

Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



User's Manual

DHEA ELISA

Enzyme immunoassay for the in-vitro diagnostic quantitative determination of DHEA in human serum and plasma



DEH3344



96 Wells

CONTENTS / INHALTSVERZEICHNIS / CONTENIDO

| | | |
|----|---|----|
| 1 | INTRODUCTION | 3 |
| 2 | PRINCIPLE | 3 |
| 3 | WARNINGS AND PRECAUTIONS | 4 |
| 4 | REAGENTS | 5 |
| 5 | SPECIMEN | 6 |
| 6 | ASSAY PROCEDURE | 6 |
| 7 | EXPECTED VALUES | 7 |
| 8 | PERFORMANCE CHARACTERISTICS | 8 |
| 9 | LIMITATIONS OF PROCEDURE | 9 |
| 10 | LEGAL ASPECTS | 9 |
| 11 | REFERENCES | 11 |
| | | |
| 1 | EINLEITUNG | 12 |
| 2 | TESTPRINZIP | 12 |
| 3 | VORSICHTSMAßNAHMEN | 12 |
| 4 | BESTANDTEILE DES KITS | 13 |
| 5 | PROBENVORBEREITUNG | 14 |
| 6 | TESTDURCHFÜHRUNG | 14 |
| 7 | ERWARTETE WERTE | 15 |
| 8 | ASSAY CHARACTERISTIKA | 16 |
| 9 | GRENZEN DES TESTS | 16 |
| 10 | RECHTLICHE GRUNDLAGEN | 16 |
| 11 | REFERENZEN | 17 |
| | | |
| 1 | INTRODUCCIÓN | 18 |
| 2 | PRINCIPIO | 18 |
| 3 | ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES | 19 |
| 4 | REACTIVOS | 20 |
| 5 | MUESTRAS | 21 |
| 6 | PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO | 21 |
| 7 | VALORES ESPERADOS | 22 |
| 8 | CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO | 23 |
| 9 | LIMITACIÓN DEL PROCEDIMIENTO | 24 |
| 10 | ASPECTOS LEGALES | 25 |
| 11 | REFERENCIAS | 26 |
| | | |
| | SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ELISA | 28 |

1 INTRODUCTION

1.1 Intended Use

The **DEMEDITEC DHEA ELISA** is a competitive immunoassay for the quantitative *in vitro diagnostic* measurement of Dehydroepiandrosterone (DHEA) in serum and plasma (EDTA).

1.2 Summary and explanation

Dehydroepiandrosterone (DHEA; androstenedione; 3 β -hydroxy-5-androsten-17-one) is a C₁₉ steroid produced in the adrenal cortex and, to a lesser extent, gonads. DHEA serves as a precursor in testosterone and estrogen synthesis. Due to the presence of a 17-oxo (rather than hydroxyl) group, DHEA has relatively weak androgenic activity, which has been estimated at ~10% that of testosterone. However in neonates, peripubertal children and in adult women, circulating DHEA levels may be several-fold higher than testosterone concentrations, and rapid peripheral tissue conversion to more potent androgens (androstenedione and testosterone) and estrogens may occur. Moreover, DHEA has relatively low affinity for sex-hormone binding globulin. These factors may enhance the physiologic biopotency of DHEA.

The physiologic role of DHEA has not been conclusively defined. A variety of *in vitro* effects, including antiproliferative effects in different cell lines and effects on enzyme-mediated cell metabolism, have been reported. *In vivo* studies suggest that DHEA may affect cholesterol and lipid metabolism, insulin sensitivity and secretion and immune function. Abnormal DHEA levels have been reported in schizophrenia and obesity. Therapeutic administration of DHEA has been proposed for several conditions, including obesity and cardiovascular disease.

Serum DHEA levels are relatively high in the fetus and neonate, low during childhood, and increase during puberty. Increased levels of DHEA during adrenarche may contribute to the development of secondary sexual hair. Serum DHEA levels progressively decline after the third decade of life. No consistent changes in serum DHEA levels occur during the menstrual cycle or pregnancy; however, parity may lower serum DHEA levels in premenopausal women.

DHEA has a rapid metabolic clearance rate as compared to its sulfated conjugate, DHEA-S. Because of this, serum DHEA levels are 100-1000 fold lower than DHEA-S levels. In addition, serum DHEA levels show significant diurnal variation which is dependent on adrenocorticotrophic hormone (ACTH). Serum DHEA levels increase in response to exogenous ACTH administration.

Measurement of serum DHEA is a useful marker of adrenal androgen synthesis. Abnormally low levels may occur in hypoadrenalism, and elevated levels occur in several conditions; including virilizing adrenal adenoma and carcinoma, 21-hydroxylase and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase deficiencies and in some cases of female hirsutism. Since very little DHEA is produced by the gonads, measurement of DHEA levels may aid in the localization of androgen source in virilizing conditions.

2 PRINCIPLE

The DEMEDITEC DHEA ELISA Kit is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), based on the principle of competitive binding.

The microtiter wells are coated with an anti-DHEA antibody. An unknown amount of DHEA present in the sample competes with an DHEA-horseradish peroxidase conjugate for binding to the coated antibody. After incubation the unbound conjugate is washed off. The amount of bound peroxidase conjugate is inversely proportional to the concentration of DHEA in the sample. After addition of the substrate solution, the intensity of color developed is inversely proportional to the concentration of DHEA in the sample.

3 WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. This kit is for in vitro use only. For professional use only.
2. Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of the package insert provided with the kit. Be sure that everything is understood.
3. The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 °C to 8 °C in the sealed foil pouch and used in the frame provided.
4. Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step.
5. Use reservoirs only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing a substrate solution that had previously been used for the conjugate solution may turn solution colored. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur.
6. Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells.
7. Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.
8. Allow the reagents to reach room temperature (21-26°C) before starting the test. Temperature will affect the absorbance readings of the assay. However, values for the samples will not be affected.
9. Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and specimens with skin and mucous membranes.
10. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.
11. Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents or specimens may give false results.
12. Handling should be done in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.
13. Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
14. All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiterplate readers.
15. Do not mix or use components from kits with different lot numbers. It is advised not to exchange wells of different plates even of the same lot. The kits may have been shipped or stored under different conditions and the binding characteristics of the plates may result slightly different.
16. Avoid contact with Stop Solution. It may cause skin irritation.
17. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guideline or regulation.
18. For information please refer to Material Safety Data Sheets. Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from Demeditec Diagnostics GmbH.

4 REAGENTS

4.1 Reagents provided

1. **SORB | MT** Microtiterplate, 12 x 8 (break apart) strips with 96 wells; Wells coated with anti-DHEA antibody.
2. **CAL | 0-5** Calibrators (Calibrator 0-5), 6 vials, 0.3 mL each, ready to use; Concentrations: 0 – 0.3 – 1 – 3 – 10 – 30 ng/mL
3. **CONTROL | 1-2** Control 1 (low) / Control 2 (high), 2 vials, 0.3 ml each, ready to use; containing DHEA in serum. For control values and ranges please refer to QC-Datasheet.
4. **ENZ | CONJ** Enzyme Conjugate, 1 vial, 11 mL, ready to use; horseradish peroxidase labeled DHEA in buffered matrix.
5. **SUB | TMB** Substrate Solution, 1 vial, 22 mL, ready to use; contains tetramethylbenzidine (TMB)
6. **STOP | SOLN** Stop Solution, 1 vial, 7 mL, ready to use; contains 2 N hydrochloric acid solution.
7. **WASH | SOLN | 10x** Wash Solution, 1 vial, 50 mL (10X concentrated); see “Reagent Preparation”.

Note: Additional Calibrator 0 for sample dilution is available upon request.

4.2 Materials required but not provided

- A microtiter plate reader capable for endpoint measurement at 450 nm
- Calibrated variable precision micropipettes (25 µL, 100 µL, 200 µL, 300 µL).
- Microplate mixer operating more than 600 rpm
- Absorbent paper
- Distilled or deionized water
- Timer
- Semi logarithmic graph paper or software for data reduction

4.3 Storage conditions

When stored at 2°C to 8°C unopened reagents will be stable until expiration date. Do not use reagents beyond this date. Opened reagents must be stored at 2°-8°C. After first opening the reagents are stable for 30 days if used and stored properly.

Microtiter wells must be stored at 2°C to 8°C. Take care that the foil bag is sealed tightly.

4.4 Reagent preparation

Allow the reagents and the required number of wells to reach room temperature (21-26°C) before starting the test.

Wash Solution:

Dilute 50 mL of 10X concentrated *Wash Solution* with 450 mL deionized water to a final volume of 500 mL. *The diluted Wash Solution is stable for at least 12 weeks at room temperature (21-26°C).*

4.5 Disposal of the kits

The disposal of the kit must be made according to the national regulations. Special information for this product is given in the Material Safety Data Sheet.

4.6 Damaged test kits

In case of any severe damage of the test kit or components, DEMEDITEC DIAGNOSTICS GmbH has to be informed in writing within one week after receiving the kit. Severely damaged single components should not be used for a test run. They have to be stored until a final solution has been found. After this, they should be disposed according to the official regulations.

5 SPECIMEN

For determination of DHEA **serum or plasma (EDTA)** can be used. The procedure calls for 25 µL sample per well. The samples should be assayed immediately or aliquoted and stored at ≤ -20°C. Avoid repeated freeze-thaw cycles. Samples expected to contain DHEA concentrations higher than the highest calibrator (30 ng/mL) should be diluted with the zero calibrator before assay. The additional dilution step has to be taken into account for the calculation of the results. Do not use grossly haemolytic, icteric or grossly lipaemic specimens.

6 ASSAY PROCEDURE

6.1 General Remarks

- All reagents and specimens must be allowed to come to room temperature before use. All reagents must be mixed without foaming.
- Once the test has been started, all steps should be completed without interruption.
- Use new disposal plastic pipette tips for each standard, control or sample in order to avoid cross contamination.
- Absorbance is a function of the incubation time and temperature. Before starting the assay, it is recommended that all reagents are ready, caps removed, all needed wells secured in holder, etc. This will ensure equal elapsed time for each pipetting step without interruption.
- As a general rule the enzymatic reaction is linearly proportional to time and temperature.
- Respect the incubation times as stated in this instructions for use.

6.2 Assay procedure

Each run must include a standard curve.

1. Prepare a sufficient number of microplate wells to accommodate calibrators and samples in duplicates.
2. Dispense **25 µL** of each **Calibrator, Sample and Control** with new disposable tips into appropriate wells.
3. Dispense **100 µL** of **Enzyme Conjugate** into each well.
4. Incubate for **60 minutes** at room temperature on a plate shaker (> 600 rpm).

Important Note:

Optimal reaction in this assay is markedly dependent on shaking of the microplate!

5. Discard the content of the wells and rinse the wells **4 times** with diluted **Wash Solution** (300 µL per well). Remove as much Wash Solution as possible by beating the microplate on absorbent paper.
6. Add **200 µL** of **Substrate Solution** to each well.
7. Incubate without shaking for **30 minutes** in the dark.
8. Stop the reaction by adding **50 µL** of **Stop Solution** to each well.
9. Determine the absorbance of each well at 450 nm. It is recommended to read the wells within 15 minutes.

6.3 Calculation of results

1. Calculate the average absorbance values for each set of calibrators, controls and samples.
2. Using semi logarithmic graph paper, construct a standard curve by plotting the mean absorbance obtained from each standard against its concentration with absorbance value on the vertical (Y) axis and concentration on the horizontal (X) axis.
3. Using the mean absorbance value for each sample, determine the corresponding concentration from the calibration curve.
4. Automated method: The results in the package insert have been calculated automatically using a 4 PL (4 Parameter Logistics) curve fit. 4 Parameter Logistics is the preferred calculation method. Other data reduction functions may give slightly different results.
5. The concentration of the samples can be determined directly from this calibrator curve. Samples with concentrations higher than that of the highest calibrator have to be further diluted. For the calculation of the concentrations, this dilution factor has to be taken into account.

Example of typical calibrator curve

Following data are intended for illustration only and should not be used to calculate results from another run.

| Standard | Optical Units (450nm) |
|--------------------------|-----------------------|
| Calibrator 0 (0 ng/mL) | 3.003 |
| Calibrator 1 (0.3 ng/mL) | 2.501 |
| Calibrator 2 (1 ng/mL) | 1.912 |
| Calibrator 3 (3 ng/mL) | 1.220 |
| Calibrator 4 (10 ng/mL) | 0.647 |
| Calibrator 5 (30 ng/mL) | 0.341 |

7 EXPECTED VALUES

It is strongly recommended that each laboratory should determine its own normal and abnormal values.

In a study conducted with apparently normal healthy adults, using the DEMEDITEC DHEA ELISA the following values are observed:

| Population | Range |
|-------------|------------------|
| Adult Males | 1.8 – 12.5 ng/mL |
| Adult Woman | 1.3 – 9.8 ng/mL |

These results alone should not be the only reason for any therapeutic consequences. They have to be correlated to other clinical observations and diagnostic tests.

8 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

8.1 Analytical Sensitivity

The lowest analytical detectable level of DHEA that can be distinguished from the Zero Calibrator is 0.07 ng/mL at the 2SD confidence limit.

8.2 Specificity (Cross Reactivity)

The following materials have been evaluated for cross reactivity. The percentage indicates cross reactivity at 50% displacement compared to DHEA.

| Steroid | % Cross reaction |
|----------------------------------|------------------|
| DHEA-S | < 0,01 |
| Testosterone | < 0,01 |
| 5 α -Dihydrotestosterone | < 0,01 |
| Androstendione | 0,06 |
| Progesterone | 0,23 |
| 17 α -Hydroxyprogesterone | < 0,01 |
| Pregnenolone | 0,01 |
| 17-Hydroxy-Pregnenolone | 0,07 |
| Desoxycorticosterone | 0,05 |
| Corticosterone | < 0,01 |
| Cortisol | < 0,01 |

8.3 Assay dynamic range

The range of the assay is between 0.3 – 30 ng/mL.

8.4 Reproducibility

8.4.1 Intra-Assay

The intra-assay variation was determined by 20 replicate measurements of three serum samples within one run. The within-assay variability is shown below:

| | Serum 1 | Serum 2 | Serum 3 |
|--------------|---------|---------|---------|
| Mean (ng/mL) | 2.08 | 5.34 | 20.84 |
| SD | 0.16 | 0.39 | 1.511 |
| CV (%) | 7.9 | 7.3 | 7.3 |
| n = | 20 | 20 | 20 |

8.4.2 Inter-Assay

The inter-assay (between-run) variation was determined by duplicate measurements of three serum samples in 11 different tests.

| | Serum 1 | Serum 2 | Serum 3 |
|--------------|---------|---------|---------|
| Mean (ng/mL) | 2.14 | 5.26 | 20.63 |
| SD | 0.15 | 0.27 | 1.03 |
| CV (%) | 6.9 | 5.1 | 5.0 |
| n = | 11 | 11 | 11 |

8.5 Recovery

Using the calibrator matrix a spiking solution of 1000 ng DHEA/mL was prepared. 500 µL of three sera were spiked with 1.5, 3 and 5 µL of the spiking solution leaving the serum matrices relatively intact. All samples were measured by the DEMEDITEC DHEA ELISA procedure.

| Sample | Spiking (ng/mL) | Measured (ng/mL) | Expected (ng/mL) | Recovery (%) |
|--------|-----------------|------------------|------------------|--------------|
| 1 | - | 0 | - | - |
| | 3 | 2.63 | 3 | 88% |
| | 6 | 5.52 | 6 | 92% |
| | 10 | 10.04 | 10 | 100% |
| 2 | - | 0.96 | - | - |
| | 3 | 3.36 | 3.96 | 85% |
| | 6 | 5.67 | 6.96 | 81% |
| | 10 | 8.73 | 10.96 | 80% |
| 3 | - | 1.69 | - | - |
| | 3 | 4.05 | 4.69 | 86% |
| | 6 | 7.11 | 7.69 | 92% |
| | 10 | 10.24 | 11.69 | 88% |

8.6 Linearity

Three serum samples were assayed undiluted and diluted with the zero calibrator.

| Serum | Dilution | Measured (ng/mL) | Expected (ng/mL) | Linearity (%) |
|-------|----------|------------------|------------------|---------------|
| 1 | - | 11.34 | ./. | ./. |
| | 1 in 2 | 5.91 | 5.67 | 104% |
| | 1 in 4 | 3.24 | 2.84 | 114% |
| | 1 in 8 | 1.55 | 1.48 | 105% |
| 2 | - | 4.78 | ./. | ./. |
| | 1 in 2 | 2.57 | 2.39 | 108% |
| | 1 in 4 | 1.23 | 1.2 | 103% |
| | 1 in 8 | 0.49 | 0.6 | 82% |
| 3 | - | 12.08 | ./. | ./. |
| | 1 in 2 | 6.57 | 6.04 | 109% |
| | 1 in 4 | 3.57 | 3.02 | 118% |
| | 1 in 8 | 1.82 | 1.51 | 120% |

9 LIMITATIONS OF PROCEDURE

Reliable and reproducible results will be obtained when the assay procedure is performed with a complete understanding of the package insert instruction and with adherence to good laboratory practice. Any improper handling of samples or modification of this test might influence the results.

Drug Interferences

Any medication (cream, oil, pill etc.) containing DHEA will significantly influence the measurement of this analyte.

10 LEGAL ASPECTS

10.1 Reliability of Results

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable national standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test. The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications. In case of any doubt or concern please contact DEMEDITEC.

10.2 Therapeutic Consequences

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as stated under point 10.1. Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of a patient.

Only in cases where the laboratory results are in acceptable agreement with the overall clinical picture of the patient should therapeutic consequences be derived.

The test result itself should never be the sole determinant for deriving any therapeutic consequences.

10.3 Liability

Any modification of the test kit and/or exchange or mixture of any components of different lots from one test kit to another could negatively affect the intended results and validity of the overall test. Such modification and/or exchanges invalidate any claim for replacement.

Claims submitted due to customer misinterpretation of laboratory results subject to point 10.2. are also invalid. Regardless, in the event of any claim, the manufacturer's liability is not to exceed the value of the test kit. Any damage caused to the test kit during transportation is not subject to the liability of the manufacturer.

11 REFERENCES

1. Labrie F, Luu-The V, Belanger A, Lin SX, Simard J, Pelletier G, Labrie C. Is dehydroepiandrosterone a hormone?
J Endocrinol. 2005 Nov;187(2):169-96.
2. De Pergola G, Giagulli VA, Garruti G, Cospite MR, Giorgino F, Cignarelli M, Giorgino R. Low dehydroepiandrosterone circulating levels in premenopausal obese women with very high body mass index.
Metabolism. 1991 Feb;40(2):187-90
3. Zumoff B, Rosenfeld RS, Strain GW, Levin J, Fukushima DK. Sex differences in the twenty-four-hour mean plasma concentrations of dehydroisoandrosterone (DHA) and dehydroisoandrosterone sulfate (DHAS) and the DHA to DHAS ratio in normal adults.
J Clin Endocrinol Metab. 1980 Aug;51(2):330-3
4. Carlstrom K, Brody S, Lunell NO, Lagrelius A, Mollerstrom G, Pousette A, Rannevik G, Stege R, von Schoultz B. Dehydroepiandrosterone sulphate and dehydroepiandrosterone in serum: differences related to age and sex.
Maturitas. 1988 Dec;10(4):297-306
5. Lee PD, Winter RJ, Green OC. Virilizing adrenocortical tumors in childhood: eight cases and a review of the literature.
Pediatrics. 1985 Sep;76(3):437-44.
6. Belanger A, Candas B, Dupont A, Cusan L, Diamond P, Gomez JL, Labrie F. Changes in serum concentrations of conjugated and unconjugated steroids in 40- to 80-year-old men.
J Clin Endocrinol Metab. 1994 Oct;79(4):1086-90.

1 EINLEITUNG

Der **DEMEDIATEC DHEA ELISA** ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von DHEA in Serum und Plasma (EDTA). Nur für In-vitro Diagnostik.

2 TESTPRINZIP

Der DEMEDIATEC DHEA ELISA ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay, der auf dem Prinzip der kompetitiven Bindung basiert. Die Vertiefungen der Mikrotiterplatten sind mit einem Antikörper beschichtet, der gegen das DHEA-Molekül gerichtet ist.

Die Proben werden in die beschichteten Vertiefungen gegeben und zusammen mit einem DHEA-Enzymkonjugat inkubiert. Während der Inkubation konkurriert das DHEA aus der Probe mit dem DHEA-Enzymkonjugat um die freien Bindungsstellen auf den beschichteten Vertiefungen. Das nicht gebundene Konjugat wird durch Waschen der Vertiefungen entfernt. Anschließend wird die Substratlösung zugegeben und die Farbentwicklung nach einer definierten Zeit gestoppt. Die Intensität der gebildeten Farbe ist umgekehrt proportional der DHEA-Konzentration in der Probe. Die Extinktion wird bei 450 nm mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät gemessen.

3 VORSICHTSMAßNAHMEN

1. Dieser Kit ist nur zum in vitro diagnostischen Gebrauch geeignet und sollte nur von Fachpersonal durchgeführt werden.
2. Lesen Sie vor dem Testansatz sorgfältig die Packungsbeilage. Verwenden Sie nur die gültige, im Testkit enthaltene Arbeitsanleitung.
3. Die Mikrotiterplatte enthält teilbare, einzeln brechbare Mikrotiterstreifen. Unbenutzte Mikrotiterstreifen sollten im verschlossenen Folienbeutel bei 2 – 8°C aufbewahrt werden und im mitgelieferten Rahmen verwendet werden.
4. Proben und Reagenzien sollten so schnell wie möglich und in einer gleichbleibenden Sequenz pipettiert werden.
5. Verwenden Sie für jedes Reagenz einen separaten Pipettenaufsatz. Das gilt besonders für die Substrat-Lösung. Wenn der Pipettenaufsatz der Substrat-Lösung vorher z.B. für das Konjugat verwendet wurde, kommt es zu einem Farbumschlag der Substrat-Lösung. Gießen Sie Reagenzien nie zurück ins Fläschchen, da so Reagenz-Kontaminationen verursacht werden können.
6. Mischen Sie den Inhalt der Mikrotiterplatte sorgfältig, um gute Testergebnisse zu gewährleisten. Mikrotiterplatten nicht wiederverwenden!
7. Mikrotiterstreifen nicht austrocknen lassen während des Testlaufes. Nach jedem Waschschrift zügig im Testprotokoll fortfahren.
8. Bringen Sie die Reagenzien vor Ansetzen des Tests auf Raumtemperatur (21-26°C).
9. Nicht mit dem Mund pipettieren und den Kontakt von Kitbestandteilen und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
10. In den Bereichen, in denen Proben oder Kitbestandteile verwendet werden, nicht rauchen, essen oder Kosmetika verwenden.
11. Beim Umgang mit Proben oder Reagenzien Einweg-Latexhandschuhe tragen. Die Verunreinigung von Reagenzien oder Proben mit Mikroben kann zu falschen Ergebnissen führen.
12. Der Gebrauch sollte in Übereinstimmung mit den Verfahren erfolgen, welche durch eine nationale Gefahrenstoff-Sicherheitsrichtlinie festgelegt sind.
13. Reagenzien nicht nach dem auf dem Kit-Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.
14. Alle in der Packungsbeilage angegebenen Mengen müssen genau eingehalten werden. Optimale Ergebnisse können nur durch Verwendung kalibrierter Pipetten und Mikrotiterplatten-Lesegeräte erreicht werden.
15. Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Lotnummern nicht untereinander vertauschen oder mischen. Es wird empfohlen, keine Vertiefungen von verschiedenen Platten zu verwenden, auch nicht, wenn es sich um das gleiche Lot handelt. Die Kits können unter anderen Bedingungen gelagert oder versendet worden sein, so dass die Bindungscharakteristika der Platten leicht unterschiedlich ausfallen.
16. Der Kontakt mit der Stopplösung sollte vermieden werden, da sie Hautreizungen verursachen kann.
17. Die Entsorgung aller Bestandteile sollte gemäß der Vorschriften einer entsprechenden nationalen Gefahrenstoff-Sicherheitsrichtlinie erfolgen.

18. Informationen zu im Kit enthaltenen gefährlichen Substanzen entnehmen Sie bitte dem Material Sicherheitsdatenblatt. Material Sicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt von der Firma Demeditec Diagnostics GmbH erhältlich.

4 BESTANDTEILE DES KITS

4.1 Kitinhalt

1. **SORB | MT** Mikrotiterplatte, 12 x 8 (einzeln brechbare) Mikrotiterstreifen mit 96 Vertiefungen beschichtet mit einem anti-DHEA-Antikörper.
2. **CAL | 0-5** Standard (Standard 0-5), 6 Fläschchen, je 0,3 ml, gebrauchsfertig; Konzentrationen: 0 – 0.3 – 1 – 3 – 10 – 30 ng/ml
3. **CONTROL | 1-2** Kontrolle 1 (niedrig) / Kontrolle 2 (hoch), 2 Fl., je 0.3 ml, gebrauchsfertig; enthält DHEA in Serum. Kontrollwerte und –Bereiche entnehmen Sie bitte dem QC-Datenblatt.
4. **ENZ | CONJ** Enzymkonjugat, 1 Fläschchen, 11 ml, gebrauchsfertig; DHEA mit Meerrettichperoxidase konjugiert;
5. **SUB | TMB** Substratlösung, 1 Fläschchen, 22 ml, gebrauchsfertig; enthält Tetramethylbenzidin (TMB)
6. **STOP | SOLN** Stopplösung, 1 Fläschchen, 7 ml, gebrauchsfertig; enthält 2 N Salzsäure.
7. **WASH | SOLN | 10x** Waschlösung, 1 Fläschchen, 50 ml (10X konzentriert); siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.

Anmerkung: Zusätzlicher *Standard 0* zur Probenverdünnung ist auf Anfrage erhältlich.

4.2 Nicht im Kit enthaltene aber erforderliche Geräte und Materialien

- Kalibriertes Mikrotiterplatten-Lesegerät mit 450±10 nm Filter
- Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipetten (25 µl, 100 µl, 200 µl, 300 µl)
- Mikrotiterplatten-Schüttler mit mehr als 600 rpm
- Saugfähiges Papier
- Aqua dest.
- Zeitnahmegerät
- Semilogarithmisches Papier oder Software zur Datenverarbeitung

4.3 Lagerung und Haltbarkeit des Kits

Die ungeöffneten Reagenzien behalten bei Lagerung um 2-8°C ihre Reaktivität bis zum Verfallsdatum. Nach dem Verfallsdatum die Reagenzien nicht mehr verwenden. Nach dem Öffnen sollten alle Reagenzien bei 2-8°C gelagert werden. Nach dem ersten Öffnen sind die Reagenzien bei sachgemäßer Abarbeitung und Lagerung 30 Tage stabil.

Die Mikrotiterstreifen sollten bei 2 8°C gelagert werden. Der einmal geöffnete Folienbeutel sollte stets sehr sorgfältig wieder verschlossen werden.

4.4 Vorbereitung der Reagenzien

Alle Reagenzien sowie die benötigte Anzahl von Mikrotiterstreifen sollen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur (21-26°C) gebracht werden.

Waschlösung

Die 10-fach konzentrierte Waschlösung (50 ml) mit 450 ml deionisiertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 500 ml verdünnen. *Die verdünnte Waschlösung ist bei Raumtemperatur (21-26°C) für mindestens 12 Wochen stabil.*

4.5 Entsorgung des Kits

Die Entsorgung des Kits muss gemäß den nationalen gesetzlichen Vorschriften erfolgen. Spezielle Informationen für dieses Produkt finden Sie im Material Sicherheitsdatenblatt.

4.6 Beschädigte Testkits

Im Falle einer starken Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss die Firma DEMEDITEC DIAGNOSTICS GmbH in schriftlicher Form spätestens eine Woche nach Erhalt des Kits informiert werden. Stark beschädigte Einzelkomponenten sollten nicht für den Testlauf verwendet werden. Sie müssen gelagert werden, bis eine endgültige Lösung gefunden wurde. Danach sollten sie gemäß den offiziellen Richtlinien entsorgt werden.

5 PROBENVORBEREITUNG

Zur Bestimmung von DHEA ist **Serum und Plasma (EDTA)** geeignet. Für eine Bestimmung werden 25 µl Probenvolumen benötigt. Die Proben sollten unverzüglich verwendet werden oder aliquotiert bei -20°C gelagert werden. Wiederholte Gefrierzyklen sollten vermieden werden. Proben mit einer erwarteten DHEA-Konzentration höher als der höchste Standard (30 ng/ml) sollten vor Durchführung des Tests mit Nullstandard verdünnt werden. Die zusätzliche Verdünnung muss in die Kalkulation der Ergebnisse mit berücksichtigt werden. Keine hämolytischen, ikterischen oder lipämischen Proben verwenden.

6 TESTDURCHFÜHRUNG

6.1 Allgemeine Hinweise

- Alle Reagenzien und Proben müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur (21-26°C) gebracht und gut durchgemischt werden. Dabei sollte Schaumbildung vermieden werden.
- Wenn die Testdurchführung einmal begonnen wurde, muss sie ohne Unterbrechung zu Ende geführt werden.
- Für jeden Standard, jede Kontrolle oder Probe sollte eine neue Pipettenspitze verwendet werden, um Verschleppungen zu vermeiden.
- Die Optische Dichte ist abhängig von Inkubationszeit und Temperatur. Deshalb ist es notwendig, vor Beginn der Testdurchführung alle Reagenzien in einen arbeitsbereiten Zustand zu bringen, die Deckel der Fläschchen zu öffnen, alle benötigten Vertiefungen in den Halter zu setzen. Nur eine solche Vorbereitung garantiert gleiche Zeiten für jeden Pipettiervorgang ohne Pausen.
- Als generelle Regel gilt, dass die enzymatische Reaktion linear proportional zu Zeit und Temperatur ist.
- Die in der Gebrauchsanweisung angegebenen Inkubationszeiten müssen eingehalten werden.

6.2 Testdurchführung

Jeder Testlauf muss eine Standardkurve beinhalten.

1. Die benötigte Anzahl an **Mikrotiterstreifen** in der Halterung befestigen.
2. Je **25 µl Standards, Kontrollen und Proben** mit neuen Plastikspitzen in die entsprechenden Vertiefungen geben.
3. **100 µl des Enzymkonjugates** in jede Vertiefung geben.
4. **60 Minuten** bei Raumtemperatur auf einem Mikrotiterplatten-Schüttler (>600 rpm) inkubieren.

Achtung:

Eine optimale Reaktion wird erheblich beeinflusst durch das Schütteln der Mikrotiterplatte!

5. Den Inhalt der Vertiefungen kräftig ausschütten. Vertiefungen **4mal** mit verdünnter **Waschlösung** (300 µl pro Vertiefung) waschen. Restliche Flüssigkeit durch Ausklopfen der Mikrotiterplatte auf saugfähigem Papier entfernen.
6. **200 µl Substratlösung** in jede Vertiefung geben.
7. **30 Minuten** bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren.
8. Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von **50 µl Stopp-Lösung** in jede Vertiefung abstoppen.
9. Die Optische Dichte bei **450±10 nm** mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät innerhalb von 15 Minuten nach Zugabe der Stopp-Lösung bestimmen.

6.3 Ergebnisermittlung

1. Die durchschnittlichen Werte der Optischen Dichte (OD) für jedes Set von Standards und Proben bestimmen.
2. Eine Standardkurve ermitteln durch Auftragen der mittleren Optischen Dichte jedes Standards gegen die Konzentration, wobei der OD-Wert auf der vertikalen (Y) Achse und die Konzentration auf der horizontalen (X) Achse eingetragen wird.
3. Unter Verwendung der mittleren OD wird für jede Probe die entsprechende Konzentration aus der Standardkurve ermittelt.
4. Automatische Methode: Die in der Arbeitsanleitung ermittelten Werte wurden automatisch mit Hilfe der 4 Parameter Gleichung (4PL, 4 Parameter Logistics, 4 Parameter Rodbard) bestimmt. Andere Auswertungsfunktionen können leicht abweichende Werte ergeben.
5. Die Konzentration der Proben kann direkt von der Standardkurve abgelesen werden. Proben, die eine höhere Konzentration als die des höchsten Standards enthalten, müssen verdünnt werden. Dieser Verdünnungsfaktor muss bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

Beispiel für eine Standardkurve

Nachfolgend wird ein typisches Beispiel für eine Standardkurve mit dem DEMEDITEC DHEA ELISA gezeigt. Diese darf aber nicht zur Kalkulation eines anderen Testlaufes verwendet werden.

| Standard | Optische Dichte (450nm) |
|--------------------------|----------------------------|
| Calibrator 0 (0 ng/mL) | 3,003 |
| Calibrator 1 (0.3 ng/mL) | 2,501 |
| Calibrator 2 (1 ng/mL) | 1,912 |
| Calibrator 3 (3 ng/mL) | 1,220 |
| Calibrator 4 (10 ng/mL) | 0,647 |
| Calibrator 5 (30 ng/mL) | 0,341 |

7 ERWARTETE WERTE

In einer Studie wurden die Proben von gesunden Erwachsenen untersucht. Dabei ergaben sich mit dem DEMEDITEC DHEA ELISA folgende Werte:

| Population | Bereich |
|------------|------------------|
| Männer | 1.8 – 12.5 ng/mL |
| Frauen | 1.3 – 9.8 ng/mL |

Therapeutische Konsequenzen sollten nicht allein auf Basis der mit diesem Test ermittelten Werte getroffen werden, sondern unter Berücksichtigung klinischer Beobachtungen und weiterer diagnostischer Tests. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen normalen und abnormalen Werte ermittelt.

8 ASSAY CHARACTERISTIKA

8.1 Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität, definiert als Mittelwert minus der zweifachen Standardabweichung des Standards 0, beträgt 0,07 ng/ml.

8.2 Spezifität der Antikörper (Kreuzreaktivität)

Die Daten entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

8.3 Messbereich

Der Messbereich des Testes liegt zwischen 0,3 – 30 ng/ml.

Die Daten zu:

8.4 Präzision

8.5 Wiederfindung

8.6 Linearität

entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

9 GRENZEN DES TESTS

Jede unsachgemäße Behandlung von Proben oder Modifikationen dieses Tests können die Ergebnisse beeinflussen.

Beeinflussung durch Medikamente

Medikationen wie Cremes, Öle oder Pillen, die DHEA enthalten, haben einen entsprechenden Einfluss auf die Bestimmung des Analyten.

10 RECHTLICHE GRUNDLAGEN

10.1 Zuverlässigkeit der Ergebnisse

Der Test muss exakt gemäß der Testanleitung des Herstellers abgearbeitet werden. Darüber hinaus muss der Benutzer sich strikt an die Regeln der GLP (Good Laboratory Practice) oder andere eventuell anzuwendende Regeln oder nationale gesetzliche Vorgaben halten. Dies betrifft besonders den Gebrauch der Kontrollreagenzien. Es ist sehr wichtig, bei der Testdurchführung stets eine ausreichende Anzahl Kontrollen zur Überprüfung der Genauigkeit und Präzision mitlaufen zu lassen.

Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn alle Kontrollen in den vorgegebenen Bereichen liegen, und wenn alle anderen Testparameter die vorgegebenen Spezifikationen für diesen Assay erfüllen. Wenn Sie bezüglich eines Ergebnisses Zweifel oder Bedenken haben, setzen Sie sich bitte mit der Firma DEMEDITEC DIAGNOSTICS GmbH in Verbindung.

10.2 Therapeutische Konsequenzen

Therapeutische Konsequenzen sollten keinesfalls nur aufgrund von Laborergebnissen erfolgen, selbst dann nicht, wenn alle Testergebnisse mit den in 10.1. genannten Voraussetzungen übereinstimmen. Jedes Laborergebnis ist nur ein Teil des klinischen Gesamtbildes eines Patienten. Nur in Fällen, in denen die Laborergebnisse in akzeptabler Übereinstimmung mit dem allgemeinen klinischen Bild des Patienten stehen, sollten therapeutische Konsequenzen eingeleitet werden. Das Testergebnis allein sollte niemals als alleinige Grundlage für die Einleitung therapeutischer Konsequenzen dienen.

10.3 Haftung

Jegliche Veränderungen des Testkits und/oder Austausch oder Vermischung von Komponenten unterschiedlicher Chargen von einem Testkit zu einem anderen, können die gewünschten Ergebnisse und die Gültigkeit des gesamten Tests negativ beeinflussen. Solche Veränderungen und/oder Austausch haben den Ausschluss jeglicher Ersatzansprüche zur Folge.

Im Falle jeglicher Reklamation ist die Haftung des Herstellers maximal auf den Wert des Testkits beschränkt. Jegliche Schäden, die während des Transports am Kit entstanden sind, unterliegen nicht der Haftung des Herstellers.

11 REFERENZEN

Angaben zu den Referenzen entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Intención de Uso

El ELISA DEMEDITEC DHEA es un inmunoensayo competitivo para la determinación cuantitativa in vitro de Dehidroepiandrosterona (DHEA) en suero y plasma (EDTA).

1.2 Resumen y explicación.

La Dehidroepiandrosterona (DHEA) es un esteroide C19 producido en la corteza suprarrenal y, en menor medida, las gónadas. DHEA sirve como un precursor en la síntesis de testosterona y estrógeno. Debido a la presencia de un grupo oxo-17 (en lugar de hidroxilo), DHEA tiene relativamente actividad androgénica débil, que ha sido estimado en ~ 10% de la de la testosterona. Sin embargo en los recién nacidos, niños peripuberales y en mujeres adultas, los niveles circulantes de DHEA puede ser varias veces mayor que las concentraciones de testosterona. La rápida conversión en los tejidos periféricos puede producir andrógenos más potentes (androstenediona y testosterona) y estrógenos. Por otra parte, la DHEA tiene relativamente baja afinidad por la globulina de unión a hormonas sexuales. Estos factores pueden aumentar la biopotencia fisiológica de la DHEA.

El papel fisiológico de la DHEA no ha sido definido. Una variedad de efectos in vitro, incluidos los efectos antiproliferativos en diferentes líneas celulares y efectos sobre el metabolismo celular mediada por enzima, han sido reportados. Estudios in vivo sugieren que la DHEA puede afectar el colesterol y el metabolismo lipídico, sensibilidad a la insulina y la función inmune. Los niveles anormales de DHEA se han descrito en la esquizofrenia y la obesidad. La administración terapéutica de DHEA se ha propuesto para varias condiciones, incluyendo la obesidad y la enfermedad cardiovascular.

Los niveles séricos de DHEA son relativamente altos en el feto y el recién nacido, bajas durante la infancia, y aumentan durante la pubertad. Aumento de los niveles de DHEA durante adrenarquia pueden contribuir al desarrollo de vello sexual secundario. Los niveles séricos de DHEA disminuyen progresivamente a partir de la tercera década de la vida. No hay cambios consistentes en los niveles de DHEA en suero durante el ciclo menstrual o el embarazo; Sin embargo, pueden disminuir los niveles de DHEA en el suero de las mujeres premenopáusicas.

DHEA tiene una tasa de aclaramiento metabólico rápido en comparación con su conjugado sulfatado, DHEA-S. Debido a esto, los niveles de DHEA en suero son 100-1000 veces más bajos que los niveles de DHEA-S. Además, los niveles de DHEA en suero muestran variación diurna significativa que es dependiente de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH). Los niveles séricos de DHEA aumentan en respuesta a la administración de ACTH exógena.

Medición de la DHEA en suero es un marcador útil de la síntesis de andrógenos suprarrenales. Los niveles anormalmente bajos pueden ocurrir en hipoadrenalismo, y niveles elevados ocurren en varias condiciones; incluyendo adenoma virilizante y carcinoma adrenal, 21-hidroxilasa y las deficiencias de deshidrogenasa 3 β -hidroxiesteroide y en algunos casos de hirsutismo femenino. Desde muy pequeños la DHEA es producida por las gónadas, la medición de los niveles de DHEA puede ayudar en la localización de la fuente de andrógenos en condiciones virilizantes.

2 PRINCIPIO

El Kit de ELISA DHEA DEMEDITEC es un ensayo inmunoenzimático en fase sólida ligado a enzima (ELISA), basado en el principio de unión competitiva.

Los pocillos de microtitulación se recubren con un anticuerpo anti-DHEA. Una cantidad desconocida de DHEA presentes en la muestra compite con un conjugado de peroxidasa de rábano picante-DHEA para la unión al anticuerpo recubierto. Después de la incubación del conjugado no unido se lava. La cantidad de conjugado de peroxidasa unida es inversamente proporcional a la concentración de DHEA en la muestra. Después de la adición de la solución de sustrato, la intensidad del color desarrollado es inversamente proporcional a la concentración de DHEA en la muestra.

3 ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Este equipo es solo para uso in vitro. Sólo para uso profesional.
2. Antes de comenzar el ensayo, lea completa y cuidadosamente las instrucciones. Use la versión válida del prospecto proporcionado con el kit. Asegúrese de que todo se entiende.
3. La microplaca contiene tiras separables. Pozos no utilizados deben conservarse a 2 ° C y 8 ° C en la bolsa de aluminio sellada y utilizarse en el marco proporcionado.
4. El pipeteo de muestras y reactivos debe realizarse lo antes posible y en la misma secuencia para cada paso.
5. Utilice los embases solamente para los reactivos individuales. Esto se aplica especialmente a los depósitos de sustrato. El uso de un depósito para dispensar una solución de sustrato que habían sido previamente utilizado para la solución de conjugado puede convertirse solución coloreada. No vierta reactivos de nuevo en los viales ya que puede producirse la contaminación de los reactivos.
6. Mezcle el contenido de los pocillos de la microplaca a fondo para asegurar buenos resultados de las pruebas. No reutilice los pocillos.
7. No permita que los pozos se sequen durante el ensayo; añadir los reactivos inmediatamente después de completar los pasos de enjuague.
8. Permitir que los reactivos alcancen la temperatura ambiente (21-26 ° C) antes de comenzar la prueba. La temperatura afectará las lecturas de absorbancia del ensayo. Sin embargo, los valores para las muestras no se verán afectados.
9. Nunca pipetear con la boca y evitar el contacto de los reactivos y las muestras con la piel y las mucosas.
10. No fumar, comer, beber o aplicar cosméticos en áreas donde las muestras o reactivos del kit se manejan.
11. Use guantes de látex desechables al manipular muestras y reactivos. La contaminación microbiana de los reactivos o muestras puede dar resultados falsos.
12. La manipulación debe hacerse de acuerdo con los procedimientos definidos por una directriz de seguridad de riesgo biológico o normativas nacionales pertinentes.
13. No utilizar los reactivos después de la fecha de caducidad, como se muestra en las etiquetas del kit.
14. Todos los volúmenes tienen que ser realizado de acuerdo con el protocolo. Resultados de las pruebas óptimas solamente se obtienen al utilizar pipetas calibradas y lectores de micropozos.
15. No mezclar o utilizar componentes de kits con diferentes números de lote. Se recomienda no intercambiar pocillos de distintas placas incluso del mismo lote. Los kits pueden haber sido enviado o almacenado en diferentes condiciones y las características de unión de las placas pueden resultar un poco diferente.
16. Evitar el contacto con la solución de parada. Puede causar irritación de la piel.
17. Productos químicos y reactivos preparados o usados deben ser tratados como desechos peligrosos de acuerdo con la directriz o la regulación nacional de seguridad de riesgo biológico.
18. Para más información por favor consulte la hoja de seguridad. Fichas de Datos de Seguridad para este producto están disponibles bajo petición directamente desde Demeditec Diagnostics GmbH.

4 REACTIVOS

4.1 Reactivos Provistos

1. **SORB MT** placa de microtitulación, 12 x 8 tiras (desprendibles) con 96 pozos; Pocillos recubiertos con anticuerpo anti-DHEA.
2. **CAL 0-5** **calibradores** (calibrador 0-5), 6 viales, 0,3 ml cada uno, listo para su uso; Concentraciones: 0 - 0,3 - 1 - 3 - 10 y 30 ng / mL
3. **CONTROL 1-2** Control 1 (bajo)/ control 2 (alto), 2 viales, 0,3 ml cada uno, listo para su uso; que contiene DHEA en el suero. Para los valores de control y rangos consulte QC-Hoja de datos.
4. **ENZ CONJ** **conjugado enzimático**, 1 vial, 11 mL, listo para usar; peroxidasa de rábano picante ligados a DHEA en la matriz tamponada.
5. **SUB TMB** **solución de sustrato**, 1 vial, 22 mL, listo para usar; contiene tetrametilbenzidina (TMB)
6. **STOP SOLN** **solución de parada**, 1 frasco, 7 ml, listo para su uso; contiene solución de ácido clorhídrico 2 N.
7. **WASH SOLN 10x** Solución de lavado, 1 vial, 50 ml (10 veces más concentrado); consulte la sección "Preparación de los reactivos".

Nota: Calibrador adicional 0 para la dilución de la muestra está disponible contra pedido.

4.2 Materiales requeridos pero no provistos.

- Un lector de placas de punto final a 450 nm.
- Micropipetas calibradas volúmenes variables (25 µl, 100 µl, 200 µl, 300 µl).
- Mezclador de microplacas que opera más de 600 rpm
- Papel absorbente
- Agua destilada o desionizada
- Cronómetro
- Papel cuadriculado semi logarítmico o software de reducción de datos.

4.3 Condiciones de almacenamiento.

Cuando se almacena a 2 y 8°C los reactivos sin abrir son estables hasta la fecha de caducidad. No utilizar los reactivos después de esta fecha. Reactivos abiertos deben conservarse a 2°C y 8°C. Una vez abiertos los reactivos son estables durante 30 días si se realiza y se almacena correctamente. Los pozos se deben almacenar entre 2 y 8°C. Una vez que la bolsa de aluminio se ha abierto, se debe tener cuidado para cerrarla herméticamente de nuevo.

4.4 Preparación de reactivos

Deje que los reactivos y el número necesario de pozos alcancen la temperatura ambiente (21-26°C) antes de comenzar la prueba.

Solución de lavado:

Diluir 50 ml de concentrado 10X Solución de Lavado con 450 ml de agua desionizada hasta un volumen final de 500 mL. La solución de lavado diluida es estable durante al menos 12 semanas a temperatura ambiente (desde 21-26°C).

4.5 Eliminación de los Kit

La eliminación del kit debe hacerse de acuerdo con las regulaciones nacionales. Información especial para este producto se presenta en la Hoja de Datos de Seguridad del Material.

4.6 Daño de los Kit

En caso de daño severo del kit o componentes de prueba, DEMEDITEC Diagnostics GmbH tiene que ser informado por escrito, más tardar una semana después de recibir el kit. Componentes individuales severamente dañados no se deben usar para una prueba de funcionamiento. Ellos tienen que ser almacenados hasta que se encuentre una solución definitiva. Después de esto, deben desecharse de acuerdo con las disposiciones oficiales.

5 MUESTRAS

Para la determinación de DHEA las muestras de suero y plasma (EDTA) pueden ser utilizadas. El procedimiento requiere muestra de 25 µL por pocillo. Las muestras deben ser analizadas inmediatamente o alícuotar y se almacenaran a $\leq -20^{\circ}\text{C}$. Evite los ciclos de congelación y descongelación repetidos. Las muestras se se espera que contengan concentraciones de DHEA más altas que el calibrador más alto (30 ng / ml) se deben diluir con el calibrador cero antes del ensayo. La etapa de dilución adicional tiene que ser tomada en cuenta para el cálculo de los resultados. No utilice muestras hemolizadas, ictericas o lipémicas.

6 PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

6.1 Observaciones Generales

- Todos los reactivos y las muestras se debe esperar que alcancen la temperatura ambiente antes de su uso. Todos los reactivos deben mezclarse sin formar espuma.
- Una vez que se ha iniciado la prueba, todos los pasos deben ser completados sin interrupción.
- Utilizar nuevas puntas de plástico dispuestas para cada estándar, control o muestra con el fin de evitar la contaminación cruzada.
- La absorbancia es una función del tiempo de incubación y la temperatura. Antes de comenzar el ensayo, se recomienda que todos los reactivos están listos, tapas removidas, todos los pocillos necesarios fijados en el soporte, etc. Esto se asegurará de tiempo transcurrido igual para cada paso de pipeteo sin interrupciones.
- Como regla general la reacción enzimática es linealmente proporcional al tiempo y la temperatura.
- Respetar los tiempos de incubación como se indica en estas instrucciones de uso.

6.2 Procedimiento del ensayo

Cada corrida debe incluir una curva de calibración

1. Preparar un número suficiente de pocillos de la microplaca para acomodar los calibradores, controles y muestras en duplicados.
2. Dispensar 25 µl de cada calibrador, muestra y control con puntas nuevas en los pocillos adecuados.
3. Dispensar 100 µL de Conjugado Enzimático en cada pocillo.
4. Incubar durante 60 minutos a temperatura ambiente en un agitador de placas (> 600 rpm).
Nota IMPORTANTE:
La reacción óptima en este ensayo depende marcadamente de las sacudidas de la microplaca!
5. Desechar el contenido de los pocillos y enjuagar los pocillos 4 veces con solución de lavado diluido (300 µl por pocillo). Retire la mayor cantidad de solución de lavado como sea posible al golpear ligramente a la microplaca en papel absorbente.
6. Añadir 200 µl de solución de sustrato a cada pocillo.
7. Incubar sin agitación durante 30 minutos en la oscuridad.
8. Detenga la reacción añadiendo 50 µl de solución de parada a cada pocillo.
9. Determinar la absorbancia de cada pocillo a 450 nm. Se recomienda leer los pozos dentro de los 15 minutos.

6.3 Cálculo de los resultados

1. Calcular los valores medios de absorbancia para cada conjunto de calibradores, controles y muestras.
2. Usar papel semi gráfico logarítmico, construir una curva estándar trazando la absorbancia media obtenida de cada estándar frente a su concentración con el valor de la absorbancia en el (Y) eje vertical y la concentración en el eje horizontal (X).
3. Utilizando el valor de absorbancia media para cada muestra, determine la concentración correspondiente de la curva de calibración.
4. Método Automatizado: Los resultados en el prospecto se han calculado automáticamente utilizando un 4 PL (Logística 4 parámetros) ajuste de la curva. 4 Parameter Logistics es el método de cálculo preferido. Otras funciones de reducción de datos pueden dar resultados ligeramente diferentes.
5. La concentración de las muestras se puede determinar directamente a partir de esta curva de calibración. Las muestras con concentraciones superiores a la del calibrador más alto tienen que ser diluidas. Para el cálculo de las concentraciones, este factor de dilución tiene que ser tomado en cuenta.

Ejemplo de una curva de calibración típica.

Los siguientes datos están diseñados sólo para ilustración y no deben ser utilizados para calcular los resultados de otra corrida.

| Estándar | Densidad Óptica (450nm) |
|--------------------------|-------------------------|
| Calibrador 0 (0 ng/mL) | 3.003 |
| Calibrador 1 (0.3 ng/mL) | 2.501 |
| Calibrador 2 (1 ng/mL) | 1.912 |
| Calibrador 3 (3 ng/mL) | 1.220 |
| Calibrador 4 (10 ng/mL) | 0.647 |
| Calibrador 5 (30 ng/mL) | 0.341 |

7 VALORES ESPERADOS

Se recomienda que cada laboratorio determine sus propios valores normales y anormales. En un estudio realizado con adultos sanos de apariencia normal, utilizando el DEMEDITEC DHEA ELISA se observaron los siguientes valores:

| Pacientes | Rango |
|--------------------|------------------|
| Adultos Masculinos | 1.8 – 12.5 ng/mL |
| Adultos Femeninos | 1.3 – 9.8 ng/mL |

Los resultados en sí no deben ser la única razón para administrar tratamiento. Deben correlacionarse con observaciones clínicas y ensayos de diagnóstico.

8 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO

8.1 Sensibilidad Analítica

El nivel detectable analítico más bajo de DHEA que puede distinguirse desde el calibrador cero es de 0,07 ng/ml en el límite de confianza 2SD.

8.2 Especificidad (Reacción Cruzada)

Los siguientes materiales han sido evaluados para determinar la reactividad cruzada. El porcentaje indica la reacción cruzada a 50% de desplazamiento en comparación con DHEA.

| Esteroides | % Reacción Cruzada |
|----------------------------------|--------------------|
| DHEA-S | < 0,01 |
| Testosterona | < 0,01 |
| 5 α -Dihidrotestosterona | < 0,01 |
| Androstendiona | 0,06 |
| Progesterona | 0,23 |
| 17 α -Hidroxiprogesterona | < 0,01 |
| Pregnenolona | 0,01 |
| 17-Hidroxi-Pregnenolona | 0,07 |
| Desoxicorticosterona | 0,05 |
| Corticosterona | < 0,01 |
| Cortisol | < 0,01 |

8.3 Rango dinámico del ensayo

El rango del ensayo se encuentra entre 0.3 – 30 ng/mL.

8.4 Reproducibilidad

8.4.1 Intra- Ensayo

La variación intra-ensayo se determinó mediante 20 mediciones repetidas de tres muestras de suero dentro de una misma corrida. La variabilidad intra-ensayo se muestra a continuación:

| | Suero 1 | Suero 2 | Suero 3 |
|----------------------|---------|---------|---------|
| Media (ng/mL) | 2.08 | 5.34 | 20.84 |
| SD | 0.16 | 0.39 | 1.511 |
| CV (%) | 7.9 | 7.3 | 7.3 |
| n = | 20 | 20 | 20 |

8.4.2 Inter-Ensayo

La variación inter-ensayo (entre corrida) fue determinada por mediciones duplicadas de tres muestras de suero en 11 pruebas diferentes.

| | Suero 1 | Suero 2 | Suero 3 |
|----------------------|---------|---------|---------|
| Media (ng/mL) | 2.14 | 5.26 | 20.63 |
| SD | 0.15 | 0.27 | 1.03 |
| CV (%) | 6.9 | 5.1 | 5.0 |
| n = | 11 | 11 | 11 |

8.5 Recuperación

Utilizando un calibrador matriz fue preparada una solución de 1.000 ng DHEA/ml. 500 µl de tres sueros se enriquecieron con 1.5, 3 y 5 µl de la solución matriz dejando los sueros relativamente intactos. Todas las muestras se midieron por el procedimiento DEMEDITEC DHEA ELISA.

| Muestra | Matriz (ng/mL) | Obtenido (ng/mL) | Esperado (ng/mL) | Recuperado (%) |
|---------|----------------|------------------|------------------|----------------|
| 1 | - | 0 | - | - |
| | 3 | 2.63 | 3 | 88% |
| | 6 | 5.52 | 6 | 92% |
| | 10 | 10.04 | 10 | 100% |
| 2 | - | 0.96 | - | - |
| | 3 | 3.36 | 3.96 | 85% |
| | 6 | 5.67 | 6.96 | 81% |
| | 10 | 8.73 | 10.96 | 80% |
| 3 | - | 1.69 | - | - |
| | 3 | 4.05 | 4.69 | 86% |
| | 6 | 7.11 | 7.69 | 92% |
| | 10 | 10.24 | 11.69 | 88% |

8.6 Linealidad

Tres muestras de suero se analizaron sin diluir y se diluyeron con el calibrador cero.

| Suero | Dilución | Medido (ng/mL) | Esperado (ng/mL) | Linealidad (%) |
|-------|----------|----------------|------------------|----------------|
| 1 | - | 11.34 | ./. | ./. |
| | 1 in 2 | 5.91 | 5.67 | 104% |
| | 1 in 4 | 3.24 | 2.84 | 114% |
| | 1 in 8 | 1.55 | 1.48 | 105% |
| 2 | - | 4.78 | ./. | ./. |
| | 1 in 2 | 2.57 | 2.39 | 108% |
| | 1 in 4 | 1.23 | 1.2 | 103% |
| | 1 in 8 | 0.49 | 0.6 | 82% |
| 3 | - | 12.08 | ./. | ./. |
| | 1 in 2 | 6.57 | 6.04 | 109% |
| | 1 in 4 | 3.57 | 3.02 | 118% |
| | 1 in 8 | 1.82 | 1.51 | 120% |

9 LIMITACIÓN DEL PROCEDIMIENTO

Se obtendrán resultados fiables y reproducibles cuando el procedimiento de ensayo se realice con una comprensión completa del prospecto y con el cumplimiento de buenas prácticas de laboratorio. Cualquier manipulación inadecuada de las muestras o modificación de esta prueba podrían influir en los resultados.

Interferencia con Drogas

Cualquier medicamento (crema, aceite, pastillas, etc.) que contiene DHEA-S o DHEA, por supuesto, va a influir significativamente en la medición de este analito.

10 ASPECTOS LEGALES

10.1 Confiabilidad de los resultados

La prueba debe realizarse exactamente según las instrucciones del fabricante. Además, el usuario debe seguir estrictamente las reglas de GLP (Good Laboratory Practice) u otras normas y / o leyes nacionales aplicables. Esto es especialmente relevante para el uso de reactivos de control. Es importante incluir siempre, dentro del procedimiento de prueba, un número suficiente de controles para validar la exactitud y precisión de la prueba.

Los resultados de las pruebas son válidas sólo si todos los controles están dentro de los rangos especificados y si todos los demás parámetros de ensayo se encuentran también dentro de las especificaciones de ensayo dadas. En caso de cualquier duda o inquietud, por favor póngase en contacto con DEMEDITEC.

10.2 Tratamiento

El tratamiento nunca debe basarse en los resultados de laboratorio por sí solo, incluso si todos los resultados de las pruebas están de acuerdo con los artículos según lo indicado en el punto 10.1. Cualquier resultado de laboratorio es sólo una parte del cuadro clínico total de un paciente. Sólo en los casos en que los resultados de laboratorio están en acuerdo con el cuadro clínico general del paciente debe ser derivado consecuencias terapéuticas. El resultado de la prueba en sí no debe ser el único factor determinante para derivar en tratamiento.












10.3 Liability

Cualquier modificación del kit de prueba y / o canje o la mezcla de los componentes de diferentes lotes de un kit de prueba a otro podría afectar negativamente a los resultados previstos y la validez de la prueba general. Dicha modificación y / o intercambios invalidan cualquier reclamo de reemplazo. Los reclamos presentados debido a la mala interpretación de clientes de los resultados de laboratorio sometidos a punto 10.2. también son válidos. De todos modos, en el caso de cualquier reclamación, la responsabilidad del fabricante es que no exceda el valor del kit de prueba. Cualquier daño causado al equipo de prueba durante el transporte no está sujeto a la responsabilidad del fabricante.

11 REFERENCIAS

1. Labrie F, Luu-The V, Belanger A, Lin SX, Simard J, Pelletier G, Labrie C. Is dehydroepiandrosterone a hormone?
J Endocrinol. 2005 Nov;187(2):169-96.
2. De Pergola G, Giagulli VA, Garruti G, Cospite MR, Giorgino F, Cignarelli M, Giorgino R. Low dehydroepiandrosterone circulating levels in premenopausal obese women with very high body mass index.
Metabolism. 1991 Feb;40(2):187-90
3. Zumoff B, Rosenfeld RS, Strain GW, Levin J, Fukushima DK. Sex differences in the twenty-four-hour mean plasma concentrations of dehydroisoandrosterone (DHA) and dehydroisoandrosterone sulfate (DHAS) and the DHA to DHAS ratio in normal adults.
J Clin Endocrinol Metab. 1980 Aug;51(2):330-3
4. Carlstrom K, Brody S, Lunell NO, Lagrelius A, Mollerstrom G, Pousette A, Rannevik G, Stege R, von Schoultz B. Dehydroepiandrosterone sulphate and dehydroepiandrosterone in serum: differences related to age and sex.
Maturitas. 1988 Dec;10(4):297-306
5. Lee PD, Winter RJ, Green OC. Virilizing adrenocortical tumors in childhood: eight cases and a review of the literature.
Pediatrics. 1985 Sep;76(3):437-44.
6. Belanger A, Candas B, Dupont A, Cusan L, Diamond P, Gomez JL, Labrie F. Changes in serum concentrations of conjugated and unconjugated steroids in 40- to 80-year-old men.
J Clin Endocrinol Metab. 1994 Oct;79(4):1086-90.

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ELISA

| Symbol | English | Deutsch | Français | Espanol | Italiano |
|---|------------------------------------|--|--|---|-------------------------------------|
|  | European Conformity | CE-Konformitätskennzeichnung | Conforme aux normes européennes | Conformidad europea | Conformità europea |
|  | Consult instructions for use | Gebrauchsanweisung beachten | Consulter les instructions d'utilisation | Consulte las Instrucciones | Consultare le istruzioni per l'uso |
|  | In vitro diagnostic device | In-vitro-Diagnostikum | Ussage Diagnostic in vitro | Diagnóstico in vitro | Per uso Diagnostica in vitro |
|  | For research use only | Nur für Forschungszwecke | Seulement dans le cadre de recherches | Sólo para uso en investigación | Solo a scopo di ricerca |
|  | Catalogue number | Katalog-Nr. | Référence | Número de catálogo | No. di Cat. |
|  | Lot. No. / Batch code | Chargen-Nr. | No. de lot | Número de lote | Lotto no |
|  | Contains sufficient for <n> tests/ | Ausreichend für "n" Ansätze | Contenu suffisant pour "n" tests | Contenido suficiente para <n> ensayos | Contenuto sufficiente per "n" saggi |
|  | Note warnings and precautions | Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten | Avertissements et mesures de précaution font attention | Tiene en cuenta advertencias y precauciones | Annoti avvisi e le precauzioni |
|  | Storage Temperature | Lagerungstemperatur | Temperature de conservation | Temperatura de conservacion | Temperatura di conservazione |
|  | Expiration Date | Mindesthaltbarkeitsdatum | Date limite d'utilisation | Fecha de caducidad | Data di scadenza |
|  | Legal Manufacturer | Hersteller | Fabricant | Fabricante | Fabbricante |
| <i>Distributed by</i> | Distributor | Vertreiber | Distributeur | Distribuidor | Distributore |