

Product information

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



DHEA-S ELISA



DE1562



96



Demeditec Diagnostics GmbH
Lise-Meitner-Strasse 2
24145 Kiel – Germany
www.demeditec.com

Contents / Contenido

1	INTRODUCTION	3
2	PRINCIPLE OF THE TEST	3
3	WARNINGS AND PRECAUTIONS	4
4	REAGENTS	5
5	SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	6
6	ASSAY PROCEDURE.....	7
7	REFERENCE RANGES HEALTHY POPULATION	8
8	QUALITY CONTROL.....	8
9	PERFORMANCE CHARACTERISTICS.....	9
10	LIMITATIONS OF USE.....	11
11	LEGAL ASPECTS	11
1	INTRODUCCIÓN.....	12
2	FUNDAMENTO DEL ENSAYO	12
3	PRECAUCIONES.....	12
4	COMPONENTES DEL KIT	13
5	MUESTRAS.....	14
6	PROCEDIMIENTO DE ENSAYO	15
7	RANGOS DE REFERENCIA POBLACIÓN SANA.....	16
8	CONTROL DE CALIDAD	17
9	CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO.....	17
10	LIMITACIONES DE USO	17
11	ASPECTOS LEGALES.....	17
12	REFERENCES / LITERATURE.....	19
	SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ELISAS	20

1 INTRODUCTION

1.1 Intended Use

The **DEMEDIATEC DHEA-S ELISA** is an enzyme immunoassay for the quantitative *in vitro diagnostic* measurement of DHEA-S in serum and plasma

For *in vitro* diagnostic use only. For laboratory professional use.

1.2 Summary and Explanation

Dehydroepiandrosterone (5-Androstene-3 β -0L-17-one, Androstenolone, Dehydroisoandrosterone, Transdehydroandrosterone, DHEA) is a steroid hormone present in blood mostly in its sulfate form (DHEA S) (1).

DHEA-S is a more specific product of the adrenals and measurements of this steroid are widely used in clinical practice. The clinical importance of plasma assays of DHEA-S is associated with the diagnosis of adrenal hyperplasia and differential diagnosis of hirsutism (2,3).

2 PRINCIPLE OF THE TEST

The DEMEDIATEC DHEA-S ELISA Kit is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), based on the principle of competitive binding. The microtiter wells are coated with a polyclonal antibody directed towards an antigenic site of the DHEA-S molecule.

Endogenous DHEA-S of a patient sample competes with a DHEA-S-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-S in the sample. After addition of the substrate solution, the intensity of colour developed is inversely proportional to the concentration of DHEA-S in the patient sample.

3 WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. This kit is for in vitro diagnostic use only. For professional use only.
2. All reagents of this test kit which contain human serum or plasma have been tested and confirmed negative for HIV I/II, HBsAg and HCV by FDA approved procedures. All reagents, however, should be treated as potential biohazards in use and for disposal.
3. Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of instructions for use provided with the kit. Be sure that everything is understood.
4. 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.
5. Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step.
6. 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.
7. Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells.
8. Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.
9. 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 patient samples will not be affected.
10. Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and specimens with skin and mucous membranes.
11. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.
12. Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents or specimens may give false results.
13. Handling should be done in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.
14. Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
15. All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiter plate readers.
16. 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.
17. Avoid contact with *Stop Solution* containing 0.5 M H₂SO₄. It may cause skin irritation and burns.
18. Some reagents contain Proclin 300, BND and/or MIT as preservatives. In case of contact with eyes or skin, flush immediately with water.
19. TMB substrate has an irritant effect on skin and mucosa. In case of possible contact, wash eyes with an abundant volume of water and skin with soap and abundant water. Wash contaminated objects before reusing them. If inhaled, take the person to open air.
20. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guideline or regulation.
21. For information on hazardous substances included in the kit please refer to Safety Data Sheets. Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from DEMEDITEC.

4 REAGENTS

4.1 Reagents provided

1. **SORB MT Microtiterwells**, 12 x 8 (break apart) strips, 96 wells; Wells coated with anti-DHEA-S antibody (polyclonal).
2. **CAL 0 – 6 Standard (Standard 0-6)**, 7 vials, 1 mL, ready to use; Concentrations: 0, 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 µg/ml. Conversion: 1 µg/mL = 2.6 µmol/L. Contain non-mercury preservative.
3. **ENZ CONJ Enzyme Conjugate**, 1 vial, 25 mL, ready to use, DHEA-S conjugated to horseradish peroxidase; Contains non-mercury preservative.
4. **SUB TMB Substrate Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use, Tetramethylbenzidine (TMB).
5. **STOP SOLN Stop Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use, contains 0.5 M H₂SO₄. Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.
6. **WASH SOLN 40x Wash Solution**, 1 vial, 30 mL (40X concentrated), See “Reagent Preparation”.

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

4.2 Materials required but not provided

- A microtiter plate calibrated reader (450 ± 10 nm)
- Calibrated variable precision micropipettes.
- 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 retain reactivity until expiration date. Do not use reagents beyond this date. Opened reagents must be stored at 2 °C to 8 °C. Microtiter wells must be stored at 2 °C to 8 °C. Once the foil bag has been opened, care should be taken to close it tightly again. Opened kits retain activity for two months if stored as described above.

4.4 Reagent Preparation

Bring all reagents and required number of strips to room temperature prior to use.

Wash Solution

Add deionized water to the 40X concentrated Wash Solution. Dilute 30 mL of concentrated *Wash Solution* with 1170 mL deionized water to a final volume of 1200 mL.

The diluted Wash Solution is stable for 1 week at room temperature.

4.5 Disposal of the Kit

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 to the test kit or components, DEMEDITEC has to be informed in writing, at the latest, 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 COLLECTION AND PREPARATION

Serum or plasma (EDTA-, heparin- or citrate plasma) can be used in this assay.

Do not use haemolytic, icteric or lipaemic specimens.

Please note: Samples containing sodium azide should not be used in the assay.

5.1 Specimen Collection

Serum:

Collect blood by venipuncture (e.g. Sarstedt Monovette for serum), allow to clot, and separate serum by centrifugation at room temperature. Do not centrifuge before complete clotting has occurred. Patients receiving anticoagulant therapy may require increased clotting time.

Plasma:

Whole blood should be collected into centrifuge tubes containing anti-coagulant (e.g. Sarstedt Monovette with the appropriate plasma preparation) and centrifuged immediately after collection.

5.2 Specimen Storage and Preparation

Specimens should be capped and may be stored for up to 7 days at 2 °C to 8 °C prior to assaying.

Specimens held for a longer time should be frozen only once and can be stored for at least 12 months at -20°C prior to assay. Thawed samples should be inverted several times prior to testing.

5.3 Specimen Dilution

If in an initial assay, a specimen is found to contain more than the highest standard, the specimens can be diluted with *Standard 0* and re-assayed as described in Assay Procedure.

For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

Example:

a) dilution 1:10: 10 µL sample + 90 µL *Standard 0* (mix thoroughly)

b) dilution 1:100: 10 µL dilution a) 1:10 + 90 µL *Standard 0* (mix thoroughly).

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.

6.2 Test Procedure

Each run must include a standard curve.

1. Secure the desired number of Microtiter wells in the frame holder.
2. Dispense **25 µL** of each **Standard, Control** and **samples** with new disposable tips into appropriate wells.
3. Dispense **200 µL Enzyme Conjugate** into each well. Thoroughly mix for 10 seconds. It is important to have a complete mixing in this step.
4. Incubate for **60 minutes** at room temperature.
5. Briskly shake out the contents of the wells. Rinse the wells **3 times** with diluted *Wash Solution* (400 µL per well). Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.
Important note: The sensitivity and precision of this assay is markedly influenced by the correct performance of the washing procedure!
6. Add **100 µL of Substrate Solution** to each well.
7. Incubate for **15 minutes** at room temperature.
8. Stop the enzymatic reaction by adding **50 µL of Stop Solution** to each well.
9. Determine the absorbance (OD) of each well at **450 ± 10 nm** with a microtiter plate reader. It is recommended that the wells be read **within 10 minutes** after adding the *Stop Solution*.

6.3 Calculation of Results

1. Calculate the average absorbance values for each set of standards, controls and patient 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 standard curve.
4. Automated method: The results in the Instructions for Use have been calculated automatically using a 4-Parameter curve fit. (4 Parameter Rodbard or 4 Parameter Marquardt are the preferred methods.) Other data reduction functions may give slightly different results.
5. The concentration of the samples can be read directly from this standard curve. Samples with concentrations higher than that of the highest standard have to be further diluted or reported as > 10 µg/mL. For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

6.3.1 Example of Typical Standard Curve

The following data is for demonstration only and **cannot** be used in place of data generations at the time of assay.

Standard	Optical Units (450 nm)
Standard 0 (0 µg/mL)	1.69
Standard 1 (0.1 µg/mL)	1.35
Standard 2 (0.5 µg/mL)	0.93
Standard 3 (1.0 µg/mL)	0.67
Standard 4 (2.5 µg/mL)	0.46
Standard 5 (5.0 µg/mL)	0.33
Standard 6 (10.0 µg/mL)	0.23

7 REFERENCE RANGES HEALTHY POPULATION

The reference values of the DHEA-S ELISA for healthy individuals were determined by measuring the values of apparently healthy subjects. 50 male and 49 female samples were measured. q-q plot (quantil-quantil plot) was performed to test normal distribution of values and give the chance to identify and exclude potentially false healthy subjects. Final calculation of 2.5th to 97.5th percentile was done with a data set which was cleared by q-q-plot analysis.

It is strongly recommended, that each laboratory should determine its own reference values.

Population	n	MEAN ($\mu\text{g/mL}$)	MEDIAN ($\mu\text{g/mL}$)	2.5 th - 97.5 th Per- centile ($\mu\text{g/mL}$)	Range (min.-max.) ($\mu\text{g/mL}$)
Male < 50 years	41	1.73	1.67	0.59 – 3.15	0.34 – 4.02
Male > 50 years	9	1.01	1.01	0.49 – 1.63	0.46 – 1.69
Female < 50 years	42	1.13	1.00	0.40 – 2.22	0.27 – 2.31
Female > 50 years	7	0.63	0.69	0.21 – 1.05	0.17 – 1.11

The results alone should not be the only reason for any therapeutic consequences. The results should be correlated to other clinical observations and diagnostic tests (4).

8 QUALITY CONTROL

Good laboratory practice requires that controls be run with each calibration curve. A statistically significant number of controls should be assayed to establish mean values and acceptable ranges to assure proper performance.

It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results. Use controls at both normal and pathological levels.

The controls and the corresponding results of the QC-Laboratory are stated in the QC certificate added to the kit. The values and ranges stated on the QC sheet always refer to the current kit lot and should be used for direct comparison of the results.

It is also recommended to make use of national or international Quality Assessment programs in order to ensure the accuracy of the results.

Employ appropriate statistical methods for analysing control values and trends. If the results of the assay do not fit to the established acceptable ranges of control materials patient results should be considered invalid.

In this case, please check the following technical areas: Pipetting and timing devices; photometer, expiration dates of reagents, storage and incubation conditions, aspiration and washing methods.

After checking the above mentioned items without finding any error contact your distributor or DEMEDITEC directly.

9 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

9.1 Assay Dynamic Range

The range of the assay is between 0.044 – 10 µg/mL.

The linear range of the assay is between 0.080 – 10 µg/mL.

9.2 Specificity of Antibodies (Cross Reactivity)

The following substances were tested for cross reactivity of the assay:

Substance	Conc. Range of Spiked Substance µg/mL	Mean Cross-Reactivity %
DHEA-S	0.50 – 1.00	100.0
Androstenedione	2.00 – 4.00	20.9
Androsterone	5.00 – 10.00	8.5
Androsterone - Sulfate	600.00	< 0.1
Progesterone	10.00 – 20.00	4.7
Testosterone	200.00 – 400.00	0.3
Estrone	600.00	0.9
Estriol	600.00	< 0.1
17β Estradiol	600.00	< 0.1
Estradiol - Sulfate	600.00	< 0.1
Cortisol	600.00	< 0.1

No substantial (>10%) cross-reactivity of the assay to structurally related substances is detected besides Androstenedione and Androsterone. Since physiological concentrations of Androstenedione and Androsterone are approx. 1000-fold lower than for DHEA-S, cross-reactivity will not substantially interfere with DHEA-S measurement.

9.3 Detection Capability

The analytical sensitivity of the DEMEDITEC ELISA was calculated by subtracting 2 standard deviations from the mean of 20 replicate analyses of Standard 0 and was found to be 0.044 µg/mL. The Limit of Blank (LoB) is 0.039 µg/mL.

9.4 Precision

9.4.1 Repeatability (Within-run)

The within run variability is shown below:

Sample	n	Mean (µg/mL)	CV (%)
1	20	0.20	4.6
2	20	1.35	5.2
3	20	4.22	4.6

9.4.2 Reproducibility (Between-run)

The between run variability is shown below:

Sample	n	Mean (µg/mL)	CV (%)
1	32	0.2	6.4
2	32	1.24	10.8
3	32	4.45	5.5

9.4.3 Reproducibility (Between-lot)

The between lot variability is shown below:

Sample	n	Mean Conc. (µg/mL) Lot 1	Mean Conc. (µg/mL) Lot 2	Mean Conc. (µg/mL) Lot 3	Mean Conc. (µg/mL)	Between- Lot CV (%)
1	18	0.61	0.54	0.62	0.59	6.7
2	18	0.96	0.87	1.01	0.95	7.5
3	18	1.73	1.51	1.74	1.66	7.9
4	18	6.88	6.39	6.84	6.70	4.0

9.5 Recovery

Samples have been spiked by adding DHEA-S solutions with known concentrations in a 1:1 ratio. The % recovery has been calculated by multiplication of the ratio of the measurements and the expected values with 100 (expected value = (endogenous DHEA-S + added DHEA-S) / 2; because of a 1:2 dilution of serum with spiked material).

Sample	Added Concentration 1:1 (v/v) (µg/mL)	Measured Conc. (µg/mL)	Expected Conc. (µg/mL)	Recovery (%)
1	--	0.20	0.20	100.0
	1.00	0.70	0.60	109.0
	2.50	1.40	1.35	106.0
	5.00	2.80	2.60	108.0
2	--	1.10	1.10	100.0
	1.00	1.10	1.05	101.0
	2.50	2.10	1.80	114.0
	5.00	3.40	3.05	110.0
3	--	3.80	3.80	100.0
	2.50	2.80	3.15	91.0
	5.00	4.30	4.40	97.0
	10.00	7.00	6.90	102.0

9.6 Linearity

Sample	Dilution	Mean Conc. (µg/ml)	Recovery (%)
1	None	4.83	-
	1:2	2.51	104.0
	1:4	1.19	99.0
	1:8	0.64	107.0
	1:16	0.32	106.0
2	None	1.15	-
	1:2	0.62	108.0
	1:4	0.31	108.0
	1:8	0.15	107.0
	1:16	0.08	109.0
3	None	4.20	-
	1:2	2.12	101.0
	1:4	1.02	98.0
	1:8	0.49	93.0
	1:16	0.26	101.0

10 LIMITATIONS OF USE

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.

10.1 Interfering Substances

Haemoglobin (up to 4 mg/mL), Bilirubin (up to 0.5 mg/mL) and Triglyceride (up to 7.5 mg/mL) have no influence on the assay results.

10.2 Drug Interferences

Until today no substances (drugs) are known to us, which have an influence to the measurement of DHEA-S in a sample.

10.3 High-Dose-Hook Effect

No hook effect was observed in this test.

11 LEGAL ASPECTS

11.1 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.

11.2 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 11.1. 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.

11.3 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 11.2. 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.

1 INTRODUCCIÓN

El **Kit de inmunoensayo enzimático DEMEDITEC DHEA-S** proporciona los materiales necesarios para la determinación cuantitativa del DHEA-S en suero y plasma.

Para uso exclusivo en diagnóstico *in vitro*. Para uso profesional en laboratorio.

2 FUNDAMENTO DEL ENSAYO

El Kit DEMEDITEC DHEA-S ELISA es un ensayo en fase sólida de inmunoadsorción unido a enzimas (ELISA), basado en el principio de unión competitiva.

Los pocillos de las placas están recubiertos con un anticuerpo policlonal dirigido contra un foci antigénico en la molécula DHEA-S. En las muestras de los pacientes DHEA-S compite con un conjugado DHEA-S -peroxidasa de rábano en la unión al anticuerpo inmovilizado. Después de la incubación el conjugado no unido se lava.

La cantidad de conjugado de peroxidasa unido es inversamente proporcional a la concentración de DHEA-S en la muestra. Después de la adición de la solución sustrato, la intensidad de color desarrollado es inversamente proporcional a la concentración de DHEA-S en la muestra del paciente.

3 PRECAUCIONES

- Este kit es solamente para diagnóstico *in vitro*.
- Por favor, se usa solo la versión válida de la metodología técnica incluido aquí en el kit.
- Para obtener información de las sustancias peligrosas incluidas en el kit por favor mirar las hojas de los datos de seguridad del material.
- Todos los reactivos en este kit de ensayo que contienen suero o plasma humano se han ensayado y confirmado ser negativos para HIV I/II, HBsAg y HCV mediante procedimientos aprobados por la FDA. Sin embargo, todos los reactivos deben ser tratados tanto en su uso como dispensación como potencialmente biopeligrosos.
- Evitar contacto con *Stop Solution* que contiene H₂SO₄ 0,5 M. Puede provocar irritación y quemaduras en la piel.
- Nunca pipetear con la boca y evitar el contacto de los reactivos y las muestras con la piel y con membranas mucosas.
- No fumar, comer, beber o usar cosméticos en áreas donde las muestras o los reactivos del kit están siendo usados.
- Usar guantes de látex cuando se utilicen las muestras y los reactivos. La contaminación microbiana de los reactivos o las muestras puede dar resultados erróneos.
- El manejo debe realizarse de acuerdo a los procedimientos definidos por las guías o regulación nacionales de seguridad de sustancias biopeligrosas.
- No utilizar los reactivos después de su fecha de caducidad que aparece en las etiquetas del kit.
- Todos los volúmenes indicados han de ser realizados de acuerdo con el protocolo. Los resultados óptimos del ensayo se obtienen solo cuando se utilizan pipetas y lectores de microplacas calibrados.
- No mezclar o usar componentes de kits con distinto número de lote. Se recomienda no intercambiar pocillos de distintas placas incluso si son del mismo lote. Los kits pueden haber sido enviados o almacenados bajo diferentes condiciones y las características de unión de las placas pueden resultar diferentes.
- Los compuestos químicos y los reactivos preparados o utilizados han de tratarse como residuos peligrosos de acuerdo con las guías o regulación nacionales de seguridad de sustancias biopeligrosas.
- Las hojas de los datos de seguridad de este producto están disponibles bajo pedido directamente a DEMEDITEC Diagnostics GmbH.

4 COMPONENTES DEL KIT

4.1 Componentes del Kit

1. **SORB MT Microtiterwells** (Placas multipocillo), 12 x 8 tiras separables, 96 pocillos; Pocillos recubiertos con anticuerpo anti- DHEA-S (policlonal).
2. **CAL 0 – 6 Standard (Standard 0-6)**, (Estándar), 7 viales, 1 mL, listo para usar; Concentraciones: 0 – 0,1 – 0,5 - 1,0 - 2,5 - 5,0 – 10,0 µg/mL
Conversión: 1 µg/mL = 2.6 µmol/L. Contiene conservante sin mercurio.
3. **ENZ CONJ Enzyme Conjugate** (Conjugado enzimático), 1 vial, 25 mL, listo para usar, DHEA-S conjugado con la Peroxidasa de rábano; Contiene conservante sin mercurio.
4. **SUB TMB Substrate Solution** (Solución de sustrato), 1 vial, 14 mL, listo para usar, Tetrametilbencidina (TMB).
5. **STOP SOLN Stop Solution** (Solución de parada), 1 vial, 14 mL, listo para usar, contiene 0.5 M H₂SO₄. Evitar el contacto con la Solución de parada. Puede causar irritación y quemaduras en la piel.
6. **WASH SOLN 40x Wash Solution** (Solución de lavado), 1 vial, 30 mL (concentrado 40X), ver “Preparación de los Reactivos”.

Nota: Se puede solicitar el *Standard 0* para la dilución de la muestra.

4.2 Equipamiento y material requerido pero no provisto

- Lector de microplacas calibrado (450 ± 10 nm)
- Micropipetas de precisión variable calibradas.
- Papel absorbente.
- Agua destilada.

4.3 Almacenamiento y estabilidad del kit

Cuando se almacena a 2 °C – 8 °C, los reactivos sin abrir mantienen su reactividad hasta la fecha de caducidad. No utilizar los reactivos más allá de esta fecha.

Los reactivos abiertos han de almacenarse a 2 °C – 8 °C. Las placas multipocillo han de almacenarse a 2 °C - 8 °C. Una vez se ha abierto la bolsa hay que tener cuidado y cerrarla de nuevo.

Los kits abiertos conservan su actividad durante dos meses si se almacenan como se ha descrito arriba.

4.4 Preparación de los Reactivos

Dejar que todos los reactivos y el número requerido de tiras alcancen la temperatura ambiente antes de usarse.

Wash Solution

Mezclar 30 mL de *Wash Solution* concentrada con 1170 mL de agua desionizada hasta un volumen final de 1200 mL. *La solución del lavado diluida es estable durante 1 semana a temperatura ambiente.*

4.5 Eliminación del Kit

La eliminación del kit debe realizarse de acuerdo con las leyes nacionales. En las hojas de datos de seguridad se proporciona información especial de este producto (ver capítulo 13).

4.6 Kits de ensayo dañados

En caso de que exista cualquier daño severo del kit de ensayo o de sus componentes, ha de informarse por escrito a DEMEDITEC, no más tarde de una semana después de recibir el kit. No deben utilizarse componentes dañados para llevar a cabo un ensayo. Han de almacenarse hasta que se encuentre una solución. Después de esto, deben ser eliminados de acuerdo con las leyes oficiales.

5 MUESTRAS

En este ensayo pueden usarse suero o plasma (plasma EDTA, Heparina o citrato).

No usar muestras hemolíticas, ictericas o lipémicas.

Tener en cuenta: No deben usarse muestras que contengan acida sódica.

5.1 Toma de muestras

Suero:

Recoger la sangre por punción en la vena (ej. Sarstedt Monovette para el suero), permitir coagulación, y separar el suero por centrifugación a temperatura ambiente. No centrifugar antes de la coagulación completa. Las muestras de pacientes que reciben terapia anticoagulante requieren más tiempo para coagular.

Plasma:

Toda la sangre ha de recogerse en tubos de centrifuga que contengan anticoagulante (Ej. Sarstedt Monovette con una preparación adecuada para el plasma) y centrifugar inmediatamente tras la recogida.

5.2 Almacenamiento de las muestras

Las muestras deben ser tapadas y pueden ser almacenadas hasta 7 días a 2 °C a 8 °C antes del ensayo.

Las muestras almacenadas por un período de tiempo mas largo (durante al menos 12 meses) han de congelarse sólo una vez a -20 °C antes del ensayo. Las muestras descongeladas deben invertirse varias veces antes del ensayo.

5.3 Dilución de las muestras

Si en un ensayo inicial, se encuentra una muestra que presenta valores mayores que el estándar mas concentrado, ha de diluirse con *Standard 0* y volver a ensayarse como se describe en el Procedimiento de Ensayo.

Para el cálculo de las concentraciones habrá que tener en cuenta el factor de dilución.

Ejemplo:

a) dilución 1:10: 10 µL muestra + 90 µL *Standard 0* (mezclar totalmente)

b) dilución 1:100: 10 µL dilución a) 1:10 + 90 µL *Standard 0* (mezclar totalmente).

6 PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

6.1 Consideraciones generales

- Todos los reactivos y muestras han de estar a temperatura ambiente antes de su uso. Todos los reactivos deben mezclarse sin formar espuma.
- Una vez se ha comenzado el ensayo deben completarse todos los pasos sin interrupción.
- Utilizar puntas de pipeta de plástico nuevas para cada estándar, control o muestra para evitar combinaciones cruzadas.
- La absorbancia es función del tiempo de incubación y la temperatura. Antes de comenzar el ensayo, se recomienda que todos los reactivos estén preparados, tapas removidas, todos los pocillos que se necesiten asegurados en recipiente, etc. Esto asegurará un tiempo similar para cada paso de pipeteo sin que haya interrupciones.
- Como regla general, la reacción enzimática es linealmente proporcional al tiempo y a la temperatura.

6.2 Procedimiento de ensayo

Cada uno debe incluir una curva de estándares.

1. Asegurar el número deseado de pocillos en el recipiente.
2. Dispensar **25 µL** de cada **Standard, Control** y **muestras** con puntas nuevas en los pocillos adecuados.
3. Dispensar **200 µL** de **Enzyme Conjugate** a cada pocillo. Mezclar totalmente durante 10 segundos. Es importante mezclar completamente en este paso.
4. Incubar durante **60 minutos** a temperatura ambiente.
5. Sacudir enérgicamente el contenido de los pocillos. Lavar los pocillos **3 veces** con *Wash Solution* diluida (400 µL por pocillo). Realizar un golpe seco de los pocillos contra el papel absorbente para eliminar las gotas residuales. **Nota importante:** La sensibilidad y la precisión de este ensayo se ve marcadamente influenciada por la realización correcta del proceso de lavado!
6. Adicionar **100 µL** de **Substrate Solution** a cada pocillo.
7. Incubar durante **15 minutos** a temperatura ambiente.
8. Parar la reacción enzimática mediante la adición de **50 µL** de **Stop Solution** a cada pocillo.
9. Leer la OD a **450 ± 10 nm** con un lector de microplacas **dentro de los 10 minutos** después de la adición de la *Stop Solution*.

6.3 Cálculo de los Resultados

1. Calcular los valores de absorbancia media para cada conjunto de estándares, controles y muestras de pacientes.
2. Construir una curva estándar mediante la representación de la absorbancia media obtenida para cada estándar frente a su concentración con el valor de absorbancia en el eje vertical (Y) y la concentración en el eje horizontal (X).
3. Usando el valor de absorbancia media de cada muestra determinar la concentración correspondiente a partir de la curva estándar.
4. Método automatizado: Los resultados en las instrucciones de uso se han calculado automáticamente usando una curva de regresión 4 Parámetros. (4 Parámetros Rodbard o 4 Parámetros Marquardt son los métodos preferidos.) Otras funciones de regresión darán lugar a resultados sensiblemente diferentes.
5. La concentración de las muestras puede leerse directamente de la curva de estándares. Las muestras con concentraciones superiores al mayor estándar han de diluirse. Para el cálculo de las concentraciones hay que tener en cuenta el factor de dilución.

6.3.1 Ejemplo de una Curva Estándar Típica

Los siguientes datos son solamente para la explicación y **no** pueden ser utilizados en lugar de los datos generados en el momento del ensayo.

Estándar	Unidades Ópticas (450 nm)
Standard 0 (0 µg/mL)	1,69
Standard 1 (0,1 µg/mL)	1,35
Standard 2 (0,5 µg/mL)	0,93
Standard 3 (1,0 µg/mL)	0,67
Standard 4 (2,5 µg/mL)	0,46
Standard 5 (5,0 µg/mL)	0,33
Standard 6 (10,0 µg/mL)	0,23

7 RANGOS DE REFERENCIA POBLACIÓN SANA

Se recomienda encarecidamente que cada laboratorio determine sus valores normales e inusuales.

En un estudio con adultos aparentemente sanos utilizando el DEMEDITEC DHEA-S ELISA se observaron los siguientes valores:

Población	n	Valor Medio (µg/mL)	Mediana (µg/mL)	2.5. - 97.5. Percentil (µg/mL)	Intervalo (mín.-máx.) (µg/mL)
Varón < 50 años	41	1,73	1,67	0,59 – 3,15	0,34 – 4,02
Varón > 50 años	9	1,01	1,01	0,49 – 1,63	0,46 – 1,69
Mujer < 50 años	42	1,13	1,00	0,40 – 2,22	0,27 – 2,31
Mujer > 50 años	7	0,63	0,69	0,21 – 1,05	0,17 – 1,11

Los resultados por sí solos no deben ser la única razón de las consecuencias terapéuticas. Los resultados deben correlacionarse con otras observaciones clínicas y pruebas diagnósticas (4).

8 CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda usar muestras control de acuerdo con las leyes estatales y federales. El uso de muestras control se recomienda para asegurar la validez diaria de los resultados. Usar controles tanto a niveles normal como patológico. Los controles y los correspondientes resultados del Laboratorio de control de calidad están fijados en el certificado de control de calidad que acompañan al kit. Los valores y los rangos fijados en la hoja del control de calidad se refieren siempre al kit actual y deben usarse para la comparación directa de los resultados. Es recomendable también hacer uso de programas de Aseguramiento de la Calidad nacionales o internacionales para asegurar la exactitud de los resultados. Utilizar métodos estadísticos apropiados para el análisis de los valores y tendencia de los controles. Si los resultados del ensayo no se ajustan a los rangos aceptables establecidos en los controles, los resultados obtenidos de los pacientes han de considerarse inválidos. En este caso, por favor comprobar las siguientes áreas técnicas: Pipeteo y tiempo empleado, fotómetro, fecha de caducidad de los reactivos, condiciones de almacenamiento e incubación, métodos de aspiración y lavado. Después de comprobar los asuntos arriba mencionado sin encontrar ningún error, contactar con su distribuidor o con DEMEDITEC directamente.

9 CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

9.1 Rango dinámico del ensayo

El rango del ensayo se encuentra entre 0.44 – 10 µg/mL.

El rango lineal del ensayo se sitúa entre 0,080 – 10 µg/mL.

9.2 Especificidad de los Anticuerpos (Reactividad Cruzada)

Consultar el manual de usuario en inglés.

9.3 Capacidad de detección

La sensibilidad analítica se calculó a partir de la media menos dos desviaciones estándar de veinte (20) réplicas del *Estándar 0* y resultó ser 0,044 µg/mL. El límite del blanco (LoB) è di 0,039 µg/mL

9.4 Precisión

9.5 Recuperación

9.6 Linealidad

Consultar el manual de usuario en inglés.

10 LIMITACIONES DE USO

Cualquier manipulación inadecuada de las muestras o modificaciones del ensayo pueden influenciar los resultados.

10.1 Sustancias que pueden interferir

Hemoglobina (hasta 4 mg/mL), Bilirrubina (hasta 0.5 mg/mL) y Triglicéridos (hasta 7,5 mg/mL) no influyen los resultados del ensayo.

10.2 Interferencias con drogas

Hasta ahora no se han encontrado sustancias (drogas) conocidas por nosotros, que tengan influencia en la medida de DHEA-S en una muestra.

10.3 Efecto Gancho-Dosis-Elevada

No se ha observado efecto gancho en este ensayo.

11 ASPECTOS LEGALES

11.1 Fiabilidad de los Resultados

El ensayo debe realizarse exactamente de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Mas aún, el usuario debe ajustarse estrictamente a las reglas BPL (Buenas Prácticas de Laboratorio) o a otros estándares y/o leyes nacionales aplicables. Esto es especialmente relevante para el uso de reactivos control. Es importante incluir siempre, dentro del procedimiento de ensayo, un número suficiente de controles para validar la exactitud y la precisión del ensayo.

Los resultados del ensayo son válidos sólo si todos los controles se encuentran dentro de los rangos especificados y si todos los otros parámetros del ensayo se encuentran dentro de las especificaciones dadas para el ensayo. En caso de alguna duda o inquietud, por favor, contactar con DEMEDITEC.

11.2 Consecuencias Terapéuticas

Las consecuencias terapéuticas nunca deben basarse sólo en los resultados de laboratorio incluso si todos los resultados del ensayo están de acuerdo con los asuntos fijados en el punto 11.1. Cualquier resultado de laboratorio es solamente una parte del cuadro clínico de un paciente.

Solamente en los casos donde los resultados de laboratorio están en acuerdo con todo el cuadro clínico de un paciente, se pueden derivar consecuencias terapéuticas.

Nunca deben derivarse consecuencias terapéuticas a partir de solamente el resultado obtenido en el ensayo

11.3 Responsabilidad









Cualquier modificación del kit y/o cambio o mezcla de cualquier componente procedentes de kits de lotes diferentes puede afectar negativamente a los resultados esperados y en la validez de todo el test. Esas modificaciones y/o cambios invalidan cualquier reclamación de reposición.

Las reclamaciones emitidas debidas a una mala interpretación de los resultados de laboratorio por parte del comprador referidos al punto 11.2 son también inválidas. A pesar de todo, en el caso de cualquier reclamación, la responsabilidad del fabricante no excede el valor del kit. Cualquier daño provocado al kit durante su transporte no está sujeto a la responsabilidad del fabricante.

12 REFERENCES / LITERATURE

1. F. Labrie, A. Bélanger, J. Simard, V. Luu-The and C. Labrie. Bristol, UK, Society for Endocrinology, 1996
2. George B Marouliss 1, Ioannis K Triantafillidis, *Pediatr Endocrinol Rev*, 2006 Jan:3 Suppl 1:205-7
3. Krysiak R1, Kowalcze K1, Bednarska-Czerwińska A1, Okopień B1. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2016, 124(4):215-9
4. Edo N et al. Diagnostic value of standard deviation score of log-transformed serum dehydroepiandrosterone sulfate in patients with hypothalamic-pituitary-adrenal axis insufficiency. *Endocrine J*, 2021, 68(11), 1337-1345

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ELISAS

Symbol	English	Deutsch	Française	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	utilisation 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 catalogo
	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	Température de conservation	Temperatura de conservación	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>	Distributed by	Vertrieb durch	Distribution par	Distribución por	Distribuzione da parte di
	Version	Version	Version	Versión	Versione
	Single-use	Einmalverwendung	À usage unique	Uso único	Uso una volta