



DHEA Elisa

KAPDB490



History

Summary of change :

Old Version :	Current Version :																																																								
200904	220405																																																								
<table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%;">CAL</td> <td style="width: 50%;">0 - 5</td> </tr> </table> <p>Volume: 0.6 mL/vial</p>	CAL	0 - 5	<table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%;">CAL</td> <td style="width: 50%;">0 - 5</td> </tr> </table> <p>Volume: 1.0 mL/vial</p>	CAL	0 - 5																																																				
CAL	0 - 5																																																								
CAL	0 - 5																																																								
<table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%;">CONTROL</td> <td style="width: 50%;">N</td> </tr> </table> <p>Volume: 0.6 mL/vial</p>	CONTROL	N	<table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%;">CONTROL</td> <td style="width: 50%;">1-2</td> </tr> </table> <p>Volume: 1.0 mL/vial.</p>	CONTROL	1-2																																																				
CONTROL	N																																																								
CONTROL	1-2																																																								
ASSAY PROCEDURE Total Incubation Time: 75 min Incubation Conditions: Shaking (microplate shaker) Washing step: 3 x 300 µL/well	ASSAY PROCEDURE Total Incubation Time 110 minutes Incubation Conditions : No shaking Washing step: 3 x 350 µL/well																																																								
TYPICAL TABULATED DATA <table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <thead> <tr> <th>Calibrator</th> <th>Mean OD (450 nm)</th> <th>Value (ng/ml)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>Calibrator 0</td><td>2.450</td><td>0</td></tr> <tr><td>Calibrator 1</td><td>2.103</td><td>0.2</td></tr> <tr><td>Calibrator 2</td><td>1.450</td><td>1</td></tr> <tr><td>Calibrator 3</td><td>0.693</td><td>5</td></tr> <tr><td>Calibrator 4</td><td>0.340</td><td>15</td></tr> <tr><td>Calibrator 5</td><td>0.146</td><td>40</td></tr> <tr><td>Unknown</td><td>1.032</td><td>2.3</td></tr> </tbody> </table>	Calibrator	Mean OD (450 nm)	Value (ng/ml)	Calibrator 0	2.450	0	Calibrator 1	2.103	0.2	Calibrator 2	1.450	1	Calibrator 3	0.693	5	Calibrator 4	0.340	15	Calibrator 5	0.146	40	Unknown	1.032	2.3	TYPICAL TABULATED DATA <table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <thead> <tr> <th>Calibrator</th> <th>Mean OD (450 nm)</th> <th>% Binding</th> <th>Value (ng/mL)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>Calibrator 0</td><td>2.555</td><td>100</td><td>0</td></tr> <tr><td>Calibrator 1</td><td>2.033</td><td>80</td><td>0.2</td></tr> <tr><td>Calibrator 2</td><td>1.411</td><td>55</td><td>1</td></tr> <tr><td>Calibrator 3</td><td>0.663</td><td>26</td><td>5</td></tr> <tr><td>Calibrator 4</td><td>0.345</td><td>14</td><td>15</td></tr> <tr><td>Calibrator 5</td><td>0.190</td><td>7</td><td>40</td></tr> <tr><td>Unknown</td><td>1.025</td><td>40</td><td>2.14</td></tr> </tbody> </table>	Calibrator	Mean OD (450 nm)	% Binding	Value (ng/mL)	Calibrator 0	2.555	100	0	Calibrator 1	2.033	80	0.2	Calibrator 2	1.411	55	1	Calibrator 3	0.663	26	5	Calibrator 4	0.345	14	15	Calibrator 5	0.190	7	40	Unknown	1.025	40	2.14
Calibrator	Mean OD (450 nm)	Value (ng/ml)																																																							
Calibrator 0	2.450	0																																																							
Calibrator 1	2.103	0.2																																																							
Calibrator 2	1.450	1																																																							
Calibrator 3	0.693	5																																																							
Calibrator 4	0.340	15																																																							
Calibrator 5	0.146	40																																																							
Unknown	1.032	2.3																																																							
Calibrator	Mean OD (450 nm)	% Binding	Value (ng/mL)																																																						
Calibrator 0	2.555	100	0																																																						
Calibrator 1	2.033	80	0.2																																																						
Calibrator 2	1.411	55	1																																																						
Calibrator 3	0.663	26	5																																																						
Calibrator 4	0.345	14	15																																																						
Calibrator 5	0.190	7	40																																																						
Unknown	1.025	40	2.14																																																						
Old performance characteristics	New performance characteristics for sensitivity, linearity, precision Section "Interferences" added																																																								
EXPECTED NORMAL VALUES 120 samples from putatively normal individuals between 20 and 39 years of age were analysed and the reference range was determined using a non-parametric method. As for all clinical assays each laboratory should collect data and establish their own range of expected normal values.	REFERENCE RANGES Reference ranges were established using serum samples from 264 female donors between 18-63 years old and 130 male donors between 18-65 years old. The reference ranges were determined using a non-parametric method and are summarized in the table below. Each laboratory shall establish their own reference ranges.																																																								
<table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <thead> <tr> <th>Group</th> <th>95% Confidence Range (ng/mL)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>Females</td><td>1.2 – 6.3</td></tr> <tr><td>Males</td><td>1.7 – 6.1</td></tr> </tbody> </table>	Group	95% Confidence Range (ng/mL)	Females	1.2 – 6.3	Males	1.7 – 6.1	<table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <thead> <tr> <th>Adults</th> <th>Age (years)</th> <th>N</th> <th>Median (ng/mL)</th> <th>Mean (ng/mL)</th> <th>95% Reference Range (ng/mL)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>Males</td><td>18–65</td><td>130</td><td>2.80</td><td>3.04</td><td>1.33–6.48</td></tr> <tr><td>Females</td><td>18–63</td><td>264</td><td>2.35</td><td>2.61</td><td>1.00–5.86</td></tr> </tbody> </table> <table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <thead> <tr> <th>Children</th> <th>Age (years)</th> <th>N</th> <th>Total Range* (ng/mL)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td rowspan="3">Males</td><td>1–9</td><td>28</td><td>0.20–1.5</td></tr> <tr><td>10–14</td><td>23</td><td>0.58–3.7</td></tr> <tr><td>15–18</td><td>14</td><td>1.50–3.6</td></tr> <tr><td rowspan="3">Females</td><td>2–9</td><td>27</td><td>0.36–3.6</td></tr> <tr><td>10–14</td><td>21</td><td>0.47–5.5</td></tr> <tr><td>15–18</td><td>19</td><td>0.41–5.7</td></tr> </tbody> </table>	Adults	Age (years)	N	Median (ng/mL)	Mean (ng/mL)	95% Reference Range (ng/mL)	Males	18–65	130	2.80	3.04	1.33–6.48	Females	18–63	264	2.35	2.61	1.00–5.86	Children	Age (years)	N	Total Range* (ng/mL)	Males	1–9	28	0.20–1.5	10–14	23	0.58–3.7	15–18	14	1.50–3.6	Females	2–9	27	0.36–3.6	10–14	21	0.47–5.5	15–18	19	0.41–5.7								
Group	95% Confidence Range (ng/mL)																																																								
Females	1.2 – 6.3																																																								
Males	1.7 – 6.1																																																								
Adults	Age (years)	N	Median (ng/mL)	Mean (ng/mL)	95% Reference Range (ng/mL)																																																				
Males	18–65	130	2.80	3.04	1.33–6.48																																																				
Females	18–63	264	2.35	2.61	1.00–5.86																																																				
Children	Age (years)	N	Total Range* (ng/mL)																																																						
Males	1–9	28	0.20–1.5																																																						
	10–14	23	0.58–3.7																																																						
	15–18	14	1.50–3.6																																																						
Females	2–9	27	0.36–3.6																																																						
	10–14	21	0.47–5.5																																																						
	15–18	19	0.41–5.7																																																						



For the direct quantitative determination of Dehydroepiandrosterone (DHEA) in human serum by enzyme immunoassay.

KAPDB490 IN VITRO DIAGNOSTIC

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 90

INTENDED USE

For the quantitative measurement of Dehydroepiandrosterone (DHEA) in human serum by an ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

This kit is intended for professional use only and is for laboratory use only. For in vitro diagnostic use only. Intended to be used manually but may be adaptable to open automated analyzers. The user is responsible for validating the performance of this kit with any automated analyzers.

PRINCIPLE OF THE TEST

The DHEA ELISA is a competitive immunoassay. Competition occurs between DHEA present in calibrators, controls, patient samples and an enzyme-labelled antigen (HRP conjugate) for a limited number of anti-DHEA antibody binding sites on the microplate wells. After a washing step that removes unbound materials, the TMB substrate (enzyme substrate) is added which reacts with HRP to form a blue-coloured product that is indirectly proportional to the amount of DHEA present. Following an incubation, the enzymatic reaction is terminated by the addition of the stopping solution, converting the blue colour to a yellow colour. The absorbance is measured on a microplate reader at 450 nm. A set of calibrators is used to plot a calibrator curve from which the amount of DHEA in patient samples and controls can be directly read.

CLINICAL APPLICATIONS

Dehydroepiandrosterone (DHEA) is a C19 steroid produced in the adrenal cortex and to a lesser extent in the gonads. DHEA serves as a precursor in testosterone and estrogen synthesis. Due to the presence of a 17-oxo-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 a relatively low affinity for sex hormone-binding globulin—a factor that may enhance the physiological biopotency of DHEA.

The physiological functions of DHEA are still the subject of investigation. DHEA reportedly plays a role in immune function, lipid metabolism, cholesterol, the nervous system, ageing and protection against viral infection. Serum DHEA levels are relatively high in the fetus and neonates, low during childhood, and increase during puberty until the third decade of life. No consistent change in serum DHEA levels occurs during the menstrual cycle or pregnancy. DHEA has a rapid metabolic clearance rate as compared to its sulfated conjugate. Because of this, serum DHEA levels are 100–1000 fold lower than DHEA-Sulfate levels. In addition, serum DHEA levels show significant diurnal variation which is dependent on adrenocorticotropic hormone (ACTH). Measurement of serum DHEA is a useful marker of adrenal androgen synthesis. Abnormally low levels may occur in hypoadrenalism, and elevated levels may occur in several conditions, such as 21-hydroxylase and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase deficiencies and some cases of female hirsutism.

PROCEDURAL CAUTIONS AND WARNINGS

1. This kit is for use by trained laboratory personnel (professional use only). For laboratory *in vitro* use only.
2. Practice good laboratory practices when handling kit reagents and specimens. This includes:
 - Do not pipette by mouth.
 - Do not smoke, drink, or eat in areas where specimens or kit reagents are handled.
 - Wear protective clothing and disposable gloves.
 - Wash hands thoroughly after performing the test.
 - Avoid contact with eyes; use safety glasses; in case of contact with eyes, flush eyes with water immediately and contact a doctor.
3. Users should have a thorough understanding of this protocol for the successful use of this kit. Reliable performance will only be attained by strict and careful adherence to the instructions provided.
4. Do not use the kit beyond the expiry date stated on the label.
5. If the kit reagents are visibly damaged, do not use the test kit.
6. Do not use kit components from different kit lots within a test and do not use any component beyond the expiration date printed on the label.
7. All kit reagents and specimens must be brought to room temperature and mixed gently but thoroughly before use. Avoid repeated freezing and thawing of specimens.

8. When the use of water is specified for dilution or reconstitution, use deionized or distilled water.
9. Immediately after use, each individual component of the kit must be returned to the recommended storage temperature stated on the label.
10. A calibrator curve must be established for every run.
11. It is recommended to all customers to prepare their own control materials or serum pools which should be included in every run at a high and low level for assessing the reliability of results.
12. The controls (included in kit) must be included in every run and their results must fall within the ranges stated in the quality control certificate; a failed control result might indicate improper procedural techniques or pipetting, incomplete washing, or improper reagent storage.
13. When dispensing the substrate and stopping solutions, do not use pipettes in which these liquids will come into contact with any metal parts.
14. The TMB Substrate is sensitive to light and should remain colourless if properly stored. Instability or contamination may be indicated by the development of a blue colour, in which case it should not be used.
15. Do not use grossly hemolyzed, grossly lipemic, icteric or improperly stored serum.
16. Samples or controls containing azide or thimerosal are not compatible with this kit, they may lead to false results.
17. Samples values above the measuring range of the kit may be reported as >40 ng/mL. If further dilution and retesting is required, only the DHEA sample diluent may be used to dilute serum samples. The use of any other reagent may lead to false results.
18. Avoid microbial contamination of reagents.
19. To prevent the contamination of reagents, use a new disposable pipette tip for dispensing each reagent, sample, calibrator, and control.
20. To prevent the contamination of reagents, do not pour reagents back into the original containers.
21. Kit reagents must be regarded as hazardous waste and disposed of according to local and/or national regulations.
22. Consumables used with the kit that are potentially biohazardous (e.g., pipette tips, bottles or containers containing human materials) must be handled according to biosafety practices to minimize the risk of infection and disposed of according to local and/or national regulations relating to biohazardous waste.
23. This kit contains 1 M sulfuric acid in the stopping solution component. Do not combine acid with waste material containing sodium azide or sodium hypochlorite.
24. The use of safety glasses, and disposable plastic, is strongly recommended when manipulating biohazardous or bio-contaminated solutions.
25. Proper calibration of the equipment used with the test, such as the pipettes and absorbance microplate reader, is required.
26. If a microplate shaker is required for the assay procedure, the type and speed of shaker required is stated in the REAGENTS AND EQUIPMENT NEEDED BUT NOT PROVIDED section. Both the type and speed of shaker used can influence the optical densities and test results. If a different type of shaker and/or speed is used, the user is responsible for validating the performance of the kit.
27. Do not reuse the microplate wells, they are for SINGLE USE only.
28. To avoid condensation within the microplate wells in humid environments, do not open the pouch containing the microplate until it has reached room temperature.
29. Any serious incident that has occurred in relation to the device shall be reported to the manufacturer and the competent authority of the Member State in which the user and/or the patient is established.

LIMITATIONS

1. This test is not intended to be used for screening purposes.
2. This test is not intended for home testing or self-testing.
3. The kit is calibrated for the determination of DHEA in human serum. The kit is not calibrated for the determination of DHEA in other specimens of human or animal origin.
4. The results obtained with this kit shall never be used as the sole basis for a clinical diagnosis and for therapeutic decisions.
5. Although common interfering substances have been evaluated with this test, other substances that have not been evaluated such as drugs and the occurrence of heterophilic antibodies in patients regularly exposed to animals or animal products have the potential of causing interferences

SAFETY CAUTIONS AND WARNINGS
POTENTIAL BIOHAZARDOUS MATERIAL

The reagents should be considered a potential biohazard and handled with the same precautions applied to blood specimens. All human specimens should be considered a potential biohazard and handled as if capable of transmitting infections and in accordance with good laboratory practices.

The DHEA sample diluent (not provided with the kit), contains processed human serum/plasma that has been tested by approved methods and found to be negative for the presence of HBsAg and antibodies to HCV, HIV 1/2 and HIV NAT. However, no test method can offer complete assurance that any viable pathogens are absent. Therefore, these components should be considered a potential biohazard and handled with the same precautions as applied to any blood specimen, following good laboratory practices.

CHEMICAL HAZARDS

Avoid direct contact with any of the kit reagents. Specifically avoid contact with the TMB Substrate (contains tetramethylbenzidine) and Stopping Solution (contains sulfuric acid). If contacted with any of these reagents, wash with plenty of water and refer to SDS for additional information.

SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

Approximately 0.1 mL of serum is required per duplicate determination. Collect 4–5 mL of venous blood into an appropriately labelled tube and allow it to clot. Centrifuge at room temperature and carefully transfer the serum into a new storage tube or container. Serum samples may be stored at 2-8°C for up to 24 hours or at -10°C or lower for up to 7 days. Specimens may be more stable than indicated. Consider all human specimens as possible biohazardous materials and take appropriate precautions when handling.

SPECIMEN PRETREATMENT

Specimen pre-treatment is not required.

REAGENTS AND EQUIPMENT NEEDED BUT NOT PROVIDED

1. Calibrated single-channel pipette to dispense 25 µL.
2. Calibrated multi-channel pipettes to dispense 50 µL, 100 µL and 150 µL.
3. Calibrated multi-channel pipettes to dispense 350 µL (if washing manually).
4. Automatic microplate washer (recommended).
5. Disposable pipette tips.
6. Distilled or deionized water.
7. Calibrated absorbance microplate reader with a 450 nm filter and an upper OD limit of 3.0 or greater.
8. DHEA Sample Diluent. Only required if it is necessary to dilute samples >40 ng/mL. Must be ordered separately (REF#: KAPDB490-11).

REAGENTS PROVIDED

Rabbit Anti-DHEA Antibody Coated Microwell Plate-Break Apart Wells - Ready To Use.
 Contents: One 96 well (12x8) polyclonal antibody-coated microwell plate in a resealable pouch with desiccant.
 Storage: Refrigerate at 2-8°C
 Stability: Unopened: Stable until the expiry date printed on the label.
 After Opening: Stable for four weeks.

DHEA-Horseradish Peroxidase (HRP) Conjugate - Ready To Use.

Contents: DHEA-HRP conjugate in a protein-based buffer with a non-mercury preservative.
 Volume: 14 mL/vial
 Storage: Refrigerate at 2-8°C
 Stability: Unopened: Stable until the expiry date printed on the label.
 After Opening: Stable for four weeks.

Dehydroepiandrosterone Calibrators - Ready To Use. N = 0 to 5

Contents: Six vials containing DHEA in a protein-based buffer with a non-mercury preservative. Prepared by spiking matrix with a defined quantity of DHEA.
 *Listed below are approximate concentrations, please refer to vial labels for exact concentrations.

Calibrator	Concentration	Volume/Vial
Calibrator 0	0 ng/mL	1.0 mL
Calibrator 1	0.2 ng/mL	1.0 mL
Calibrator 2	1 ng/mL	1.0 mL
Calibrator 3	5 ng/mL	1.0 mL
Calibrator 4	15 ng/mL	1.0 mL
Calibrator 5	40 ng/mL	1.0 mL

Storage: Refrigerate at 2-8°C
 Stability: Unopened: Stable until the expiry date printed on the label.
 After Opening: Stable for four weeks.

CONTROL 1-2 Controls - Ready To Use.

Contents: Two bottles of control containing different DHEA concentrations. Protein-based buffer with a non-mercury preservative. Prepared by spiking buffer with defined quantities of DHEA.
 Refer to the QC certificate for the target values and acceptable ranges
 Volume: 1.0 mL/vial
 Storage: Refrigerate at 2-8°C
 Stability: Unopened: Stable until the expiry date printed on the label.
 After Opening: Stable for four weeks.

WASH SOLN CONC Wash Buffer Concentrate - X10

Contents: One bottle containing buffer with a non-ionic detergent and a non-mercury preservative.
 Volume: 50 ml/bottle
 Storage: Refrigerate at 2-8°C
 Stability: Unopened: Stable until the expiry date printed on the label. After Opening: Stable for four weeks.
 Following Preparation: The wash buffer working solution is stable for 2 weeks following preparation, assuming Good Laboratory Practices are adhered to. To prevent microbial growth, prepare the wash buffer working solution in a clean container and store under refrigerated conditions (2-8°C) when not in use..
 Preparation: Dilute 1:10 in distilled or deionized water before use. If the whole microplate is to be used dilute 50 mL of the wash buffer concentrate in 450 mL of distilled or deionized water.

CHROM TMB TMB Substrate - Ready To Use.

Contents: One bottle containing tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide in a non-DMF or DMSO containing buffer.
 Volume: 16 mL/bottle
 Storage: Refrigerate at 2-8°C
 Stability: Unopened: Stable until the expiry date printed on the label.
 After Opening: Stable for four weeks.

STOP SOLN Stopping Solution - Ready To Use.

Contents: One vial containing 1M sulfuric acid.
 Volume: 6 mL/bottle
 Storage: Refrigerate at 2-8°C
 Stability: Unopened: Stable until the expiry date printed on the label.
 After Opening: Stable for four weeks.



Safety : refer to product SDS

ASSAY PROCEDURE

Specimen Pre-Treatment: None
All kit components, controls and specimen samples must reach room temperature prior to use. Calibrators, controls, and specimen samples should be assayed in duplicate. Once the procedure has been started, all steps should be completed without interruption.
1. After all kit components have reached room temperature, mix gently by inversion.
2. Prepare the Wash Buffer Working Solution (See section Reagents Provided section, Wash Buffer Concentrate).
3. Plan the microplate wells to be used for calibrators, controls, and samples. See section 10. Recommended Assay Layout. Remove the strips from the microplate frame that will not be used and place them in the bag with desiccant. Reseal the bag with the unused strips and return it to the refrigerator.
4. Pipette 25 µL of each calibrator, control, and specimen sample into assigned wells.
5. Pipette 100 µL of the HRP Conjugate into each well (the use of a multi-channel pipette is recommended).
6. Gently tap the microplate frame for 10 seconds to mix the contents of the wells and incubate the microplate at room temperature (no shaking) for 90 minutes .
7. Wash the microplate wells with an automatic microplate washer (preferred) or manually as stated below.

Automatic: Using an automatic microplate washer, perform a **3-cycle** wash using **350 µL/well** of Wash Buffer Working Solution (3 x 350 µL). One cycle consists of aspirating all wells then filling each well with 350 µL of Wash Buffer Working Solution. After the final wash cycle, aspirate all wells and then tap the microplate firmly against absorbent paper to remove any residual liquid.

Manually: For manual washing, perform a **3-cycle** wash using **350 µL/well** of Wash Buffer Working Solution (3 x 350 µL). One cycle consists of aspirating all wells by briskly emptying the contents of the wells over a waste container, then pipetting 350 µL of Wash Buffer Working Solution into each well using a multi-channel pipette. After the final wash cycle, aspirate all wells by briskly emptying the contents over a waste container and then tap the microplate firmly against absorbent paper to remove any residual liquid.

8. **Pipette 150 µL** of TMB Substrate into each well (the use of a multi-channel pipette is recommended).
9. Gently tap the microplate frame for 10 seconds to mix the contents of the wells and **incubate** the microplate at room temperature (no shaking) for **15-20 minutes**.
10. **Pipette 50 µL** of Stopping Solution into each well (the use of a multi-channel pipette is recommended) in the same order and speed as was used for addition of the TMB Substrate. Gently tap the microplate frame to mix the contents of the wells.
11. **Measure** the optical density (absorbance) in the microplate wells using an absorbance microplate reader set to 450 nm, within 20 minutes after addition of the Stopping Solution.

CALCULATIONS

1. Calculate the mean optical density for each calibrator, control and specimen sample duplicate.
2. Use a 4-parameter or 5-parameter curve fit with immunoassay software to generate a calibrator curve.
3. The immunoassay software will calculate the concentrations of the controls and specimen samples using the mean optical density values and the calibrator curve.
4. If a sample reads more than 40 ng/mL and needs to be diluted and retested, then dilute with DHEA Sample Diluent (see *Reagents And Equipment Needed But Not Provided* section) not more than 1:10. The result obtained must be multiplied by the dilution factor.

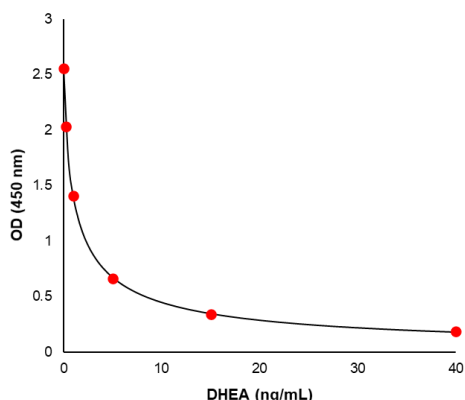
TYPICAL TABULATED DATA

Sample data only. Do not use to calculate results.

Calibrator	Mean OD (450 nm)	% Binding	Value (ng/mL)
Calibrator 0	2.555	100	0
Calibrator 1	2.033	80	0.2
Calibrator 2	1.411	55	1
Calibrator 3	0.663	26	5
Calibrator 4	0.345	14	15
Calibrator 5	0.190	7	40
Unknown	1.025	40	2.14

TYPICAL CALIBRATION CURVE

Sample curve only. Do not use to calculate results.



PERFORMANCE CHARACTERISTICS SENSITIVITY

The analytical sensitivity study was performed according to the CLSI EP17-A2 guideline. The Limit of Background (LoB), Limit of Detection (LoD) and Limit of Quantitation (LoQ) are summarized in the table below:

Parameter	DHEA (ng/mL)
LoB	0.048
LoD	0.092
LoQ	0.13

SPECIFICITY (CROSS REACTIVITY)

The following compounds were tested for cross-reactivity with the Direct DHEA ELISA kit with DHEA cross-reacting at 100%:

Steroid	%Cross-Reactivity
DHEA	100
11-Deoxycortisol	0.17
17-Hydroxypregnenolone	2.09
17 α -Hydroxyprogesterone	0.19
Aldosterone	0.11
Androstenedione	0.40
Androsterone	0.14
Cholesterol	ND
Cortisol	0.07
Corticosterone	0.12
DHEAS	<0.02
DHT	0.37
Epiandrosterone	2.49
Estradiol	0.49
Estrone	0.22
Pregnenolone	9.48
Progesterone	0.23
Testosterone	0.31

INTERFERENCES

An interference study was performed according to the CLSI EP07 guideline. No significant interference was observed for concentrations of up to 5 g/L haemoglobin, 40 mg/dL unconjugated bilirubin, 30 mg/dL conjugated bilirubin, 15 mg/mL triglycerides, 2.4 µg/mL HAMAS, 2.4 µg/mL Biotin and 1688 IU/mL Rheumatoid Factor.

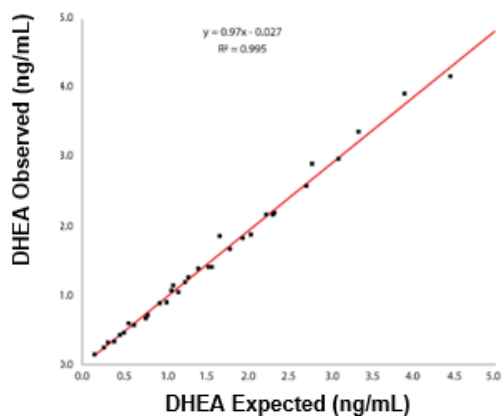
PRECISION

The precision study was performed according to the CLSI EP5-A3 guideline. The experimental protocol used a nested components-of-variance design with 8 serum samples, 10 testing days, two lots and two operators per day. Each operator ran two tests with two lots per day and two replicate measurements per run (a 10 x 2 x 2 x 2 design) using human serum samples. The results were analyzed with a two-way nested ANOVA and summarized in the table below.

Sample	Mean (ng/mL)	Within Run SD	Within Run CV%	Between Run SD	Between Run CV%	Total SD	Total CV%
1	1.20	0.05	3.8	0.12	10.2	0.13	10.9
2	3.50	0.09	2.7	0.29	8.3	0.31	8.7
3	8.88	0.25	2.8	0.54	6.1	0.64	7.2
4	3.26	0.10	3.0	0.27	8.4	0.29	9.0
5	2.81	0.10	3.5	0.25	8.7	0.26	9.4
6	1.38	0.04	3.2	0.14	10.1	0.16	11.5
7	13.28	0.36	2.7	0.95	7.1	1.08	8.1
8	20.20	0.51	2.5	1.65	8.2	1.73	8.6

LINEARITY

The linearity study was performed with four human serum samples covering the range of the assay and following the CLSI EP06-A guideline. The samples were diluted in the DHEA Sample Diluent at several equidistant concentration levels and up to ten percent (1:10), tested in quadruplicate, and the results compared to the predicted concentration. The statistical analysis shows that the assay is sufficiently linear up to a 1:10 dilution when using the DHEA sample diluent as the diluent.



17. LITERATURE

- Ahmed AA, Moselhy SS, Kumosani TA, et al. Ultrasonographic and biochemical assessments as early prediction of polycystic ovarian syndrome in obese women. *Afr Health Sci.* 2020;20(2):676–681.
- Bachmann GA, (2002) The hypoandrogenic woman: pathophysiologic overview, *Fertil Steril.* 2002;77 Suppl 4:S72–S76. doi.org/10.1016/S0015-0282(02)03003-0.
- Gleicher N, Kushnir VA, Weghofer A, Barad DH. The importance of adrenal hypoandrogenism in infertile women with low functional ovarian reserve: a case study of associated adrenal insufficiency. *Reprod Biol Endocrinol.* 2016; 26:14-23.
- Jiménez-Rubio G, Herrera-Pérez JJ, Hernández-Hernández OT, Martínez-Mota L. Relationship between androgen deficiency and memory impairment in aging and Alzheimer's disease. *Actas Esp Psiquiatr.* 45(5):227–247.
- Nakhodkin SS, Pshennikova VG, Barashkov NA, Kazantseva AV, Khusnutdinova EK, Sazonov NN, Fedorova SA (2018) Dehydroepiandrosterone Level in Yakuts Men: Impact of Smoking and Basal Psychological Parameters. *Bull North-Eastern Federal University.* M.K. Ammosova, 5(67):33-43 (article in Russian).
- Naz MSG, Tehrani FR, Majd HA, et al. The prevalence of polycystic ovary syndrome in adolescents: A systematic review and meta-analysis. *Int J Reprod Biomed.* 2019;17(8), 533–542. doi.org/10.18502/ijrm.v17i8.4818
- O'Reilly MW, Kempegowda P, Jenkinson C, et al. 11-Oxygenated C19 Steroids Are the Predominant Androgens in Polycystic Ovary Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017;102(3):840–848. doi:10.1210/jc.2016-3285
- Rutkowski K, Sowa P, Rutkowska-Talipska J, Kuryliszyn-Moskal A, Rutkowski R. Dehydroepiandrosterone (DHEA): hypes and hopes. *Drugs.* 2014;74(11):1195–1207. doi:10.1007/s40265-014-0259-8
- Turner EI, Watson MJ, Perry LA, White MC. Investigation of adrenal function in women with oligomenorrhoea and hirsutism (clinical PCOS) from the north-east of England using an adrenal stimulation test. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1992;36(4):389–397. doi:10.1111/j.1365-2265.1992.tb01465.x

RECOVERY

Low-value samples and high-value samples were mixed at different ratios and measured with the DHEA ELISA kit. The recovery (%) for each sample was calculated from the ratio between the results and the expected values. The recovery results from twelve samples were between 90 and 110%.

COMPARATIVE STUDIES

The DIAsource DHEA ELISA kit (y) was compared against a Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS/MS) method (x). The comparison of 98 serum samples yielded the following Passing-Bablok regression: $y = 0.65x + 0.61$, $r = 0.923$

REFERENCES RANGES

Reference ranges were established using serum samples from 264 female donors between 18-63 years old and 130 male donors between 18-65 years old. The reference ranges were determined using a non-parametric method and are summarized in the table below.

Each laboratory shall establish their own reference ranges.

Adults	Age (years)	N	Median (ng/mL)	Mean (ng/mL)	95% Reference Range (ng/mL)
Males	18–65	130	2.80	3.04	1.33–6.48
Females	18–63	264	2.35	2.61	1.00–5.86

Children	Age (years)	N	Total Range* (ng/mL)
Males	1–9	28	0.20–1.5
	10–14	23	0.58–3.7
	15–18	14	1.50–3.6
Females	2–9	27	0.36–3.6
	10–14	21	0.47–5.5
	15–18	19	0.41–5.7

*Since the number of pediatric samples is insufficient to establish a 95% reference range, the total range is provided which shows the lowest to the highest value obtained in each age group.

Revision date : 2022-04-05

Other translations of this Instructions for Use can be downloaded from our website: <https://www.diasource-diagnostics.com/>



DHEA Elisa

Para la determinación cuantitativa directa de la dehidroepiandrosterona (DHEA) en suero humano mediante inmunoensayo enzimático.

KAPDB490 DIAGNÓSTICO IN VITRO

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Bélgica - Tel.: +32 10 84 99 11 - Fax: +32 10 84 99 90

INDICACIONES

Para la determinación cuantitativa directa de la dehidroepiandrosterona (DHEA) en suero humano mediante inmunoensayo enzimático. Solo para uso diagnóstico *in vitro*.

Este kit está diseñado solo para uso profesional y solo para uso en laboratorio. Sólo para uso diagnóstico *in vitro*. Diseñado para usarse manualmente, pero puede adaptarse a analizadores automatizados abiertos. El usuario es responsable de validar el rendimiento de este kit con cualquier analizador automático.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El DHEA ELISA es un inmunoensayo competitivo. La competencia se produce entre la DHEA presente en los calibradores, controles, muestras de pacientes y un antígeno marcado con enzima (conjugado de HRP) por un número limitado de puntos de unión de anticuerpos anti-DHEA en los pocillos de la microplaca. Después de un paso de lavado que elimina los materiales no unidos, se agrega el sustrato TMB (sustrato enzimático) que reacciona con HRP para formar un producto de color azul que es indirectamente proporcional a la cantidad de DHEA presente. Después de una incubación, la reacción enzimática termina con la adición de la solución de parada, convirtiendo el color azul en amarillo. La absorbancia se mide en un lector de microplacas a 450 nm. Se utiliza un conjunto de calibradores para trazar una curva de calibración a partir de la cual se puede leer directamente la cantidad de DHEA en muestras de pacientes y controles.

APLICACIONES CLÍNICAS

La dehidroepiandrosterona (DHEA) es un esteroide C19 que se produce en la corteza suprarrenal y, en menor medida, en las gónadas. La DHEA actúa como precursor en la síntesis de la testosterona y los estrógenos. Debido a la presencia de un grupo 17-oxo, la actividad androgénica de la DHEA es relativamente débil; se ha estimado que es un ~10% de la de la testosterona. No obstante, en neonatos, niños prepúberes y mujeres adultas, los niveles de DHEA en circulación pueden ser varias veces superiores a las concentraciones de testosterona, lo que puede dar lugar a una rápida conversión del tejido periférico en potentes andrógenos (androstenediona y testosterona) y estrógenos. Además, la DHEA tiene una afinidad relativamente baja con la globulina fijadora de hormonas sexuales. Estos factores pueden aumentar la biopotencia fisiológica de la DHEA.

El papel fisiológico de la DHEA no se ha definido concluyentemente. Se han demostrado diversos efectos *in vivo* e *in vitro*, incluidos efectos antitumorales, provocando la prevención y/o la regresión de cánceres de piel y colon espontáneos o inducidos químicamente en roedores. Algunos informes sugieren que en las mujeres con riesgo de padecer cáncer de mama la producción de DHEA es baja. Se ha notificado actividad terapéutica de la DHEA en animales con diabetes de origen genético, obesidad y enfermedad cardiovascular. La DHEA también tiene efecto en la función inmune, el metabolismo de lípidos, el colesterol, el sistema nervioso, el envejecimiento y la protección contra el desarrollo de virus.

Los niveles de DHEA en suero de fetos y neonatos son relativamente altos, bajos durante la infancia y aumentan durante la pubertad y hasta la tercera década de vida. No aparecen cambios constantes en los niveles de DHEA en suero durante el ciclo menstrual ni el embarazo. La DHEA tiene una tasa de eliminación metabólica rápida en comparación con su conjugado sulfatado, la DHEA-S. Debido a esto, los niveles de DHEA en suero son entre 100 y 1000 veces menores que los niveles de DHEA-S. Además, los niveles de DHEA en suero muestran una significativa variación diurna, lo que depende de la corticotropina (ACTH). La determinación de la DHEA en suero es un marcador útil para la síntesis de este andrógeno suprarrenal. En el hipoadrenalismo pueden aparecer niveles anormalmente bajos, y los niveles elevados pueden ocurrir en presencia de enfermedades graves como el adenoma y el carcinoma suprarrenal virilizante, la deficiencia de 21-hidroxilasa y 3 β -hidroxisteroide deshidrogenasa y en algunos casos de hirsutismo femenino.

PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS SOBRE EL PROCEDIMIENTO

1. Este kit es para ser usado por personal capacitado del laboratorio (solo para uso profesional). Solo para uso *in vitro* en laboratorio.
2. Siga siempre buenas prácticas de laboratorio al manipular los reactivos y las muestras del kit. Esto incluye:
 - No pipetear con la boca.
 - No fume, beba ni coma en áreas donde se manipulan muestras o reactivos del kit.

- Use ropa protectora y guantes desechables.
 - Lávese bien las manos después de realizar la prueba.
 - Evite contacto visual. Use gafas de seguridad. En caso de contacto con los ojos, enjuáguelos inmediatamente con agua y consulte a un médico.
3. Los usuarios deben tener un conocimiento completo de este protocolo para el uso exitoso de este kit. Solo se logrará un rendimiento fiable mediante el cumplimiento estricto y cuidadoso de las instrucciones proporcionadas.
 4. No utilice el kit más allá de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
 5. Si los reactivos del kit están visiblemente dañados, no utilice el kit de prueba.
 6. No use componentes del kit de diferentes lotes dentro de una prueba y no use ningún componente más allá de la fecha de vencimiento impresa en la etiqueta.
 7. Todos los reactivos del kit y las muestras deben llevarse a temperatura ambiente y mezclarse suave pero completamente antes de su uso. Evite congelar y descongelar repetidamente las muestras.
 8. Cuando se especifique el uso de agua para dilución o reconstitución, use agua desionizada o destilada.
 9. Inmediatamente después de su uso, cada componente individual del kit debe devolverse a la temperatura de almacenamiento recomendada que se indica en la etiqueta.
 10. Se debe establecer una curva de calibración para cada ejecución.
 11. Se recomienda a todos los clientes que preparen sus propios materiales de control o mezclas de suero que deben incluirse en cada ejecución a un nivel alto y bajo para evaluar la confiabilidad de los resultados.
 12. Los controles (incluidos en el kit) deben utilizarse en cada ejecución y sus resultados deben estar dentro de los rangos establecidos en el certificado de control de calidad; un resultado de control fallido puede indicar técnicas de procedimiento o pipeteo inadecuadas, lavado incompleto o almacenamiento inadecuado de los reactivos.
 13. Al dispensar el sustrato y las soluciones de parada, no utilice pipetas en las que estos líquidos entren en contacto con piezas metálicas.
 14. El sustrato TMB es sensible a la luz y debe permanecer incoloro si se almacena correctamente. La inestabilidad o la contaminación pueden indicarse por el desarrollo de un color azul, en cuyo caso no se debe utilizar.
 15. No utilice suero muy hemolizado, muy lipémico, icterico o mal almacenado.
 16. Las muestras o controles que contengan azida o timerosal no son compatibles con este kit, pueden dar lugar a resultados falsos.
 17. Los valores de las muestras por encima del rango de medición del kit pueden informarse como >40 ng/mL. Si se requiere una mayor dilución y una nueva prueba, solo se puede usar el diluyente de muestra DHEA para diluir las muestras de suero. El uso de cualquier otro reactivo puede dar lugar a resultados falsos.
 18. Evite la contaminación microbiana de los reactivos.
 19. Para evitar la contaminación de los reactivos, utilice una punta de pipeta desechable nueva para dispensar cada reactivo, muestra, calibrador y control.
 20. Para evitar la contaminación de los reactivos, no vuelva a verter los reactivos en los recipientes originales.
 21. Los reactivos del kit deben considerarse desechos peligrosos y desecharse de acuerdo con las reglamentaciones locales y/o nacionales.
 22. Los consumibles utilizados con el kit que son potencialmente biopeligrosos (p. ej., puntas de pipeta, botellas o recipientes que contienen materiales humanos) deben manipularse de acuerdo con las prácticas de bioseguridad para minimizar el riesgo de infección y desecharse de acuerdo con las reglamentaciones locales y/o nacionales relacionadas con residuos biopeligrosos.
 23. Este kit contiene ácido sulfúrico 1 M en el componente de solución de parada. No combine ácido con material de desecho que contenga azida de sodio o hipoclorito de sodio.
 24. Se recomienda encarecidamente el uso de gafas de seguridad y plástico desechable al manipular soluciones biopeligrosas o biocontaminadas.
 25. Se requiere una calibración adecuada del equipo utilizado con la prueba, como las pipetas y el lector de microplacas de absorbancia.
 26. Si se requiere un agitador de microplacas para el procedimiento de ensayo, el tipo y la velocidad del agitador requerido se indican en la sección REACTIVOS Y EQUIPO NECESARIO, PERO NO SUMINISTRADO. Tanto el tipo como la velocidad del agitador utilizado pueden influir en las densidades ópticas y los resultados de las pruebas. Si se utiliza un tipo de agitador y/o velocidad diferente, el usuario es responsable de validar el rendimiento del kit.
 27. No reutilice los pocillos de la microplaca, son de UN SOLO USO.
 28. Para evitar la condensación dentro de los pocillos de la microplaca en entornos húmedos, no abra la bolsa que contiene la microplaca hasta que alcance la temperatura ambiente.

29. Cualquier incidente grave que se haya producido en relación con el producto se comunicará al fabricante ya la autoridad competente del Estado miembro en el que esté establecido el usuario y/o el paciente.

LIMITACIONES

Esta prueba no está destinada a ser utilizada con fines de detección.

2. Esta prueba no está diseñada para realizar pruebas en el hogar ni para autoevaluarse.

3. El kit está calibrado para la determinación de DHEA en suero humano. El kit no está calibrado para la determinación de DHEA en otras muestras de origen humano o animal.

4. Los resultados obtenidos con este kit nunca se utilizarán como base única para un diagnóstico clínico y para decisiones terapéuticas.

5. Aunque se han evaluado sustancias de interferencia comunes con esta prueba, otras sustancias que no han sido evaluadas, como medicamentos y la aparición de anticuerpos heterófilos en pacientes expuestos regularmente a animales o productos de origen animal, tienen el potencial de causar interferencias

PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS DE SEGURIDAD

MATERIAL DE POTENCIAL RIESGO BIOLÓGICO

Los reactivos deben considerarse un riesgo biológico potencial y manipularse con las mismas precauciones que se aplican a las muestras de sangre. Todas las muestras humanas deben considerarse un riesgo biológico potencial y manipularse como si fueran capaces de transmitir infecciones y de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio.

El diluyente de muestra de DHEA (no provisto con el kit) contiene suero/plasma humano procesado que ha sido analizado mediante métodos aprobados y resultó negativo para la presencia de HBsAg y anticuerpos contra el VHC, el VIH 1/2 y el NAT del VIH. Sin embargo, ningún método de prueba puede ofrecer una seguridad completa de que no haya ningún patógeno viable. Por lo tanto, estos componentes deben considerarse un riesgo biológico potencial y manipularse con las mismas precauciones que se aplican a cualquier muestra de sangre, siguiendo las buenas prácticas de laboratorio.

RIESGOS QUÍMICOS

Evite el contacto directo con cualquiera de los reactivos del kit. Evite específicamente el contacto con el sustrato TMB (contiene tetrametilbencidina) y la solución de parada (contiene ácido sulfúrico). Si entra en contacto con alguno de estos reactivos, lávese con abundante agua y consulte la SDS para obtener información adicional.

RECOGIDA Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

Se requieren aproximadamente 0,1 ml de suero por determinación por duplicado. Recoja de 4 a 5 ml de sangre venosa en un tubo debidamente etiquetado y deje que se coagule. Centrifugue a temperatura ambiente y transfiera cuidadosamente el suero a un nuevo tubo o recipiente de almacenamiento. Las muestras de suero se pueden almacenar a 2-8 °C durante un máximo de 24 horas o a -10 °C o menos durante un máximo de 7 días.

Las muestras pueden ser más estables de lo indicado.

Considere todos los especímenes humanos como posibles materiales biopeligrosos y tome las precauciones adecuadas al manipularlos.

PRETRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Este ensayo es un sistema directo y no requiere ningún pretratamiento de las muestras.

REACTIVOS Y EQUIPO NECESARIO NO SUMINISTRADOS

1. Pipeta mono canal calibrada para dispensar 25 µL.
2. Pipetas multicanal calibradas para dispensar 50 µL, 100 µL y 150 µL.
3. Pipetas multicanal calibradas para dispensar 350 µL (si se lava manualmente).
4. Lavador automático de microplacas (recomendado).
5. Puntas de pipeta desechables.
6. Agua destilada o desionizada.
7. Lector de microplacas de absorbancia calibrado con un filtro de 450 nm y un límite superior de OD de 3,0 o superior.
8. Diluyente de muestras de DHEA. Solo se requiere si es necesario diluir muestras >40 ng/mL. Debe pedirse por separado (REF#: KAPDB490-11).

REACTIVOS PROPORCIONADOS

ULI **Microplaca de pocillos separables recubiertos con anticuerpos anti-DHEA de conejo** - Lista para usar.

Contenido: una microplaca de 96 pocillos (12 x 8) recubierta con anticuerpos policlonales en una bolsa resellable con desecante.

Conservación: Refrigerar a 2-8 °C

Estabilidad: Sin abrir: Estable hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta.

Después de abierto: Estable durante cuatro semanas.

Ag	HRP
----	-----

Conjugado de DHEA-peroxidasa de rábano picante (HRP) – Listo para usar.

Contenido: conjugado de DHEA-HRP en un tampón de base proteica con un conservante sin mercurio.

Volumen: 14 ml/vial

Almacenamiento: Refrigerar a 2-8 °C

Estabilidad: Sin abrir: Estable hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta.

Después de abierto: Estable durante cuatro semanas.

CAL	0-5
-----	-----

Calibradores de dehidroepiandrosterona - Listos para usar. N = 0 a 5

Contenido: seis viales que contienen DHEA en un tampón de base proteica con un conservante sin mercurio. Preparados añadiendo matriz con una cantidad definida de DHEA.

* A continuación se indican concentraciones aproximadas, consulte en las etiquetas de los viales las concentraciones exactas.

Calibrador	Concentración	Volumen/Vial
Calibrador 0	0 ng/ml	1.0 mL
Calibrador 1	0,2 ng/ml	1.0 mL
Calibrador 2	1 ng/ml	1.0 mL
Calibrador 3	5 ng/ml	1.0 mL
Calibrador 4	15 ng/ml	1.0 mL
Calibrador 5	40 ng/ml	1.0 mL

Almacenamiento: Refrigerar a 2-8 °C

Estabilidad: Sin abrir: Estable hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta.

Después de abierto: Estable durante cuatro semanas.

CONTROL	1 - 2
---------	-------

Controles - Listos para usar.

Contenido: dos viales que contienen DHEA en un tampón de base proteica con un conservante sin mercurio. Preparados añadiendo suero con cantidades definidas de DHEA. Consulte en las etiquetas el intervalo aceptable.

Volumen: 1,0 ml/vial

Almacenamiento: Refrigerar a 2-8 °C

Estabilidad: Sin abrir: Estable hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta.

Después de abierto: Estable durante cuatro semanas.

WASH	SOLN	CONC
------	------	------

Tampón de lavado concentrado X10

Contenido: un frasco que contiene tampón con un detergente no iónico y un conservante sin mercurio.

Volumen: 50 ml/frasco

Almacenamiento: Refrigerar a 2-8 °C

Estabilidad: Sin abrir: Estable hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta.

Después de abierto: Estable durante cuatro semanas.

Preparación: diluir 1:10 en agua destilada o desionizada antes de usar. Si se va a utilizar la placa completa, diluir 50 ml del tampón de lavado concentrado en 450 ml de agua.

CHROM	TMB
-------	-----

Sustrato de TMB - Listo para usar.

Contenido: un frasco que contiene tetrametilbencidina y peróxido de hidrógeno en un tampón que no contenga DMF ni DMSO.

Volumen: 16 ml/frasco

Almacenamiento: Refrigerar a 2-8 °C

Estabilidad: Sin abrir: Estable hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta.

Después de abierto: Estable durante cuatro semanas.

STOP	SOLN
------	------

Solución de parada - Lista para usar

Contenido: un vial con ácido sulfúrico 1 M.

Volumen: 6 ml/frasco

Almacenamiento: Refrigerar a 2-8 °C

Estabilidad: Sin abrir: Estable hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta.

Después de abierto: Estable durante cuatro semanas.



Safety : refer to product SDS

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO**Pretratamiento de las muestras:**

Ninguno.

Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente antes de utilizar. Los calibradores, los controles y las muestras humanas deben analizarse por duplicado. Una vez que se haya iniciado al procedimiento, deben completarse todos los pasos sin interrupción.

- Después de que todos los componentes del kit hayan alcanzado la temperatura ambiente, mezcle suavemente por inversión..
- Retire el número necesario de tiras de micropocillos. Vuelva a sellar la bolsa y a guardar las tiras no utilizadas en el frigorífico.
- Planifique los pocillos de la microplaca que se utilizarán para calibradores, controles y muestras. Consulte la sección 10. Diseño de ensayo recomendado. Retire las tiras del marco de la microplaca que no se utilizarán y colóquelas en la bolsa con desecante. Vuelva a sellar la bolsa con las tiras sin usar y devuélvala al refrigerador.
- Pipetee 25 µL de cada calibrador, control y muestra de muestra en los pocillos asignados.
- Pipetee 100µL del conjugado HRP en cada pocillo (se recomienda el uso de una pipeta multicanal).
- Golpee suavemente el marco de la microplaca durante 10 segundos para mezclar el contenido de los pocillos e incube la microplaca a temperatura ambiente durante 90 minutos, sin agitar.
- Lave los pocillos de la microplaca con un lavador de microplacas automático (preferido) o manualmente, como se indica a continuación.

Automático: con un lavador automático de microplacas, realice un lavado de 3 ciclos con 350 µL/pocillo de solución de trabajo de tampón de lavado (3 x 350 µL). Un ciclo consiste en aspirar todos los pocillos y luego llenar cada pocillo con 350 µL de solución de trabajo de tampón de lavado. Después del ciclo de lavado final, aspire todos los pocillos y luego golpee la microplaca firmemente contra papel absorbente para eliminar cualquier líquido residual.

Manualmente: Para el lavado manual, realice un lavado de 3 ciclos con 350 µL/pocillo de solución de trabajo de tampón de lavado (3 x 350 µL). Un ciclo consiste en aspirar todos los pocillos vaciando enérgicamente el contenido de los pocillos sobre un recipiente de residuos y luego pipeteando 350 µL de solución de trabajo de tampón de lavado en cada pocillo con una pipeta multicanal. Después del último ciclo de lavado, aspire todos los pocillos vaciando rápidamente el contenido sobre un contenedor de residuos y luego golpee firmemente la microplaca contra papel absorbente para eliminar cualquier líquido residual.

- Pipetee 150 µL de sustrato TMB en cada pocillo (se recomienda el uso de una pipeta multicanal).
- Golpee suavemente el marco de la microplaca durante 10 segundos para mezclar el contenido de los pocillos e incube la microplaca a temperatura ambiente (sin agitar) durante 15-20 minutos.
- Pipetee 50µL de solución de parada en cada pocillo (se recomienda el uso de una pipeta multicanal) en el mismo orden y la velocidad que se usó para la adición del sustrato TMB. Golpee suavemente el marco de la microplaca para mezclar el contenido de la pocillos.
- Mida la densidad óptica (absorbancia) en los pocillos de la microplaca utilizando un lector de microplacas de absorbancia ajustado a 450 nm, dentro de los 20 minutos posteriores a la adición de la solución de parada.

CÁLCULOS

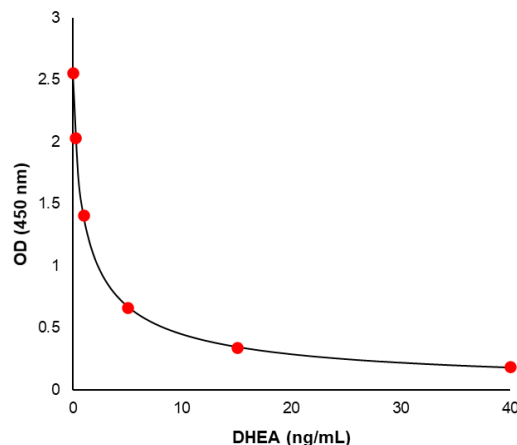
- Calcule la densidad óptica media de cada duplicado del calibrador.
- Trace una curva de calibración en papel semilogarítmico con las densidades ópticas medias en el eje de ordenadas (Y) y las concentraciones del calibrador en el eje de abscisas (X). Si se va a utilizar un software para inmunoensayos, se recomienda una curva de 4 o de 5 parámetros.
- Calcule la densidad óptica media de cada duplicado desconocido.
- Lea los valores de los desconocidos directamente de la curva de calibración. Si la lectura de alguna muestra es superior a 40 ng/ml, dilúyala con el diluyente de la muestra de DHEA (consulte la sección Reactivos y equipos necesarios pero no proporcionados) no más de 1:10. El resultado obtenido debe multiplicarse por el factor de dilución.

DATOS TÍPICOS TABULADOS

Calibrador	DO medio (450 nm)	% Binding	Valor (ng/ml)
Calibrador 0	2.555	100	0
Calibrador 1	2.033	80	0.2
Calibrador 2	1.411	55	1
Calibrador 3	0.663	26	5
Calibrador 4	0.345	14	15
Calibrador 5	0.190	7	40
Desconocido	1.025	40	2.14

CURVA TÍPICA DE CALIBRACIÓN

Solo curva de la muestra. **No** usar para calcular resultados.

**EFICACIA DIAGNÓSTICA SENSIBILIDAD**

El estudio de sensibilidad analítica se realizó según la guía CLSI EP17-A2. El límite de fondo (LoB), el límite de detección (LoD) y el límite de cuantificación (LoQ) se resumen en la siguiente tabla:

ESPECIFICIDAD (REACTIVIDAD CRUZADA)

Se evaluó la reactividad cruzada de los siguientes compuestos con el kit Direct DHEA ELISA, siendo la reactividad cruzada de la DHEA del 100 %.

Esteroides	% Reactividad cruzada
DHEA	100
11-Deoxycortisol	0.17
17-Hidroxyprogesterona	2.09
17α-Hidroxyprogesterona	0.19
Aldosterona	0.11
Androstenediona	0.40
Androsterona	0.14
Colesterol	ND
Cortisol	0.07
Corticosterona	0.12
DHEAS	<0.02
DHT	0.37
Epiandrosterona	2.49
Estradiol	0.49
Estrona	0.22
Pregnenolona	9.48
Progesterona	0.23
Testosterona	0.31

Interferencias

Se realizó un estudio de interferencias según la directriz CLSI EP07. No se observaron interferencias significativas para concentraciones de hasta 5g/L de hemoglobina, 40mg/dL de bilirrubina no conjugada, 30 mg/dL de bilirrubina conjugada, 15 mg/mL de triglicéridos, 2,4 µg/mL de HAMAS, 2,4µg/mL de Biotina y 1688UI/ml Factor reumatoide.

Se analizaron tres muestras diez veces cada una con la misma curva de calibración. Los resultados (en ng/ml) se tabulan a continuación:

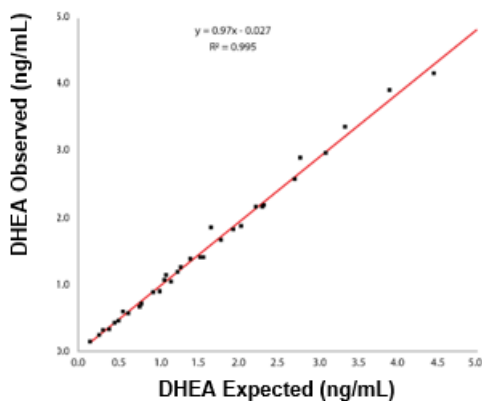
PRECISIÓN

El estudio de precisión se realizó de acuerdo con la directriz CLSI EP5-A3. El protocolo experimental usó un diseño anidado de componentes de varianza con 8 muestras de suero, 10 días de prueba, dos lotes y dos operadores por día. Cada operador realizó dos pruebas con dos lotes por día y dos mediciones repetidas por ejecución (un diseño de 10 x 2 x 2 x 2) utilizando muestras de suero humano. Los resultados se analizaron con un ANOVA anidado de dos vías y se resumen en la siguiente tabla.

Muestra	Media (ng/mL)	Dentro Run SD	Dentro Run CV%	Entre Run SD	Dentro Run CV%	Total SD	Total CV%
1	1.20	0.05	3.8	0.12	10.2	0.13	10.9
2	3.50	0.09	2.7	0.29	8.3	0.31	8.7
3	8.88	0.25	2.8	0.54	6.1	0.64	7.2
4	3.26	0.10	3.0	0.27	8.4	0.29	9.0
5	2.81	0.10	3.5	0.25	8.7	0.26	9.4
6	1.38	0.04	3.2	0.14	10.1	0.16	11.5
7	13.28	0.36	2.7	0.95	7.1	1.08	8.1
8	20.20	0.51	2.5	1.65	8.2	1.73	8.6

LINEALIDAD

El estudio de linealidad se realizó con cuatro muestras de suero humano que cubrían el rango del ensayo y siguiendo la directriz CLSI EP06-A. Las muestras se diluyeron en DHEA a varios niveles de concentración equidistantes y hasta un diez por ciento (1:10), se analizaron por cuadruplicado y los resultados se compararon con la concentración predicha. El análisis estadístico muestra que el ensayo es suficientemente lineal hasta una dilución de 1:10 cuando se usa el diluyente de muestra DHEA como diluyente.



Recuperación

Las muestras de bajo valor y las muestras de alto valor se mezclaron en diferentes proporciones y se midieron con el kit DHEA ELISA. La recuperación (%) para cada muestra se calculó a partir de la relación entre los resultados y los valores esperados. Los resultados de recuperación de doce muestras estuvieron entre 90 y 110%.

Estudios comparativos

El kit DIAsource DHEA ELISA (y) se comparó con un método de cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS/MS) (x). La comparación de 98 muestras de suero arrojó la siguiente regresión de Passing-Bablok:

$$y = 0,65x + 0,61, r = 0,923$$

RANGO DE REFERENCIA

Los rangos de referencia se establecieron utilizando muestras de suero de 264 donantes mujeres entre 18 y 63 años y 130 donantes hombres entre 18 y 65 años. Los rangos de referencia se determinaron utilizando un método no paramétrico y se resumen en la siguiente tabla.

Cada laboratorio establecerá sus propios rangos de referencia.

Adultos	Edad (años)	N	Mediana (ng/mL)	Media (ng/mL)	95% Rango de Referencia (ng/mL)
Hombres	18–65	130	2.80	3.04	1.33–6.48
Mujeres	18–63	264	2.35	2.61	1.00–5.86

Niños	Edad (años)	N	Rango Totale* (ng/mL)
Varones	1–9	28	0.20–1.5
	10–14	23	0.58–3.7
	15–18	14	1.50–3.6
Feminas	2–9	27	0.36–3.6
	10–14	21	0.47–5.5
	15–18	19	0.41–5.7

*Dado que el número de muestras pediátricas es insuficiente para establecer un rango de referencia del 95%, se proporciona el rango total que muestra de menor a mayor valor obtenido en cada grupo de edad.

REFERENCIAS

- Ahmed AA, Moselhy SS, Kumosani TA, et al. Ultrasonographic and biochemical assessments as early prediction of polycystic ovarian syndrome in obese women. *Afr Health Sci*. 2020;20(2):676–681.
- Bachmann GA. (2002) The hypoandrogenic woman: pathophysiologic overview. *Fertil Steril*. 2002;77 Suppl 4:S72–S76. doi.org/10.1016/S0015-0282(02)03003-0.
- Gleicher N, Kushnir VA, Weghofer A, Barad DH. The importance of adrenal hypoandrogenism in infertile women with low functional ovarian reserve: a case study of associated adrenal insufficiency. *Reprod Biol Endocrinol*. 2016; 26:14-23.
- Jiménez-Rubio G, Herrera-Pérez JJ, Hernández-Hernández OT, Martínez-Mota L. Relationship between androgen deficiency and memory impairment in aging and Alzheimer's disease. *Actas Esp Psiquiatr*. 45(5):227–247.
- Nakhodkin SS, Pshennikova VG, Barashkov NA, Kazantseva AV, Khusnutdinova EK, Sazonov NN, Fedorova SA (2018) Dehydroepiandrosterone Level in Yakuts Men: Impact of Smoking and Basal Psychological Parameters. *Bull North-Eastern Federal University*. M.K. Ammosova, 5(67):33-43 (article in Russian).
- Naz MSG, Tehrani FR, Majd HA, et al. The prevalence of polycystic ovary syndrome in adolescents: A systematic review and meta-analysis. *Int J Reprod Biomed*. 2019;17(8), 533–542. doi.org/10.18502/ijrm.v17i8.4818
- O'Reilly MW, Kempegowda P, Jenkinson C, et al. 11-Oxygenated C19 Steroids Are the Predominant Androgens in Polycystic Ovary Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017;102(3):840–848. doi:10.1210/je.2016-3285
- Rutkowski K, Sowa P, Rutkowska-Talipska J, Kuryliszyn-Moskal A, Rutkowski R. Dehydroepiandrosterone (DHEA): hopes and hopes. *Drugs*. 2014;74(11):1195–1207. doi:10.1007/s40265-014-0259-8
- Turner EI, Watson MJ, Perry LA, White MC. Investigation of adrenal function in women with oligomenorrhoea and hirsutism (clinical PCOS) from the north-east of England using an adrenal stimulation test. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1992;36(4):389–397. doi:10.1111/j.1365-2265.1992.tb01465.x

Fecha de revisión: 05/04/2022



A dehidroepiandroszteron (DHEA) enzim immunvizsgálattal történő közvetlen mennyiségi meghatározására humán szérumban.

KAPDB490 IN VITRO DIAGNOSTIC

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax: +32 10 84 99 90

RENDELTESSZERŰ HASZNÁLAT

A dehidroepiandroszteron (DHEA) ELISA (Enzimhez Kapcsolt Immunsorbens Vizsgálat) módszerrel végzett mennyiségi meghatározására humán szérumban.

Ez a készlet csak professzionális használatra és kizárólag laboratóriumi alkalmazásra szolgál. Kizárólag *in vitro* diagnosztikai felhasználásra. Kézi használatra terveztek, de adaptálható automatizált analizátorokhoz is. A készlet automatizált analizátorokkal elért teljesítőképességének validálásáért a felhasználó felel.

A VIZSGÁLAT ALAPELVE

A DHEA ELISA teszt egy kompetitív immunoassay. A kalibrátorokban, kontrollokban és a betegetől levett mintákban jelen lévő DHEA egy enzimmel jelölt antigénnel (HRP konjugátum) verseng a mikrolemezek lyukaiban jelen lévő anti-DHEA antitest korlátozott számú kötőhelyeire. A meg nem kötött anyagokat eltávolító mosási lépés után hozzáadásra kerül a TMB szubsztrát (enzim szubsztrát), ami a HRP-vel reakcióba lépve olyan kék színű terméket alkot, amely fordítottan arányos a jelen lévő DHEA mennyiségével. Az inkubációt követően az enzimátikus reakció a leállító oldat hozzáadásával ér véget, a kék színt sárgára változtatva. Az abszorbancia 450 nm-re állított mikrolemes olvasón kerül mérésre. A kalibrátorkészlet használatával szerkesztett kalibrációs görbéről közvetlenül leolvasható a betegetől levett mintákban és a kontrollokban jelen lévő DHEA mennyisége.

KLINIKAI ALKALMAZÁSOK

A dehidroepiandroszteron (DHEA) egy a mellékvesekéregben és kisebb mértékben a gonádokban termelődő C19 szteroid. A DHEA prekursoraként funkcionál a tesztoszteron és az ösztrogén szintézisében. A 17-oxo-csoport jelenléte miatt a DHEA viszonylag gyors, a tesztoszteronénak körülbelül 10% -ára becsült androgén aktivitást mutat. Újszülötteknél, serdülőkorú gyermekeknél és felnőtt nőknél előfordulhat azonban, hogy a keringő DHEA szintje többszöröse a tesztoszteron-koncentrációnak, és a perifériás szövetekben annak nagyobb aktivitású androgénekké (androsztenioid és tesztoszteron) és ösztrogénekké való gyors átalakulása zajlik le. A DHEA-nak emellett viszonylag kicsi a kötődési affinitása a szexuálhormon-kötő globulinhoz, ami fokozhatja a DHEA fiziológiai hatását.

A DHEA élettani funkciói továbbra is vizsgálat tárgyát képezik. Az eddig jelentett adatok szerint a DHEA szerepet játszik az immunrendszer működésében, a lipídanyagcserében, a koleszterinszintben, az idegrendszer működésében, az öregedésben és a vírusfertőzések elleni védelemben. A szérumban DHEA-szint viszonylag magas a magzatban és az újszülöttekben, alacsony a gyermekkorban, és növekszik a pubertás alatt az élet harmadik évtizedéig. A menstruációs ciklus vagy a terhesség alatt nem történik konzisztens változás a szérumban DHEA szintjében. A szulfatált konjugátumával összehasonlítva a DHEA-nak gyors a metabolikus kiürülési sebessége. Emiatt a szérumban DHEA-szint 100-1000-szer alacsonyabb, mint a DHEA-szulfát szint. Ezen túlmenően a szérumban DHEA-szint - az adenokortikotrop hormontól (ACTH) függően - jelentős napszaki ingadozást mutat. A szérumban DHEA-szintjének mérése a mellékvese androgén szintézisének hasznos markere. Abnormálisan alacsony szintek fordulhatnak elő hypoadrenalizmus esetén, a megemelkedett szint pedig olyan állapotokra utalhat, mint a 21-hidroxiáz és a 3-béta-hidroxi-szteroid-dehidrogenáz hiánya, valamint a női hirsutizmus néhány esete.

ELJÁRÁSI ÓVINTÉZKEDÉSEK ÉS FIGYELMEZTETÉSEK

- A készlet szakképzett laboratóriumi személyzet általi használatra készült (csak professzionális használatra). Kizárólag laboratóriumi *in vitro* felhasználásra.
- A reagens és minták kezelése során tartsa be a helyes laboratóriumi gyakorlatok előírásait! Ide tartoznak a következők:
 - Ne pipettázzon szájjal!
 - Ne dohányozzon, ne igyon és ne egyen olyan helyen, ahol a mintákat vagy reagenset kezelik!
 - Használjon védőruházatot és eldobható kesztyűt!
 - A teszt elvégzése után alaposan mosson kezet!
 - Kerülje a szembe kerülést; használjon védőszemüveget; szembe kerülés esetén azonnal öblítse ki a szemét vízzel, és forduljon orvoshoz!
- A készlet sikeres használatához a felhasználóknak alaposan ismerniük és érteniük kell a jelen protokollt. Megbízható teljesítmény kizárólag a mellékelt utasítások szigorú és gondos betartásával érhető el.

- Ne használja a készletet a címkén feltüntetett lejárati időn túl!
- Ha a készlet reagensai láthatóan sérültek, ne használja a tesztkészletet!
- Ne használjon különböző készlettelekekből származó összetevőket, és a készlet egyetlen összetevőjét se használja a címkén feltüntetett lejárati időn túl!
- Használat előtt a készlet összes reagensét és mintáját szobahőmérsékletre kell melegíteni, és óvatosan, de alaposan össze kell keverni. Kerülje a minták ismételt fagyasztását és felolvasztását!
- Ha a hígításhoz vagy feloldáshoz víz használata előírt, ionmentesített vagy desztillált vizet használjon.
- Használat után a készlet minden komponensét azonnal vissza kell helyezni a címkén feltüntetett javasolt tárolási hőmérsékletre.
- Minden mérési sorozathoz kalibrációs görbét kell készíteni.
- Minden ügyfél számára javasolt a saját kontrollanyagok vagy szűrőanyagok elkészítése, amelyeket az eredmények megbízhatóságának értékelése érdekében minden mérési sorozatba magas és alacsony szinten is be kell vonni.
- A (készletben található) kontrollokat minden mérési sorozatba be kell vonni, és fontos, hogy eredményük a minőségellenőrzési tanúsítványban megadott tartományon belül legyen; a hibás kontroll-eredmény utalhat többek között helytelen eljárási technikára vagy pipettázásra, nem kielégítő mosásra vagy a reagens nem megfelelő tárolására.
- A szubsztrát és a leállító oldat adagolásakor ne használjon olyan pipettát, amelyekben ezek a folyadékok bármilyen fém résszel érintkezhetnek.
- A TMB szubsztrát fényre érzékeny, és megfelelő tárolás esetén színtelennek kell maradnia. Kék szín kialakulása instabilitást vagy szennyeződést jelezhet. Ilyen esetben nem szabad használni a szubsztrát oldatot.
- Ne használjon erősen hemolitikált, erősen lipémiás, icterusos vagy nem megfelelően tárolt szérumot!
- Az azidot vagy tiomerzált tartalmazó minták vagy kontrollok nem kompatibilisek ezzel a készlettel, és hamis eredményekhez vezethetnek.
- A készlet mérési tartománya feletti mintaértékeket „> 40 ng/ml” formában lehet jelenteni. Ha további hígításra és ismételt vizsgálatra van szükség, a szűrőminták hígítására csak a DHEA minta hígító használható. Bármilyen más reagens használata hamis eredményekhez vezethet.
- Kerülje a reagens mikrobiális szennyeződését!
- A reagens szennyeződésének elkerülése érdekében használjon új, egyszer használatos pipettahegyet minden reagens, minta, kalibrátor és kontroll adagolásához.
- A reagens szennyeződésének elkerülése érdekében ne öntse vissza a reagenset az eredeti tartályba.
- A készlet reagensét veszélyes hulladéknak kell tekinteni, és a helyi és/vagy nemzeti előírásoknak megfelelően kell ártalmatlanítani.
- A készletben használt, biológiailag potenciálisan veszélyes anyagokat (pl. pipettahegyek, emberi anyagokat tartalmazó üvegek vagy tartályok) a fertőzés kockázatának minimalisra csökkentése érdekében a biológiai biztonsági gyakorlatnak megfelelően kell kezelni, és a biológiailag veszélyes hulladékokra vonatkozó helyi és/vagy nemzeti előírásoknak megfelelően kell ártalmatlanítani.
- Ez a készlet a leállító oldatban 1 M kénsavat tartalmaz. Ne keverje össze a savat nátrium-azidot vagy nátrium-hipokloritot tartalmazó hulladékkal!
- A biológiailag veszélyes vagy biológiailag szennyezett oldatokkal végzett munka során mindenképpen ajánlott a biztonsági szemüveg és az eldobható műanyag használat.
- Fontos, hogy biztosított legyen a vizsgálathoz használt eszközök (pl. a pipetták és az abszorbancia mikrolemes-olvasó) megfelelő kalibrálása.
- Ha a vizsgálati eljáráshoz mikrolemes-olvasó szükséges, a rázóberendezés típusát és sebességét A VIZSGÁLATHOZ SZÜKSÉGES, DE NEM BIZTOSÍTOTT REAGENSEK ÉS ESZKÖZÖK rész tartalmazza. A rázóberendezés típusa és sebessége egyaránt befolyásolhatja az optikai sűrűséget és a vizsgálati eredményeket. Eltérő típusú rázóberendezés és/vagy sebesség használata esetén a felhasználó felel a készlet teljesítőképességének validálásáért.
- Ne használja fel újra a mikrolemes-lyukakat! Azok csak EGYSZERI HASZNÁLATRA alkalmasak.
- A mikrolemes-lyukakban párás környezetben előforduló kondenzáció elkerülése érdekében ne nyissa fel a mikrolemes tartalmazó tasakot, amíg az el nem éri a szobahőmérsékletet.
- Az eszközzel kapcsolatban bekövetkezett minden súlyos eseményt jelenteni kell a gyártónak és a felhasználó és/vagy a beteg székhelye/lakóhelye

szerinti tagállam illetékes hatóságának.

AZ ELJÁRÁS KORLÁTAI

1. Ez a teszt nem használható szűrési célokra.
2. Ez a teszt otthoni tesztelésre vagy öntesztelésre nem alkalmas.
3. A készlet a DHEA humán szérumban történő meghatározására van kalibrálva. A készlet nincs kalibrálva a DHEA meghatározására más emberi vagy állati eredetű mintákban.
4. Az ezzel a készlettel kapott eredmények soha nem használhatók a klinikai diagnózis és a terápiával kapcsolatos döntések kizárólagos alapjaként.
5. A gyakorta előforduló interferáló anyagok hatását a tesztre vonatkozóan ugyan értékelték, vannak azonban olyan más, nem értékelt anyagok is (pl. gyógyszerek és az állatokkal vagy állati termékekkel rendszeresen érintkező betegeknek előforduló heterofil antitestek) amelyek szintén potenciális interferenciát okozhatnak.

BIZTONSÁGI ÖVINTÉZKEDÉSEK ÉS FIGYELMEZTETÉSEK BIOLÓGIAILAG POTENCIÁLISAN VESZÉLYES ANYAG

A reagenseket potenciális biológiai veszélynek kell tekinteni, és ugyanolyan elővigyázatossággal kell kezelni, mint a vérmintákat. Minden emberi mintát potenciális biológiai veszélynek kell tekinteni, és fertőzés továbbítására képes anyagként, a helyes laboratóriumi gyakorlatnak megfelelően kell kezelni.

A DHEA minta hígító (a készlet nem tartalmazza) feldolgozott emberi szérumot/plazmát tartalmaz, amelyet jóváhagyott módszerekkel teszteltek, és negatívnak találtak a HBsAg és a HCV, HIV 1/2 és HIV NAT antitestek jelenléte tekintetében. Egyetlen vizsgálati módszer sem nyújthat azonban teljes bizonyosságot arra vonatkozóan, hogy a vizsgált anyagban nincsenek életképes kórokozók. Ezért ezeket az összetevőket potenciális biológiai veszélynek kell tekinteni, és a helyes laboratóriumi gyakorlattal összhangban ugyanolyan elővigyázatossággal kell kezelni, mint bármely vérmintát.

KÉMIAI VESZÉLYEK

Kerülje a közvetlen érintkezést a készlet bármelyik reagensevel! Különösen kerülje az érintkezést a TMB szubsztráttal (tetrametil-benzidint tartalmaz) és a leállító oldattal (kénsavat tartalmaz)! Ha az említett reagensek bármelyikével érintkezik, bő vízzel mossa le, és további információért tekintse meg a biztonsági adatlapot (SDS).

A MINTÁK GYŰJTÉSE ÉS TÁROLÁSA

A két párhuzamosban történő meghatározáshoz körülbelül 0,1 ml szérum szükséges. Gyűjtsön 4–5 ml vénás vért egy megfelelően felcímkézett csöbe, és hagyja megalvadni. Centrifugálja szobahőmérsékleten, és óvatosan vigye át a szérumot egy új tárolócsöbe vagy tartályba. A szérumminták 2-8°C-on maximum 24 óráig, legalább -10°C-ra fagyasztható, de maximum 7 napig tárolhatók.

A minták a jelzetnél stabilabbak lehetnek.

Tekintsen minden emberi mintát biológiai veszélyes anyagnak, és kezelésekor tegyen meg minden szükséges övintézkedést!

A MINTÁK ELŐKEZELÉSE

A minta előkezelése nem szükséges.

A VIZSGÁLATHOZ SZÜKSÉGES, DE NEM BIZTOSÍTOTT REAGENSEK ÉS ESZKÖZÖK

1. Kalibrált egycsatornás pipetta 25 µl adagolásához.
2. Kalibrált többcsatornás pipetták 50 µl, 100 µl és 150 µl adagolásához.
3. Kalibrált többcsatornás pipetták 350 µl adagolásához (csak kézi mosás esetén).
4. Automata mikrolemez mosó (ajánlott).
5. Eldobható pipettahegyek.
6. Deszillált vagy ionmentesített víz.
7. Kalibrált abszorbancia mikrolemez-olvasó 450 nm-es szűrővel és 3,0 vagy annál magasabb felső OD határértékkel.
8. DHEA minta hígító. Csak akkor szükséges, ha a mintákat hígítani kell (> 40 ng/ml). Külön kell megrendelni (REF#: KAPDB490-11).

BIZTOSÍTOTT REAGENSEK

 **Nyúl anti-DHEA antitesttel bevont mikrolemez letörhető lyukakkal** - használatra kész.

Tartalom: Egy 96 lyukas (12x8), poliklonális antitesttel bevont mikrotiter lemez, visszazárható tasokban, szárítószerrel.

Tárolás: Hűtve 2-8°C-on

Stabilitás: Bontatlan állapotban: A címkén feltüntetett lejárati ideig stabil.
Felnyitás után: Négy hétig stabil.

Ag	HRP
----	-----

DHEA-tormaperoxidáz (HRP) konjugátum - használatra kész

Tartalom: DHEA-HRP konjugátum fehérje-alapú pufferben, higanymentes tartósítószerrel.

Mennyiség: 14 ml/üveg

Tárolás: Hűtve 2-8°C-on

Stabilitás: Bontatlan állapotban: A címkén feltüntetett lejárati ideig stabil.

Felnyitás után: Négy hétig stabil.

CAL	0-5
-----	-----

Dehidroepiandrosteron kalibrátorok - használatra kész. N = 0-tól 5-ig

Tartalom: Hat üveg DHEA fehérje-alapú pufferben, higanymentes tartósítószerrel. A mátrixhoz meghatározott mennyiségű DHEA-t adagolva készül. *Az alább felsorolt értékek hozzávetőleges koncentrációk. A pontos koncentrációkat az injekciós üveg címkéjén találja.

Kalibrátor	Koncentráció	Mennyiség/üveg
0 kalibrátor	0 ng/ml	1,0 ml
1 kalibrátor	0,2 ng/ml	1,0 ml
2 kalibrátor	1 ng/ml	1,0 ml
3 kalibrátor	5 ng/ml	1,0 ml
4 kalibrátor	15 ng/ml	1,0 ml
5 kalibrátor	40 ng/ml	1,0 ml

Tárolás: Hűtve 2-8°C-on

Stabilitás: Bontatlan állapotban: A címkén feltüntetett lejárati ideig stabil.

Felnyitás után: Négy hétig stabil.

CONTROL	1-2
---------	-----

Kontrollok - használatra kész.

Tartalom: Két üveg különböző DHEA-koncentrációkat tartalmazó kontroll. Fehérje-alapú puffer higanymentes tartósítószerrel. A pufferhez meghatározott mennyiségű DHEA-t adagolva készül.

A célértékeket és az elfogadható tartományokat a Minőségellenőrzési tanúsítványban találja.

Mennyiség: 1,0 ml/üveg

Tárolás: Hűtve 2-8°C-on

Stabilitás: Bontatlan állapotban: A címkén feltüntetett lejárati ideig stabil.

Felnyitás után: Négy hétig stabil.

WASH	SOLN	CONC
------	------	------

Mosópuffer koncentráció - X10

Tartalom: Egy darab, nem ionos mosószerrel és higanymentes tartósítószerrel készült puffert tartalmazó üveg.

Mennyiség: 50ml/üveg

Tárolás: Hűtve 2-8°C-on

Stabilitás: Bontatlan állapotban: A címkén feltüntetett lejárati ideig stabil.

Felnyitás után: Négy hétig stabil.

Az elkészítést követően: A mosópuffer munkaoldat az elkészítést követően 2 hétig stabil marad, feltéve, hogy betartják a helyes laboratóriumi gyakorlat előírásait. A mikrobák szaporodásának megelőzése érdekében fontos, hogy a mosópuffer munkaoldatot tiszta tartályban készítse el, és a nem használt oldatot hűtve (2-8°C) tárolja.

Elkészítés: Használat előtt hígítsa 1:10 arányban deszillált vagy ionmentesített vízben. Ha az egész mikrolemezt használja, hígítson fel 50 ml mosópuffer-koncentrátumot 450 ml deszillált vagy ionmentesített vízben.

CHROM	TMB
-------	-----

TMB szubsztrát - használatra kész.

Tartalom: Egy darab, nem-DMF vagy DMSO-tartalmú pufferben tetrametil-benzidint és hidrogén-peroxidot tartalmazó üveg.

Mennyiség: 16 ml/üveg

Tárolás: Hűtve 2-8°C-on

Stabilitás: Bontatlan állapotban: A címkén feltüntetett lejárati ideig stabil.

Felnyitás után: Négy hétig stabil.

STOP	SOLN
------	------

Leállító oldat - használatra kész.

Tartalom: Egy darab 1M kénsavat tartalmazó üveg.

Mennyiség: 6 ml/üveg

Tárolás: Hűtve 2-8°C-on

Stabilitás: Bontatlan állapotban: A címkén feltüntetett lejárati ideig stabil.

Felnyitás után: Négy hétig stabil.



Biztonság: Lásd a termék biztonsági adatlapját (SDS)

VIZSGÁLATI ELJÁRÁS

Minta-előkezelés: Nincs

Használat előtt a készlet minden összetevőjének, minden kontrollnak és mintának el kell érnie a szobahőmérsékletet. A kalibrátorok, kontrollok és minták vizsgálatát két párhuzamosban kell végezni. Az eljárás beindítását követően minden lépést

megszakítás nélkül el kell végezni.	
1.	Miután a készlet minden összetevője elérte a szobahőmérsékletet, óvatosan megfordítva keverje össze azokat.
2.	Készítse el a mosópuffer munkaoldatot (ld. A Biztosított reagensek rész, Mosópuffer koncentrátum pontjában).
3.	Tervezze meg , hogy a mikrolemez melyik lyukait használja majd a kalibrátorokhoz, kontrollokhoz és mintákhoz. Ld. a 10. pontban: Ajánlott vizsgálati elrendezés. Távolítsa el a mikrolemez keretéből a használatra nem kerülő csíkokat, és helyezze azokat a tasakba a szárítószerrel együtt. Zárja vissza a nem használt csíkokat tartalmazó tasakot, és helyezze vissza a hűtőszekrénybe.
4.	Pipettázzon 25 µl mennyiséget minden kalibrátorból, kontrollból és mintából a megfelelő lyukakba.
5.	Pipettázzon 100 µl HRP konjugátumot minden lyukba (többcsatornás pipetta használata javasolt).
6.	Óvatosan ütögesse meg a mikrolemez keretét 10 másodpercig, hogy a lyukak tartalmát összekeverje, és inkubálja a mikrolemez szobahőmérsékleten (rázás nélkül) 90 percig .
7.	Mossa a mikrolemez-lyukakat automata mikrolemez mosóval (javasolt) vagy kézzel az alábbiak szerint. <u>Automata:</u> Automata mikrolemez mosó használatával végezzen 3 mosási ciklust 350 µl/lyuk mosópuffer munkaoldattal (3 x 350 µl). Egy ciklus az összes lyuk leszívásából, illetve minden lyuk 350 µl mosópuffer munkaoldattal való feltöltéséből áll. Az utolsó mosási ciklus után szívjon le minden lyukat, majd a maradék folyadék eltávolításához erősen ütögesse a mikrolemez a nedvszívó papírhoz. <u>Kézi:</u> Kézi mosáshoz végezzen 3 mosási ciklust 350 µl/lyuk mosópuffer munkaoldattal (3 x 350 µl). Egy ciklus a lyukak tartalmának hulladéktartály feletti kiürítéséből, és minden lyuk - többcsatornás pipetta segítségével - 350 µl mosópuffer munkaoldattal való feltöltéséből áll. Az utolsó mosási ciklus után ürítse ki hulladéktartály felett a lyukak tartalmát, majd a maradék folyadék eltávolításához erősen ütögesse a mikrolemez a nedvszívó papírhoz.
8.	Pipettázzon 150 µl TMB szubsztrátot minden lyukba (többcsatornás pipetta használata javasolt).
9.	Óvatosan ütögesse meg a mikrolemez keretét 10 másodpercig, hogy a lyukak tartalmát összekeverje, és inkubálja a mikrolemez szobahőmérsékleten (rázás nélkül) 15-20 percig .
10.	Pipettázzon 50 µl leállító oldatot minden lyukba (többcsatornás pipetta használata javasolt) ugyanabban a sorrendben és sebességgel, mint ahogyan a TMB szubsztrátot adagolta. Óvatosan ütögesse meg a mikrolemez keretét a lyukak tartalmának összekeveréséhez.
11.	Mérje meg az optikai sűrűséget (abszorbanciát) a mikrolemez-lyukakban egy 450 nm-re beállított abszorbancia mikrolemez-olvasóval, a leállító oldat hozzáadását követő 20 percen belül.

SZÁMÍTÁSOK

- Számítsa ki az egyes kalibrátorok, kontrollok és minták párhuzamosainak átlagos optikai sűrűségét.
- Immunoassay szoftverrel 4-paraméteres vagy 5-paraméteres görbeillesztést használva készítse el a kalibrációs görbét.
- Az immunoassay szoftver az átlagos optikai sűrűség értékek és a kalibrációs görbe felhasználásával számítja ki a kontrollok és a minták koncentrációját.
- Ha a minta 40 ng/ml-nél nagyobb értéket mutat, és hígítani és újra tesztelni kell, akkor hígítsa a DHEA minta hígítóval (lásd A vizsgálatához szükséges, de nem biztosított reagensek és eszközök részt) maximum 1:10 arányban. A kapott eredményeket meg kell szorozni a hígítási tényezővel.

TIPIKUS ADATOK

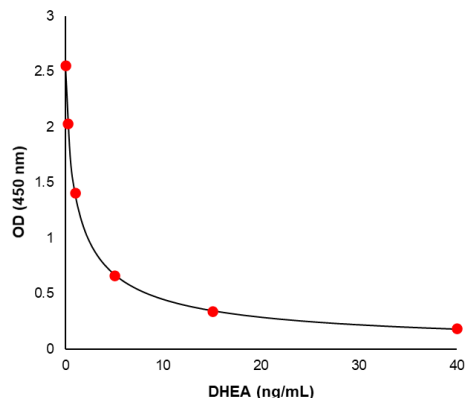
Csak minta adatok. Ne használja az eredmények kiszámításához!

Kalibrátor	Átlagos OD (450 nm)	% kötődés	Érték (ng/ml)
------------	---------------------	-----------	---------------

0 kalibrátor	2,555	100	0
1 kalibrátor	2,033	80	0,2
2 kalibrátor	1,411	55	1
3 kalibrátor	0,663	26	5
4 kalibrátor	0,345	14	15
5 kalibrátor	0,190	7	40
Ismeretlen	1,025	40	2,14

TIPIKUS KALIBRÁCIÓS GÖRBE

Csak minta görbe. **Ne** használja az eredmények kiszámításához!



TELJESÍTMÉNYJELLEMZŐK ÉRZÉKENYSÉG

Az analitikai érzékenységi vizsgálat a CLSI EP17-A2 iránymutatás szerint került elvégzésre. A vakhatár (LoB), a kimutatási határ (LoD) és a meghatározási határ (LoQ) értékeit az alábbi táblázat foglalja össze.

Paraméter	DHEA (ng/ml)
LoB	0,048
LoD	0,092
LoQ	0,13

SPECIFICITÁS (KERESZTREAKTIVITÁS)

A DHEA ELISA készlettel az alábbi vegyületek keresztreaktivitása került megvizsgálásra a DHEA 100%-os keresztreaktivitása mellett.

Szteroid	Keresztreaktivitási %
DHEA	100
11-dezoxikortizol	0,17
17-hidroxipregnenolon	2,09
17α-hidroxiprogesztéron	0,19
Aldoszteron	0,11
Androszténdion	0,40
Androszteron	0,14
Koleszterin	ND
Kortizol	0,07
Kortikoszteron	0,12
DHEAS	<0,02
DHT	0,37
Epiandroszteron	2,49
Ösztradiol	0,49
Ösztron	0,22
Pregnenolon	9,48
Progesztéron	0,23
Tesztoszteron	0,31

INTERFERENCIÁK

Az interferencia vizsgálat a CLSI EP07 iránymutatás szerint került elvégzésre. A hemoglobin max. 5 g/l, a konjugátatlan bilirubin max. 40 mg/dl, a konjugált bilirubin max. 30 mg/dl, a trigliceridek max. 15 mg/ml, a biotin max. 2,4 µg/ml, a HAMA-k max. 2,4 µg/ml és a reumafaktor (RF) max. 1688 IU/ml mennyiségben nem zavarta jelentősen a vizsgálatot.

PRECIZITÁS

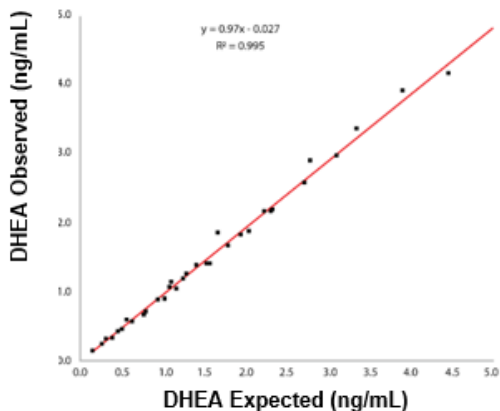
A precizitás vizsgálata a CLSI EP5-A3 iránymutatás szerint került elvégzésre. A kísérleti protokoll hierarchikus varianciaanalízist alkalmazott 8 szérummintával, 10 vizsgálati nappal, két tétellel és naponta két analitikussal. Minden analitikus naponta két tesztet végzett két tétellel, és futtatásonként két párhuzamos mérést

hajtott végre (10 x 2 x 2 x 2-es modell) humán szérumból mintákat használva. A kétszempontú hierarchikus (nested) ANOVA modellel elemzett eredményeket az alábbi táblázat foglalja össze.

Minta	Átlag (ng/ml)	Futtatáson belüli SD	Futtatáson belüli CV%	Futtatások közötti SD	Futtatások közötti CV%	Teljes SD	Teljes CV%
1	1,20	0,05	3,8	0,12	10,2	0,13	10,9
2	3,50	0,09	2,7	0,29	8,3	0,31	8,7
3	8,88	0,25	2,8	0,54	6,1	0,64	7,2
4	3,26	0,10	3,0	0,27	8,4	0,29	9,0
5	2,81	0,10	3,5	0,25	8,7	0,26	9,4
6	1,38	0,04	3,2	0,14	10,1	0,16	11,5
7	13,28	0,36	2,7	0,95	7,1	1,08	8,1
8	20,20	0,51	2,5	1,65	8,2	1,73	8,6

LINEARITÁS

A linearitás vizsgálata négy, a vizsgálat tartományát fedő szérumból felhasználásával, a CLSI EP06-A iránymutatás alapján került elvégzésre. A mintákat a DHEA minta hígításában több ekvidisztáns koncentrációban maximum tíz százalékig (1:10) hígítva négy példányban teszteltük, majd az eredményeket összehasonlítottuk az előre jelzett koncentrációkkal. A statisztikai elemzés azt mutatja, hogy a vizsgálat kellően lineáris 1:10 hígításig, hígítószerként a DHEA minta hígítót használva.



Felülvizsgálat dátuma: 2022-04-05

A jelen használati utasítás más fordításai a honlapunkról tölthetők le: <https://www.diasource-diagnostics.com/>

VISSZANYERÉS

Alacsony és magas értékű mintákat különböző arányokban kevertünk, majd elvégeztük azok mérését a DHEA ELISA készlettel. Az egyes minták visszanyerését (%) az eredmények és a várt értékek közötti arányból számítottuk ki. A visszanyerés tizenkét mintára számítva 90 és 110% között volt.

ÖSSZEHASONLÍTÓ TANULMÁNYOK

A Diasource DHEA ELISA készletet (y) egy folyadékkromatográfiás-tömegspektrometriás (LC-MS/MS) módszerrel (x) hasonlítottuk össze. A 98 szérumból minták összehasonlítása a következő Passing-Bablok regressziót eredményezte:

$$y = 0,65x + 0,61, r = 0,923$$

REFERENCIA TARTOMÁNYOK

A referencia tartományokat 264 18-63 év közötti női donortól és 130 18-65 év közötti férfi donortól származó szérumból mintákkal állapítottuk meg. A nem-parametrikus eljárással meghatározott referencia tartományokat az alábbi táblázatban foglaltuk össze.

Minden laboratóriumnak meg kell határoznia saját referencia tartományát.

Felnőttek	Életkor (év)	N	Medián (ng/ml)	Átlag (ng/ml)	95%-os referencia tartomány (ng/ml)
Férfi	18-65	130	2,80	3,04	1,33-6,48
Nő	18-63	264	2,35	2,61	1,00-5,86

Gyermek	Életkor (év)	N	Teljes Tartomány* (ng/ml)
Fiú	1-9	28	0,20-1,5
	10-14	23	0,58-3,7
	15-18	14	1,50-3,6

Lány	2-9	27	0,36-3,6
	10-14	21	0,47-5,5
	15-18	19	0,41-5,7

*Mivel a gyermekektől levett minták száma nem elegendő a 95%-os referencia tartomány megállapításához, az egyes korcsoportokban kapott legalacsonyabb és legmagasabb értéket mutató teljes tartomány került közlésre.

17. SZAKIRODALOM

- Ahmed AA, Moselhy SS, Kumosani TA, et al. Ultrasonographic and biochemical assessments as early prediction of polycystic ovarian syndrome in obese women. *Afr Health Sci.* 2020;20(2):676–681.
- Bachmann GA, (2002) The hypoandrogenic woman: pathophysiological overview, *Fertil Steril.* 2002;77 Suppl 4:S72–S76. doi.org/10.1016/S0015-0282(02)03003-0.
- Gleicher N, Kushnir VA, Weghofer A, Barad DH. The importance of adrenal hypoandrogenism in infertile women with low functional ovarian reserve: a case study of associated adrenal insufficiency. *Reprod Biol Endocrinol.* 2016; 26:14-23.
- Jiménez-Rubio G, Herrera-Pérez JJ, Hernández-Hernández OT, Martínez-Mota L. Relationship between androgen deficiency and memory impairment in aging and Alzheimer's disease. *Actas Esp Psiquiatr.* 45(5):227–247.
- Nakhodkin SS, Pshennikova VG, Barashkov NA, Kazantseva AV, Khusnutdinova EK, Sazonov NN, Fedorova SA (2018) Dehydroepiandrosterone Level in Yakuts Men: Impact of Smoking and Basal Psychological Parameters. *Bull North-Eastern Federal University.* M.K. Ammosova, 5(67):33-43 (article in Russian).
- Naz MSG, Tehrani FR, Majd HA, et al. The prevalence of polycystic ovary syndrome in adolescents: A systematic review and meta-analysis. *Int J Reprod Biomed.* 2019;17(8), 533–542. doi.org/10.18502/ijrm.v17i8.4818
- O'Reilly MW, Kempegowda P, Jenkinson C, et al. 11-Oxygenated C19 Steroids Are the Predominant Androgens in Polycystic Ovary Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017;102(3):840–848. doi:10.1210/je.2016-3285
- Rutkowski K, Sowa P, Rutkowska-Talipska J, Kuryliszyn-Moskal A, Rutkowski R. Dehydroepiandrosterone (DHEA): hypes and hopes. *Drugs.* 2014;74(11):1195–1207. doi:10.1007/s40265-014-0259-8
- Turner EI, Watson MJ, Perry LA, White MC. Investigation of adrenal function in women with oligomenorrhoea and hirsutism (clinical PCOS) from the north-east of England using an adrenal stimulation test. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1992;36(4):389–397. doi:10.1111/j.1365-2265.1992.tb01465.x