

## DHEA-S

### INSTRUÇÕES DE USO

Ensaio imunossorvente competitivo ligado a enzimas para a determinação quantitativa de sulfato de dehidroepiandrosterona em soro ou plasma humanos.

#### INFORMAÇÕES GERAIS

**Comprimento de onda:** Filtro de medição - 450 nm em relação ao blank - Filtro Opcional de referência - 600 - 650 nm

**Tempo de incubação:** 75 minutos (60 minutos a 37°C / 15 minutos a temperatura ambiente)

**Conjugado Enzimático:** HRP - Peroxidase de rábano, pronto para uso.

**Solução substrato:** TMB (3,3', 5, 5' - Tetrametilbenzidina), concentrado

**Amostra:** Soro ou plasma

**Prazo de validade e estabilidade dos componentes do kit:** Kit- 12 meses a partir da data de produção

Componentes do kit - Ver o prazo de validade na rotulagem

#### 1. PRINCÍPIO

O sulfato de dehidroepiandrosterona (antígeno) na amostra compete com o sulfato de dehidroepiandrosterona peroxidase de rábano (antígeno marcado com enzima) para ligações dentro do número limitado de sítios de ligação (anticorpos) de anti-sulfato de dehidroepiandrosterona na microplaca (fase sólida). Após a incubação a separação ligados / livres é realizado por uma etapa de lavagem limpa da fase sólida.

A solução substrato (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + TMB) é adicionada. Após um tempo apropriado haver decorrido para um desenvolvimento máximo da coloração, a reação enzimática é interrompida e a absorbância é determinada.

A concentração de sulfato de dehidroepiandrosterona amostra é calculada baseada em uma série de calibradores. A intensidade da coloração é inversamente proporcional à concentração de sulfato de dehidroepiandrosterona na amostra.

#### 2. REAGENTES, MATERIAL E INSTRUMENTAÇÃO

##### 2.1 Reagentes e materiais fornecidos com o kit

1. Placa com micropoços - 12 x 8 tiras - IgG anti-sulfato de dehidroepiandrosterona adsorvido nos micropoços

2. Calibradores sulfato de dehidroepiandrosterona - 6 frascos x 1 ml

	C <sub>A</sub>	C <sub>B</sub>	C <sub>C</sub>	C <sub>D</sub>	C <sub>E</sub>	C <sub>F</sub>
ng/ml	0	2	8	20	80	200

3. Conjugado Enzimático - 1 frasco x 12 ml - Conjugado sulfato de dehidroepiandrosterona - HRP. Pronto para uso

4. Solução substrato - 1 frasco x 12 ml - Água oxigenada - TMB 0,25 g/l (evitar contato com a pele)

5. Solução STOP - 1 frasco x 12 ml - Ácido sulfúrico 0,15 mol/l (evitar contato com a pele)

6. Dilúente de amostras concentrado - 1 frasco x 20 ml - Tampão fosfato 25 mM, pH 7,4 - albumina bovina sérica 0,5 g/l.

##### 2.2 Notas

- Estocar todos os reagentes entre +2°C e +8°C ao abrigo da luz.
- Abrir a embalagem com a microplaca apenas quando a mesma tiver atingido a temperatura ambiente e fechar imediatamente após o uso.
- Não remover a folha adesiva das tiras não utilizadas.

##### 2.3 Reagentes necessários que não são fornecidos com o kit

- Água destilada
- Solução salina 0,9%

#### 2.4 Materiais auxiliares

- Tubos de ensaio descartáveis
- Dispensador automático
- Leitora de microplacas

#### 2.5 Preparação dos reagentes

##### Calibradores (C<sub>A</sub>, C<sub>B</sub>, C<sub>C</sub>, C<sub>D</sub>, C<sub>E</sub>, C<sub>F</sub>) (líquido)

Os calibradores apresentam a seguinte concentração de sulfato de dehidroepiandrosterona:

	C <sub>A</sub>	C <sub>B</sub>	C <sub>C</sub>	C <sub>D</sub>	C <sub>E</sub>	C <sub>F</sub>
ng/ml	0	2	8	20	80	200

##### Estabilidade: até a data de validade impressa na rotulagem do kit

A concentração dos padrões é 50 vezes mais baixa que os valores relatados nas faixas de referência, pois neste método as amostras são diluídas 1/50 ao passo que os calibradores não são diluídos.

As concentrações que devem ser registradas nos instrumentos para os cálculos são:

	C <sub>A</sub>	C <sub>B</sub>	C <sub>C</sub>	C <sub>D</sub>	C <sub>E</sub>	C <sub>F</sub>
µg/ml	0	0,1	0,4	1	4	10

Quando abertos, os calibradores são estáveis durante seis meses a +4°C.

##### Dilúente da Amostra

Diluir o conteúdo do frasco de Dilúente de Amostra Concentrado com 100 ml de água destilada ou água deionizada em um frasco apropriado para armazenagem. Armazenar a temperatura ambiente entre 2°C e 8°C até a data de validade impressa na rotulagem.

#### 3. PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

A determinação de sulfato de dehidroepiandrosterona pode ser realizada no plasma assim como no soro de pacientes em jejum.

Estocar o soro a -20°C se a determinação não for realizada no mesmo dia que a coleta de amostras.

##### Diluição da amostra

Imediatamente antes do uso preparar um tubo para cada amostra e pipetar:

Dilúente da amostra	ml	1
Amostra	µl	20

Misturar bem.

##### 3.1 Precauções

- Não utilizar amostras altamente hemolisadas.
- É necessário uma precisão máxima para a dispensação dos reagentes.
- Este método permite a determinação de sulfato de dehidroepiandrosterona entre 0,1 µg/ml a 10 µg/ml.
- O significado clínico da determinação de sulfato de dehidroepiandrosterona pode ser invalidado se o paciente tiver sido tratado com cortisona natural ou esteróides sintéticos.

#### 4. PROCEDIMENTO

Considerando que é necessário realizar a determinação em duplicata, preparar dois micropoços para cada um das cinco concentrações da curva de calibração (C<sub>A</sub> - C<sub>F</sub>), dois para cada amostra, um para o "blank".

Pipetar

	Calibrador	Amostra	"Blank"
Amostra diluída	---	30 µl	---
Calibradores (C <sub>A</sub> - C <sub>F</sub> )	30 µl	---	---
Conjugado enzimático	100 µl	100 µl	---

**Incubar a 37°C durante 60 minutos.**

Remover o conteúdo de cada micropoço, lavar os micropoços com 300 µl de água destilada.

Repetir o procedimento de lavagem drenando a água completamente.

Pipetar.

Solução Substrato	Calibrador 100 µl	Amostra 100 µl	"Blank" 100 µl
-------------------	----------------------	-------------------	-------------------

**Incubar a temperatura ambiente (20-25°C) durante 15 minutos ao abrigo da luz.**

Pipetar.

Solução Stop	Calibrador 100 µl	Amostra 100 µl	"Blank" 100 µl
--------------	----------------------	-------------------	-------------------

Ler a absorbância (E) a 450 nm em relação ao blank.

#### 5. CURVA DE CALIBRADORES - CÁLCULO DOS RESULTADOS

##### 5.1 Absorbância média

Calcular a média da absorbância para cada duplicata.

##### 5.2 Curva de calibração

Plotar os valores de absorbância dos calibradores em relação a suas concentrações correspondentes em um diagrama lin-lin ou lin-log (eixo x). Extrapolar a linha de passa através dos pontos.

##### 5.3 Cálculo dos resultados

Ler a concentração das amostras

**Notas** - As concentrações do calibrador são 50 vezes mais baixas que os valores relatados no diagrama devido ao fato de não estarem diluídos ao passo que as amostras estão diluídas 1/60.

Interpoler os valores das amostras expressas como (B/Bo)% na curva padrão para obter os valores correspondentes das concentrações expressas em mg/ml.

	C <sub>A</sub>	C <sub>B</sub>	C <sub>C</sub>	C <sub>D</sub>	C <sub>E</sub>	C <sub>F</sub>
µg/ml	0	0,1	0,4	1	4	10

#### 6. VALORES DE REFERÊNCIA

Os valores séricos do sulfato de dehidroepiandrosterona estão compreendidos no intervalo a seguir:

	Mulheres µg/ml	Homens µg/ml
Neonatos	0,9 - 1,8	0,9 - 1,8
Antes da puberdade	0,25 - 1,0	0,25 - 1,0
Adultos	0,9 - 3,6	0,9 - 3,6
Após a menopausa	<0,25 - 1,0	
Gravidez	0,25 - 1,8	

7.

#### CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

##### 7.1 Especificidade

As reações cruzadas do anticorpo calculadas a 50% de acordo com Abraham estão na tabela abaixo:

DHEA-S	90,0%
DHEA	100,0%
Androsterona-S-Na	48,0%
Androstendiona	20,0%
Etiocolanolona-S-Na	0,02%
5-alfa-androstandiona	0,01%
Testosterona	0,01%
Progesterona	0,01%
17-alfa-hidroxiprogesterona	0,01%
Estrona	0,01%

Cortisol	0,001%
Colesterol	0,001%

### 7.2 Sensibilidade

A menor concentração detectável do DHEA-S que pode ser diferenciada do calibrador zero é 0,045 (µg/ml) em um limite de confiabilidade de 95%  
Curva Padrão - Lote 742

Padrão	Concentração	D.O. (450 / 620 nm)
Bo	0	2,35
1	0,1	1,85
2	0,4	1,37
3	1,0	0,66
4	4,0	0,27
5	10,0	0,14

Procedimento analítico - A sensibilidade foi determinada através de medições repetidas do padrão zero (Bo). A sensibilidade foi calculada pela determinação da D.O. (Média do padrão Bo) menos 2 Desvios Padrão.

Número	Conc.Amostra 1
1	2,273
2	2,356
3	2,369
4	2,348
5	2,371
6	2,349
7	2,426
8	2,414
9	2,368
10	2,421
11	2,296
12	2,259
13	2,454
14	2,385
15	2,283
16	2,360
Média	2,358
Desvio Padrão	0,057

DO = Do S0 - 2 SD (DO S0) = 2,244

Uma densidade óptica de 2,244 representa uma concentração de 0,045 µg/ml para este ensaio.

### 7.3 Precisão e Reprodutibilidade

A variação intra-ensaio foi determinada por determinações em replicada (16x) de dois soros controle diferentes em um ensaio. A variabilidade intra-ensaio está tabulada a seguir (tabela 1). Todos os resultados estão em µg/ml.

#### Intra-ensaio

Número	Conc.Amostra 1	Conc.Amostra 1
1	2,65	6,0
2	2,70	5,21
3	2,48	5,42
4	2,52	5,36
5	2,80	5,68
6	2,73	5,91
7	2,45	5,55
8	2,38	5,72
9	2,65	5,48
10	2,58	5,63
11	2,55	5,76
12	2,75	5,40
13	2,41	5,90

14	2,67	5,39
15	2,80	5,77
16	2,45	5,82
N	16	16
X	2,6	5,62
Desvio Padrão	0,14	0,23
CV%	5m4	4,09

A variação entre-ensaios foi determinada por medições em replicada (16x) de três soros controle diferentes em dois ensaios diferentes. A variabilidade entre-ensaios está tabulada abaixo (tabela 2). Todos os resultados estão em µg/ml.

#### Entre-ensaios

Número	Lote	Data	Conc. Amostra 1	Conc. Amostra 2	Conc. Amostra 3
1	742	14/05/97	0,58	2,65	6,00
2			0,65	2,70	5,21
3			0,73	2,48	5,42
4			0,48	2,52	5,36
5			0,76	2,80	5,68
6			0,55	2,73	5,91
7			0,71	2,45	5,55
8			0,61	2,38	5,72
9	763	09/06/97	0,81	2,29	5,38
10			0,48	2,41	5,65
11			0,67	2,19	5,23
12			0,65	2,57	5,15
13			0,53	2,61	5,10
14			0,62	2,31	5,65
15			0,66	2,45	5,41
16			0,57	2,64	5,88
N	2	2	16	16	16
X			0,60	2,51	5,51
Desvio Padrão			0,123	0,17	0,279
CV%			15,0	6,8	5,0

### 7.4 Exatidão

A recuperação de 2- 8- 20 - 80 - 200 ng/ml de sulfato de dehidroepiandrosterona adicionado a uma amostra isenta de plasma apresentou uma média (±SE) de 105% ± 4,8% em relação às concentrações originais.

### 7.5 Comparação de métodos

#### Especificidade diagnóstica e sensibilidade diagnóstica

O kit **DHEA-S** da Dialab foi comparado com um outro método por RIA da Immunotech. As amostras de soro de 30 mulheres obviamente saudáveis e de 19 homens foram analisadas de acordo com os dois sistemas de teste.

O coeficiente de correlação  $r = 0,96$  ( $r^2 = 0,92$ ) foi encontrado entre os dois testes realizados. A curva de regressão linear foi calculada a partir de  $y = mx + b$ , onde  $m$  é a tendência e  $y$  a intercepção. A equação resultante foi:

$$\text{DHEA-S (Dialab)} = 0,94 \text{ RIA Immunotech} - 0,02$$

### 7.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraham GE, Maroulis GB, Buster JE, Chang RJ and Marshall JR (1976).  
Effect of dexamethasone on serum cortisol and androgen levels in hirsute patients. Obstet. Gynecol. 47 (4), 395.
- Granoff AB and Abraham GE (1979).

Peripheral and adrenal venous levels of steroids in patients with virilizing adrenal carcinoma. Obstet. Gynecol. 53 (1), 111.

3. Hopper BR and Yen SSC (1975).

Circulating concentration of dehidroepiandrosteron and dehidroepiandrosteron sulphate during puberty. Journal of Clinical Endocrinology Metab. 40 (3), 458.

4. Winter JSD, Fraiman C and Reyes FI (1878).

Normal and Abnormal Puberal Development. Clinical Obstetric and Gynecol, 21 (1), 67

#### Produzido por:

**DIALAB GmbH**  
Hondastrasse, Objekt M55  
2351 Wr, Neudorf

#### AUSTRIA

e-mail office@dialab.at

#### Importado e distribuído por:

**RZ DE OLIVEIRA DIAGNÓSTICA - EPP**

Rua Campevas, 627  
CEP.05016-010 - São Paulo - SP  
CNPJ 05.328.040/0001-80

[www.biomedix.com.br/](http://www.biomedix.com.br/) e-mail:biomedixsp@biomedix.com

#### Para uso exclusivo diagnóstico "in vitro"

Reg. ANVISA 80313040002

Téc. Resp. Dra. Renata Zuculin de Oliveira - CRF-SP 37986

#### POTENCIALMENTE INFECTANTE

CONSERVAR ENTRE +2°C e 8°C.

#### PARA DESCARTE, CONSULTAR INSTRUÇÕES DE USO

#### SERVIÇO DE ATENDIMENTO AO CLIENTE:

Quaisquer dúvidas técnicas no manuseio deste kit ou no seu procedimento, contatar a contatar a nossa **ASSESSORIA CIENTÍFICA**.  
Atendimento ao consumidor - Fone (011)-3871-0095

Revisão Setembro/2006