott a különбözőség egyértelmű magyarázata.
- Igény esetén, minden laboratórium el tudja készíteni a saját kontrol mintakészletét, amelyet aliquotoltan kell fagyasztva tárolni.
- A minták duplikált eredményei közti különbségek elfogadásáról a Good Laboratory Practises-ben foglaltak az irányadók.

XV. REFERENCIA INTERVALLUMOK

A megadott értékek csak iránymutatásul szolgálnak, minen laboratóriumnak meg kell határoznia a saját normál értékeit. Az értékek 2.5% - 97.5% között vannak kifejezve.

Alanyok (korcsoport)	N	Átlag (µg/dl)	Tartomány *
Nő			
< 15	15	129,7	37,8 - 264,5
15-19	19	276,7	117,3 - 531,0
20-24	16	244,0	118,7 - 428,9
25-29	33	197,5	70,2 - 413,4
30-34	29	175,1	75,2 - 398,7
35-39	23	162,0	63,3 - 291,4
40-44	19	144,4	37,3 - 255,8
45-49	13	109,8	20,9 - 198,0
50-54	16	117,0	26,8 - 375,4
55-59	13	102,9	34,5 - 178,1
60-64	10	92,8	24,6 - 182,3
> 65	15	114,3	6,3 - 377,0
Férfi			
< 15	14	138,9	34,9 - 284,1
15 – 50	42	262,2	80,5 - 479,4
> 50	37	177,6	51,8 - 470,7

XVI. BIZTONSÁGI ELŐÍRÁSOK

Biztonság

Kizárólag *in vitro* diagnosztikai felhasználásra.

A reagenskészlet ¹²⁵I izotópot tartalmaz (felezési idő: 60 nap), ami X (28 keV) és γ (35.5 keV) ionizáló sugárzást bocsájt ki.

Ezt a radioaktív terméket csak engedélyezett személyek vehetik át és használhatják. A radioaktív termékek vásárlására, a raktározására, használatára és cseréjére a végfelhasználó országának törvényei érvényesek.

A termék semmilyen esetben sem alkalmazható embereken vagy állatokon.

A radioaktív anyagokkal egy erre kijelölt helyen kell dolgozni, távol a forgalmas helyektől. A radioaktív anyagok beérkezéséről és tárolásáról jegyzőkönyvet kell vezetni a laboratóriumban. A radioaktív anyagokkal szennyezett laboratóriumi felszerelést és üvegedényeket el kell különíteni, hogy elkerülje a különböző radioizotópokkal történő keresztszennyeződést.

A kiömlött radioaktív anyagokat azonnal el kell távolítani az erre vonatkozó szabályoknak megfelelően. A radioaktív hulladékot helyi előírások és az illetékes hatóság által megadott irányelvek szerint kezelje. A sugárzásvédelem alapvető szabályainak betartása megfelelő védelmet biztosít.

A készletben lévő human vér komponenseket európai szabványok és/vagy FDA által jóváhagyott módszerekkel tesztelték és HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 és 2 vizsgálatokra negatív eredményt adtak. Mivel egyik módszer sem tud tökéletes bizonyosságot mutatni a hepatitis, AIDS vírusok vagy egyéb más ágensek jelenlétéről, így ezeket és minden szérum vagy plazma mintát is fertőző betegséget terjesztésére képes anyagnak kell tekinteni, s helyi biztonsági szabályozásoknak megfelelően kell kezelni.

Minden állati termék és származékok egészséges állatokból gyűjtöttek. Szarvasmarha származék olyan országból származik, ahol nincs BSE járvány. Ennek ellenére, az állati eredetű komponenseket tartalmazó reagenseket potenciálisan fertőzőként kell kezelni.

Vigyázzon, hogy a reagensek bőrrel ne érintkezzenek (nátrium azid tartósítószer). A kitben található azid robbanásveszélyes fém-azidokat képezhet ólom és réz csővezetékek anyagával. Mosási lépés alatt öblítse át a lefolyót nagy mennyiségű vízzel, hogy megakadályozza az azid felhalmozódást.

Ne dohányozzon, igyon, egyen és ne használjon semmilyen kozmetikumot a labor területén. Ne pipettázzon szájjal. Használjon védőköpenyt és egyszer használatos gumikesztyűt.

További információ: Anyagbiztonsági adatlap (MSDS)

XVII. IRODALOM

- Orentreich N, BrindJ, Rizer R, Vogelman J : Age changes and sex differences in serum dehydroepiandrosterone sulphate concentrations throughout adulthood. J Clin Endocrinol Metab 59:551-555, 1984.
- Orentreich N, Brind J, Vogelman J, Andres R, Baldwin H. : Long-term longitudinal measurements of plasma dehydroepiandrosterone sulphate in normal men. J Clin Endocrinol Metab 75:1002-1004, 1992.

- Abbasi A, Drinka P, Mattson D, Rudman D : Low circulating levels of insulin-like growth factors and testosterone in chronically institutionalized elderly men. J Am Geriatr Soc 41:975-981, 1993.
- Belanger A, Candas B, Dupont A et al. : Changes in serum concentrations of conjugated and unconjugated steroid in 40 to 80 year old men. J Clin Endocrinol Metab 79:1086-1090, 1994.
- Borst S, Millard W, Lowenthal D : Growth hormone, exercise, and aging : the future of therapy for the frail elderly. J Am Geriatr Soc 42:528-535, 1994.
- Morales A, Nolan J, Nelson J, Yen S : Effects of replacement dose of dehydroepiandrosterone in men and women of advancing age. J Clin Endocrinol Metab 78:1360-1367, 1994.
- Tenover J : Androgen administration to aging men. Clin Andol 23:877-892, 1994.
- Rosenfeld R, Rosenberg B, Fukushima D, Heuman L : 24 hour secretory pattern of dehydroepiandrosterone and dehydroandrosterone sulphate. J Clin Endocrinol 40:850-855, 1975.
- Liu C, Laughlin G, Fischer U, Yen S : Marked attenuation of ultradian and circadian rhythms of dehydroepiandrosterone in postmenopausal women : evidence for a reduced 17,20-desmolase enzymatic activity. J Clin Endocrinol Metab 71:900-906, 1990.
- Thomas G, Frenoy N, Legrain S, Sebag-Lanoe R, Baulieu E, Debuire B : Serum dehydroepiandrosterone sulphate levels as an individual marker. J Clin Endocrinol Metab 79:1273-1276, 1994.
- Tissandier O, Peres G, Fiet J, Piette F : Testosterone, dehydroepiandrosterone, insulin-like growth factor 1, and insulin in sedentary and physically trained aged men. Eur J Appl Physiol 85:177-184; 2001.
- Guagnano MT, Del Ponte A, Manigrasso MR, Merlitti D, Pace-Palitti V, Sensis S : Age-related circadian rhythm of DHEA-S plasma levels in male subjects. Biological Rhythm Research 32,3:323-331, 2001.
- Derksen J, Nagesser S.K, Meinders A.E, Haak H.R, Van De Velde C.J.H : Identification of virilizing adrenal tumors in hirsute women. New Engl J Med 331(15):968-973, 1994.
- Lobo R.A, Paul W.L, Goebelsmann U : dehydroepiandrosterone sulphate as an indicator of adrenal androgen function. Obstet Gynecol 57:69-73, 1981.
- Cacciari E : Gonadal and adrenal secretion of dehydroepiandrosterone sulphate in prepubertal and pubertal subjects. J Endocrinol Invest 4:197-202, 1981.
- Ebeling P, Koivisto V.A : Physiological importance of dehydroepiandrosterone. Lancet 343:1479-1481, 1994.

XVIII. A PROTOKOL ÖSSZEFOGLALÓJA

	TOTÁL μl	KALIBRÁTOROK μl	MINTA(K) KONTROLOK μl
Kalibrátorok (0-5) Minták, kontrolok Tracer	- - 500	10 - 500	- 10 500
Inkubáció	1 órán át 37°C-os vízfürdőben		
Elválasztás Mosóoldat Elválasztás Mosóoldat Elválasztás	-	Folyadék leszívás 2,0 ml Folyadék leszívás 2,0 ml Folyadék leszívás (óvatosan)	
Mérés	Mérje 60 másodpercig.		