

DHEA-SO₄ [I-125] RIA KIT

RK-620CT.

Estuche para 100 determinaciones

Juego de reactivos para la determinación cuantitativa *in vitro* de DHEA-SO₄ en suero humano, en el rango de 0-30 µmol/L (0-11,05 µg/mL).

Introducción

El Sulfato de Dehidroepiandrosterona (DHEA-SO₄) es el principal esteroide segregado por la corteza adrenal y es a su vez la hormona esteroidea más abundante en la circulación periférica. El DHEA-SO₄ es la fuente principal de los 17-cetoesteroides urinarios. Su aclaramiento metabólico es lento, siendo convertido principalmente en estrógenos. La hormona alcanza niveles máximos desde la pubertad hasta los 30-40 años, luego decrece de forma gradual, principalmente en la menopausia. La concentración de DHEA-SO₄ no sufre variaciones diurnas, ni diferencias de un día a otro, ni varía durante el ciclo menstrual.

La determinación de esta hormona es un sensible indicador de la producción adrenal de andrógenos. Se observan valores elevados en situaciones caracterizadas por una excesiva producción de andrógenos, como el hirsutismo, infertilidad, hiperplasia adrenal congénita, síndrome de Cushing y tumores adrenales virilizantes. Las concentraciones bajas de esta hormona pueden indicar anomalías inmunológicas hormono-dependientes. Durante la vejez, los niveles disminuidos de DHEA-SO₄ pueden estar relacionados al desarrollo de enfermedades cardiovasculares, aterosclerosis y cáncer, por lo que se recomienda su uso predictivo. La medición de DHEA-SO₄ es además de gran valor para la monitorización de la terapia adrenal supresiva (dexametasona).

Principio del ensayo

Este ensayo está basado en una reacción competitiva entre el DHEA-SO₄ no marcado, presente en las muestras y calibradores, con una cantidad fija de DHEA-SO₄ marcado con ¹²⁵I por un número limitado de sitios de unión al anticuerpo anti-DHEA-SO₄. La cantidad de DHEA-SO₄ marcado con ¹²⁵I que se une al anticuerpo es inversamente proporcional a la concentración de DHEA-SO₄ no marcado presente en las muestras.

El inmuno-complejo se inmoviliza en la superficie reactiva de los tubos de ensayo durante un periodo de incubación de 1 hora bajo agitación constante. Después de la incubación se decantan los tubos y se mide la radiactividad enlazada en un contador gamma.

La concentración del antígeno es inversamente proporcional a la radiactividad medida en los tubos. Utilizando los calibradores de concentración conocida de DHEA-SO₄, se prepara una curva estándar a partir de la cual se determina por interpolación la concentración de DHEA-SO₄ presente en las muestras.

Contenido del juego

1. TRAZADOR, 1 frasco con 55 mL, listo para usar, contiene < 275 kBq de DHEA-SO₄ marcado con ¹²⁵I en solución tampón con colorante rojo y 0,1% NaN₃.
2. ANTISUERO, 1 frasco con 55 mL listo para usar, contiene anti-DHEA-SO₄ policlonal (conejo) en solución tampón con colorante azul y 0,1 % NaN₃.

3. CALIBRADORES (S1-S6), 6 frascos listos para usar con 0,5 mL de suero humano y 0,1% NaN₃. Los calibradores contienen: 0, 0,3, 1, 3, 10, 30 µmol/L de DHEA-SO₄.

4. SUERO CONTROL, 1 frasco, contiene 0,5 mL de suero humano liofilizado con 0,1% NaN₃. La concentración del suero control está especificada en el certificado de calidad incluido.

5. TUBOS RECUBIERTOS: 2x50 tubos de 12x75 mm, empaquetados en cajas plásticas, listos para usar.

Materiales y equipos necesarios

Gradilla para tubos de ensayo, pipetas de precisión con puntas desechables (10 y 500 µL), agitador horizontal u orbital, lámina de polietileno, papel absorbente, contador gamma

Materiales y equipos recomendados:

Pipeta de repetición (500 µL)

Recolección y almacenamiento de las muestras

Las muestras de suero deben colectarse de acuerdo a los procedimientos habituales que se practican en los laboratorios clínicos. Las muestras pueden conservarse entre 2 y 8 °C si el análisis se efectuará dentro de las 24 horas siguientes a su recolección, de lo contrario deben conservarse congeladas a una temperatura igual o menor que -20 °C hasta 4 meses. Las muestras congeladas deben descongelarse y mezclarse completamente antes de su uso. Evitar la congelación y descongelación repetida de las muestras.

Preparación y conservación de los reactivos

Conservar los reactivos entre 2 y 8 °C después de abiertos. A esta temperatura cada reactivo es estable hasta la fecha de vencimiento del juego. La fecha de caducidad exacta se especifica en la etiqueta del estuche y en el certificado de calidad.

El suero control se reconstituye con 500 µL de agua destilada. Para ello se debe mezclar suavemente evitando la formación de espuma. Permitir que la solución alcance la temperatura ambiente (20 a 30 °C) antes de su uso. Para usos posteriores, conservar bajo -20 °C hasta la fecha de vencimiento.

PRECAUCIÓN!

Permitir que todos los reactivos y muestras alcancen la temperatura ambiente (mín. 1 hora). Homogenizar completamente los reactivos y muestras antes de su uso, evitando la formación de espuma.

Procedimiento para el ensayo

(Ver Tabla 1.)

1. Marcar los tubos por duplicado para la actividad total (T), calibradores (S1-S6), suero control (C) y muestras (M).
2. Añadir por duplicado 10 µL de calibrador, suero control y muestras en los tubos apropiados.
3. Añadir 500 µL de trazador en cada tubo.
4. Añadir 500 µL de antisuero en todos los tubos excepto T.

5. Fijar la gradilla con los tubos de ensayo firmemente en el agitador horizontal. Cubrir los tubos con una lámina de polietileno. Encender el agitador y ajustar la velocidad de manera tal que el líquido en los tubos esté rotando o agitándose constantemente.
6. Incubar los tubos en el agitador durante 1 hora a temperatura ambiente (mínimo 600 rpm).
7. Aspirar o decantar el líquido de todos los tubos (excepto T) mediante la inversión de la gradilla. Colocar la gradilla sobre un papel absorbente por 5 minutos manteniendo la posición invertida.
8. Medir la radiactividad de cada tubo por 60 segundos en un contador gamma.
9. Calcular la concentración de DHEA-SO₄ en las muestras como se describe a continuación.

Tabla 1. Protocolo del ensayo (volúmenes en microlitros)

	T	S ₁₋₆	M	C
Calibrador		10		
Muestra			10	
Control				10
Trazador	500	500	500	500
Antisuero		500	500	500
Agitar 1 hora a temperatura ambiente				
Decantar y secar en papel absorbente				
Medir la radiactividad (60 s/tubo)				
Calcular los resultados				

Cálculo de los resultados

En la Tabla 2 y la figura 1 se muestran a manera de ejemplo los cálculos y una curva estándar típica de un ensayo.

Para los cálculos:

Hallar la media de los conteos por minuto (cpm) para cada par de tubos.

Calcular el porcentaje B₀/T% para el calibrador de concentración cero (S₁) según la ecuación siguiente:

$$B_0/T\% = \frac{S_1 \text{ (cpm)}}{T \text{ (cpm)}} \times 100$$

B₀/T% es un parámetro opcional del control de calidad, no necesario para la determinación de la concentración de las muestras.

Calcular el porcentaje de unión para cada calibrador, control y muestra, utilizando la siguiente ecuación:

$$B/B_0(\%) = \frac{S_{2-6} / C / M_x \text{ (cpm)}}{S_1 \text{ (cpm)}} \times 100$$

Plotear los porcentajes B/B₀ (%) contra la concentración de DHEA-SO₄ de cada calibrador en un papel semi-logarítmico. Determinar la concentración de DHEA-SO₄ en las muestras por interpolación de la curva estándar. No extrapolar valores fuera del rango de la curva. Para el procesamiento automatizado de los datos pueden utilizarse programas de ajuste tipo spline o logit-log.

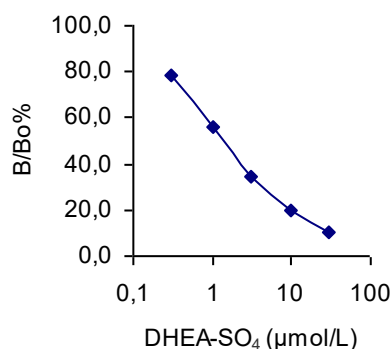
Tabla 2. Datos típicos del ensayo

Tubos	CPM1	CPM2	Media CPM	B/T %	B/Bo %
T	79631	80972	80301		
S1	69071	69564	69317	86,3	100
S2	57468	56881	57174	71,2	82,5
S3	43593	44028	43810	54,6	63,2
S4	31210	30921	31065	38,7	44,8
S5	18960	18413	18686	23,3	26,9
S6	10912	10280	10596	13,2	15,3
C	24014	24225	24119	30,0	34,8

Figura 1.

Ejemplo de curva estándar

(No utilizar para calcular valores de las muestras!)



Características del ensayo

Sensibilidad

El límite de detección es 0,064 $\mu\text{mol/L}$, en base a 120 determinaciones (60 de calibrador cero y 60 de muestras con baja concentración) y con un 95% de probabilidad.

Especificidad

Se adicionaron diferentes esteroides a dos concentraciones (A = 70 nM, B = 700 nM) al calibrador de concentración cero y se determinó la concentración aparente de DHEA- SO_4 .

b = bajo límite de detección.

Esteriode	A	B	Esteriode	A	B
Aldosterona	b	b	Cortisol	b	b
Androtendiona	b	0,1	Estriol	b	b
5 α -Dihidro-testosterona	b	b	Estrona	b	b
5 β -Dihidro-testosterona	b	b	Progesterona	b	b
Androstandiol	b	b	Pregnenolona	b	b
17 α -hidroxi-progesterona	b	b	Testosterona	b	b
Androstendiol	b	b	DHEA	0,15	2,29

Nota: dado que la concentración fisiológica del DHEA es 13-24 nmol/L (según literatura), la distorsión que puede ocasionar su reactividad cruzada en el ensayo es despreciable.

Precisión

La precisión intra-ensayo se determinó a partir de 20 réplicas de 6 muestras, medidas en una serie. Para determinar la precisión inter-ensayo se midieron por duplicado 6 muestras, en 22 series independientes. Los valores obtenidos se muestran a continuación.

Intra-ensayo		Inter-ensayo	
Media ($\mu\text{mol/L}$)	CV %	Media ($\mu\text{mol/L}$)	CV %
0,8	3,05	0,78	5,32
1,96	2,91	1,78	3,9
3,78	4,61	3,91	5,8
5,46	1,63	5,66	3,66
14,25	2,28	13,4	3,59
18,27	3,42	19,38	5,01

Prueba de recuperación

La recuperación se determinó como la diferencia porcentual entre el incremento observado y el incremento esperado, luego de añadir concentraciones conocidas a 3 niveles de DHEA- SO_4 , a 5 muestras de suero diferentes. La recuperación media obtenida fue de 103,5%, con valores entre 96,8% y 108,6%.

Prueba de dilución (linealidad)

Se diluyeron serialmente 6 muestras con el estándar de concentración cero y se sometieron a ensayo. La recuperación obtenida después de la dilución estuvo entre 85,1% y 102,5% (media de 94,4%). Se obtuvo la siguiente relación lineal entre los valores medidos (Y) y los valores esperados (X):

$$Y = 0,9854X - 0,0613 \quad R^2 = 0,9988 \quad n = 30$$

Valores de referencia

Los valores presentados a continuación deben considerarse como informativos. Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios intervalos de referencia.

Hombres			
N	Edad	Media ($\mu\text{mol/L}$)	Rango central (95%)
100	18 - 30	10,1	3,8 - 17,5
100	31 - 50	6,7	3,0 - 14,2
50	51 - 60	5,2	1,6 - 11,3
27	> 60	2,1	0,7 - 8,1

Mujeres			
N	Edad	Media ($\mu\text{mol/L}$)	Rango central (95%)
100	18 - 30	6,22	2,1 - 12,8
100	31 - 50	4,89	1,5 - 11,5
50	51 - 60	2,95	0,5 - 8,9
17	> 60	2,75	0,4 - 5,9

Interferencia:

Las pruebas de interferencia se realizaron de acuerdo con el documento EP07-A2 del CLSI. No se observa interferencia hasta las siguientes concentraciones:

Bilirrubina	684 $\mu\text{mol/L}$
Triglicéridos	16,94 mmol/L
Hemoglobina	10 g/L
Biotina	800 ng/mL
Factor Reumatoide	400 IU/mL
Paracetamol	15,6 mg/dL
Ácido acetilsalicílico	3,0 mg/dL
Acido ascórbico	5,25 mg/dL
Diclofenaco	2,4 mg/dL
Ibuprofeno	21,9 mg/dL

Conversión de las unidades de medida

$$1 \mu\text{mol/L} = 0,37 \mu\text{g/mL}$$

$$1 \mu\text{g/mL} = 2,71 \mu\text{mol/L}$$

Limitaciones del procedimiento

- Los reactivos provistos en este juego están optimizados para la medición de DHEA- SO_4 en suero.
- Las muestras hemolizadas, turbias o lipémicas pueden dar resultados falsos, evite su uso.
- Los resultados solo deben ser interpretados dentro del contexto clínico apropiado y nunca como prueba única e infalible de anomalía o enfermedad

Atención! No mezclar los componentes de lotes diferentes o con productos de otro fabricante!

Precauciones

Material radiactivo

Este producto contiene material radiactivo. Es responsabilidad de cada laboratorio cumplir con las regulaciones locales referentes a la manipulación, conservación y desecho de materiales radiactivos.

Material potencialmente infeccioso

El suero humano utilizado en este producto ha sido analizado con métodos aprobados y no ha presentado positividad para anticuerpos frente a los virus de Inmunodeficiencia Humana (Anti-HIV-1/2) y Hepatitis-C (HCV), anticuerpos anti-Treponema y el antígeno de superficie de la Hepatitis-B (HBsAg). Ninguno de los métodos analíticos disponibles actualmente puede garantizar por completo la eliminación de posibles riesgos biológicos. Se deben manipular todos los reactivos y muestras de sangre como material potencialmente infeccioso.

Peligro químico

Algunos componentes de este juego contienen azida sódica como preservante. Al verter los desechos no radiactivos al sistema de desagüe se debe diluir con grandes cantidades de agua, para evitar la acumulación de azidas metálicas explosivas en las tuberías de plomo y cobre. Este producto contiene en total 115 mg de azida sódica.

	Fecha de vencimiento		Número de lote
	Almacenar entre 2 y 8 °C		Suero Control
	Precaución		Calibrador
	Peligro biológico		Tubos recubiertos
	Consulte las instrucciones		Trazador
	Dispositivo para diagnóstico in vitro		Antisuero
	Fabricante		Material radiactivo
REF	Número de referencia		



Sitio WEB: <http://www.izotop.hu>

E-mail técnico: immuno@izotop.hu

E-mail comercial: commerce@izotop.hu

IZOTOP
INSTITUTE OF ISOTOPES Ltd.

1535 Budapest. P.f.: 851.

Tel.: (36-1)392-2577, Fax: (36-1)395-9247