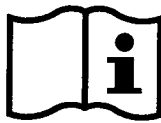


Product information

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

IVD**REF****DEH3344****96 Wells**

CONTENTS / INHALTSVERZEICHNIS

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	7
9	LIMITATIONS OF PROCEDURE	9
10	LEGAL ASPECTS	9
11	REFERENCES	10
1	EINLEITUNG	11
2	TESTPRINZIP	11
3	VORSICHTSMAßNAHMEN.....	11
4	BESTANDTEILE DES KITS	12
5	PROBENVORBEREITUNG.....	13
6	TESTDURCHFÜHRUNG.....	13
7	ERWARTETE WERTE	15
8	ASSAY CHARACTERISTIKA	15
9	GRENZEN DES TESTS	15
10	RECHTLICHE GRUNDLAGEN.....	16
11	REFERENZEN	16
	SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ELISA.....	17

1 INTRODUCTION

1.1 Intended Use

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

1.2 Summary and explanation

Dehydroepiandrosterone (DHEA; androstenolone; 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 DEMEDIATEC 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 low / Control 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°C to 8°C. Microtiter wells must be stored at 2°C to 8°C up to 30 days. 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 3 months 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 have to be informed written, 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

For determination of DHEA **serum samples** 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.

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

The results itself should not be the only reason for any therapeutically 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 0.07 – 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

Until now no substances (drugs) are known influencing the measurement of DHEA in serum. Lipemic and haemolysed samples can cause false results.

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 **DEMEDITEC DHEA ELISA** ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von DHEA in Serum. Nur für In-vitro Diagnostik.

2 TESTPRINZIP

Der DEMEDITEC 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 niedrig / Kontrolle 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.

Die Mikrotiterstreifen sollten bei 2-8°C für maximal 30 Tage 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 sind Serumproben 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.

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	
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 0,07 – 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

Bislang sind keine Stoffe (Medikamente) bekannt, deren Einnahme die Messung der DHEA-Konzentration der Probe beeinflussen würde.

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 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.

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	Consultez le Mode d'emploi	Consulte las Instrucciones	Consulti le istruzioni
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Diagnostica in vitro
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	No 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
	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
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenu	Contenido	Contenuto
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Numéro	Volumen/Número	Volume/Quantità
<i>Microtiterwells</i>	Microtiterwells	Mikrotiterwells	Plaques de microtitration	Pocillos de la Microplaca	Micropozzetti
<i>Enzyme Conjugate</i>	Enzyme Conjugate	Enzymkonjugat	Conjugué enzymatique	Conjugado enzimático	Tracciante enzimatico
<i>Substrate Solution</i>	Substrate Solution	Substratlösung	Solution substrat	Solución de sustrato	Soluzione di substrato
<i>Stop Solution</i>	Stop Solution	Stopplösung	Solution d'arrêt	Solución de paro	Soluzione d'arresto
<i>Zero Standard</i>	Zero Standard	Nullstandard	Standard 0	Standard 0	Standard zero
<i>Standard</i>	Standard	Standard	Standard	Calibrador	Standard
<i>Control</i>	Control	Kontrolle	Contrôle	Control	Controllo
<i>Wash Solution</i>	Wash Solution	Waschlösung	Solution de lavage	Solución de lavado	Soluzione di lavaggio
<i>Conjugate Diluent</i>	Conjugate Diluent	Konjugatverdünnungsmedium	Solution pour dilution du conjugué		Diluyente del tracciante

Symbol	Portugues	Dansk	Svenska	Ελληνικά
	Conformidade com as normas europeias	Europaeisk overensstemmelse	Europeisk överensstämmelse	Ευρωπαϊκή Συμμόρφωση
	Instruções de uso	Brugermanual	Användar manual	Εγχειρίδιο χρήστη
	Diagnóstico in vitro	In vitro diagnostik	Diagnostik in vitro	in vitro διαγνωστικό
	Catálogo n.º	Katalognummer	Katalog nummer	Αριθμός καταλόγου
	No do lote	Lot nummer	Batch-nummer	Αριθμός Παρτίδος
		Indeholder tilstrækkeligt til "n" test	Innehåller tillräckligt till "n" tester	Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις
	Temperatura de conservação	Opbevaringstemperatur	Förvaringstemperatur	Θερμοκρασία αποθήκευσης
	Prazo de validade	Udløbsdato	Bäst före datum	Ημερομηνία λήξης
	Fabricante	Producent	Tillverkare	Κατασκευαστής
<i>Distributed by</i>				
<i>Content</i>	Conteúdo	Indhold	Innehåll	Περιεχόμενο
<i>Volume/No.</i>	Volume/Número	Volumen/antal	Volym/antal	Όγκος/αριθ..
<i>Microtiterwells</i>	Alvéolos de microtitulação	Mikrotiterbrønde	Brunnar i Mikrotiterplatta	Πηγαδάκια Μικροτιτλοδοτήσεως
<i>Enzyme Conjugate</i>	Conjugado enzimático	Enzymkonjugat	Enzymkonjugat	Συζευγμένο ενζυμο
<i>Substrate Solution</i>	Solução de substrato	Substratopløsning	Substratlösning	Διάλυμα υποστρώματος
<i>Stop Solution</i>	Solução de paragem	Stopopløsning	Stopp lösning	Διάλυμα τερματισμού
<i>Zero Standard</i>	Padrão zero	Standard 0	Standard 0	Πρότυπο Μηδέν
<i>Standard</i>	Calibrador	Standard	Standard	Πρότυπα
<i>Control</i>	Controlo	Kontrol	Kontroll	Έλεγχος
<i>Wash Solution</i>	Solução de lavagem	Vaskebuffer	Tvätt lösning	Διάλυμα πλύσεως
<i>Conjugate Diluent</i>				