

DHEA-S



Enzyme immunoassay for the quantitative determination of DHEA-S in human serum or plasma

Dosage immunoenzymatique pour la détermination quantitative de DHEA-S dans le sérum ou le plasma humain

Inmunoensayo enzimático para la determinación cuantitativa de DHEA-S en suero o plasma humano

Only for in-vitro diagnostic use

English	2
Français	7
Español	13
Literature/ Bibliographie / Bibliografía	18
Packaging materials/ Matériels d'emballage/ Materiales de embalaje	18
Symbols Key / Explication des Symboles / Símbolos	19
Summary of Test Procedure / Résumé de la procédure de test / Resumen de la técnica	20

ENGLISH

1. INTRODUCTION

Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S), is a natural steroid hormone found atop of the kidneys in the human body. DHEA-S derived from enzymatic conversion of DHEA in adrenal and extradrenal tissues. DHEA-S is also produced in the gonads, adipose tissue and the brain. It is the most abundant hormone in the human body, and it is precursor of all sex steroids

As the most DHEA-S is produced by the zona reticularis of the adrenal, it is argued that there is a role in the immune and stress response. DHEA-S may have more biological roles. Its production in the brain suggests that it also has a role as neurosteroid.

Measurement of serum DHEA-S is a useful marker of adrenal androgen synthesis. Abnormally low levels have been reported in hypoadrenalism, while elevated levels occur in several conditions, e.g., virilising adrenal adenoma and carcinoma, 21-hydroxylase and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase deficiencies and in some cases of female hirsutism. Women with polycystic ovary syndrome tend to have normal or mildly elevated levels of DHEA-S. As very little DHEA-S is produced by the gonads, measurement of DHEA-S levels may aid in the localization of androgen source in virilising conditions.

DHEA-S shows no diurnal variation.

2. INTENDED USE

Competitive immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination of DHEA-S in human serum or plasma (EDTA).

3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

Microtiter strip wells are precoated with anti-DHEA-S antibodies (solid-phase). DHEA-S in the sample competes with added horseradish peroxidase labelled DHEA-S (enzyme-labelled antigen) for antibody binding. After incubation a bound/free separation is performed by solid-phase washing. The immune complex formed by enzyme-labelled antigen is visualized by adding Tetramethylbenzidine (TMB) substrate which gives a blue reaction product. The intensity of this product is **inversely** proportional to the amount of DHEA-S in the sample. Sulphuric acid is added to stop the reaction. This produces a yellow endpoint colour. Absorption at 450 nm is read using an ELISA microwell plate reader.

4. MATERIALS

4.1. Reagents supplied

- **Anti-DHEA-S Coated Wells:** 12 breakapart 8-well snap-off strips coated with anti-DHEA-S antibody; in resealable aluminium foil.
- **Stop Solution:** 1 bottle containing 15 ml sulphuric acid, 0.15 mol/l (avoid any skin contact).
- **DHEA-S-HRP Conjugate:** 1 bottle containing 12 ml horseradish peroxidase labelled DHEA-S.
- **TMB Substrate Solution:** 1 bottle containing 15 ml 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine (H₂O₂-TMB 0.26 g/l) (avoid any skin contact).
- **Diluent:** 1 bottle containing 100 ml HEPES 187 mM pH 7.5; BSA 0.5 g/l.
- **Control A:** 1 bottle containing 1 ml of a lot-specific control solution. The concentration is indicated on the label of the bottle.
- **Control B:** 1 bottle containing 1 ml of a lot-specific control solution. The concentration is indicated on the label of the bottle.
- **Wash solution 10 x conc.:** 1 bottle containing 50 ml of a 10 x concentrated solution of phosphate buffer 0.2 M, pH 7.4.
- **DHEA-S Standards:** 6 bottles, 1 ml each
 - Standard 0: 0 μ g/ml
 - Standard 1: 0.1 μ g /ml
 - Standard 2: 0.4 μ g /ml
 - Standard 3: 1.0 μ g /ml
 - Standard 4: 4.0 μ g /ml
 - Standard 5: 10.0 μ g /ml

4.2. Materials supplied

- 1 Cover foil
- 1 Instructions for use (IFU)

4.3. Materials and Equipment needed

- ELISA microwell plate reader, equipped for the measurement of absorbance at 450 nm, 620- 630 nm
- Manual or automatic equipment for rinsing wells
- Pipettes to deliver volumes between 10 and 1000 μ l
- Vortex tube mixer
- Distilled water
- Disposable tubes
- Timer

5. STABILITY AND STORAGE

The reagents are stable up to the expiry date stated on the label when stored at +2...+8° C in the dark.

6. REAGENT PREPARATION

It is very important to bring all reagents, samples and standards to room temperature (+22...+28° C) for at least 30 minutes before starting the test run! At the end of the assay, store immediately the reagents at 2-8° C; avoid long exposure to room temperature.

6.1. Coated snap-off Strips

The ready to use break apart snap-off strips are coated with anti-DHEA-S IgG antibodies. Store at +2...+8° C. Open the bag only when it is at room temperature. *Immediately after removal of strips, the remaining strips should be resealed in the aluminium foil along with the desiccant supplied and stored at +2...+8° C; stability until expiry date.*

6.2. DHEA-S-HRP Conjugate

The DHEA-S-HRP conjugate is ready to use.

6.3. Diluent

The diluent is ready to use.

6.4. Wash Solution

Dilute the concentrated solution with distilled water to a final volume of 500 ml prior to use. For smaller volumes respect the 1:10 dilution ratio. The diluted solution is stable for 30 days at 2...8° C. In the concentrated solution it is possible to observe the presence of crystals, in this case mix at room temperature until complete dissolution of crystals. For greater accuracy dilute the whole bottle of concentrated wash solution to 500 ml and take care that all crystals are transferred by washing the bottle, then mix until crystals are completely dissolved.

6.5. DHEA-S Standards

The standards are ready to use and are stable until the expiry date printed on the label. Opened standards are stable for six months at +2...+8° C.

6.6. TMB Substrate Solution

The bottle contains 15 ml of a tetramethylbenzidine/hydrogen peroxide system. *The solution should be colourless or could have a slight blue tinge. If the substrate turns into blue, it may have become contaminated and should be thrown away.*

6.7. Stop Solution

The bottle contains 15 ml 0.15 M sulphuric acid solution.

6.8. Controls

The bottles contain 1 ml of a lot-specific control solution. The concentration is indicated on the label. The controls are ready to use.

7. SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

The determination of DHEA-S can be performed in human plasma as well as in serum of patients. Store the sample at -20° C if the determination is not performed on the same day of the sample collection. *Avoid repeated freezing and thawing.*

7.1. Sample Dilution

Immediately before use dilute each sample 1:50 with the diluent (i.e. add 20 µl of sample to 980 µl of diluent). Mix well.

7.2. Precaution

- Avoid the exposure of TMB substrate to direct sunlight, metal or oxidants. Do not freeze the solution.
- Maximum precision is required for dispensation of the reagents.
- This method allows the determination of DHEA-S from 0.1 to 10 µg/ml
- Treatment of the patient with cortisone, natural or synthetic steroids can impair DHEA-S determination.

8. ASSAY PROCEDURE

8.1. Test Preparation

Please read the instructions for use carefully **before** performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the instructions for use as described. Prior to commencing the assay, the distribution and identification plan for all specimens and standards should be carefully established. Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve. Please allocate at least:

1 well	(e.g. A1)	for the substrate blank
2 wells	(e.g. B1+C1)	for standard 0
2 wells	(e.g. D1+E1)	for standard 1
2 wells	(e.g. F1+G1)	for standard 2
2 wells	(e.g. H1+A2)	for standard 3
2 wells	(e.g. B2+C2)	for standard 4
2 wells	(e.g. D2+E2)	for standard 5
2 wells	(e.g. F2+G2)	for control A
2 wells	(e.g. H2+A3)	for control B

It is recommended to determine standards, controls and patient samples in duplicate.

Perform all assay steps in the order given and without any appreciable delays between the steps.

A clean, disposable tip should be used for dispensing each standard and each patient sample.

1. Dispense 30 µl standards, controls and diluted samples into their respective wells.
2. Add 100 µl DHEA-S-HRP Conjugate to each well. Leave well A1 for substrate blank.
3. Cover wells with the foil supplied in the kit.
4. **Incubate for 1 hour at 37° C.**
5. When incubation has been completed, remove the foil, aspirate the content of the wells and wash each well three times with 300 µl of diluted wash solution. Avoid overflows from the reaction wells.

Important note: During each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel.

Automatic washer: In case you use automatic equipment, wash the wells at least 5 times.

Note: Washing is critical! Insufficient washing results in poor precision and falsely elevated absorbance values.

6. Dispense 100 µl TMB Substrate Solution into all wells.
7. **Incubate for exactly 15 min at room temperature (+22 to +28 °C) in the dark.**
8. Dispense 100 µl Stop Solution into all wells in the same order and at the same rate as for the TMB Substrate Solution. Shake the microplate gently.
Any blue colour developed during the incubation turns into yellow.
9. Measure the absorbance of the specimen at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against blank within 5 minutes.

8.2. Measurement

Adjust the ELISA Microwell Plate Reader **to zero** using the **substrate blank in well A1**.

If - due to technical reasons - the ELISA reader cannot be adjusted to zero using the substrate blank in well A1, subtract the absorbance value of well A1 from all other absorbance values measured in order to obtain reliable results!

Measure the absorbance of all wells at **450 nm** and record the absorbance values for each standard and patient sample.

9. RESULTS

9.1. Calculation of Results

Calculate the mean of the absorbencies for each point of the standard curve and of each sample.

Plot the values of absorbance of the standards against concentration.

Draw the best-fit curve through the plotted points (esp. Four Parameter Logistics). Interpolate the values of the samples on the standard curve to obtain the corresponding values of the concentration expressed in µg/ml.

9.2. Reference Values

The serum and plasma DHEA-S reference values are:

	Woman [µg/ml]	Man [µg/ml]
Newborns	0.9 – 1.8	0.9 – 1.8
Before puberty	0.25 – 1.0	0.25 – 1.0
Adults	0.9 – 3.6	0.9 – 3.6
After menopause	< 0.25 – 1.0	--
Pregnancy	0.25 – 1.8	--

Please pay attention to the fact that the determination of a range of expected values for a “normal” population in a given method is dependent on many factors, such as specificity and sensitivity of the method used and type of population under investigation. Therefore, each laboratory should consider the range given by the manufacturer as a general indication and produce their own range of expected values based on the indigenous population where the laboratory works.

10. QUALITY CONTROL

Each laboratory should assay controls at normal, high and low levels range of DHEA-S for monitoring assay performance. These controls should be treated as unknowns and values determined in every test procedure performed. Quality control charts should be maintained to follow the performance of the supplied reagents. Pertinent statistical methods should be employed to ascertain trends. The individual laboratory should set acceptable assay performance limits. Other parameters that should be monitored include the 80, 50 and 20% intercepts of the standard curve for run-to-run reproducibility. In addition, maximum absorbance should be consistent with past experience. Significant deviation from established performance can indicate unnoticed change in experimental conditions or degradation of kit reagents. Fresh reagents should be used to determine the reason for the variations.

11. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1. Precision

Intra Assay Variation

Within run variation was determined by replicate determination (16x) of three different serum samples in one assay. The within assay variability is $\leq 7.9\%$.

Inter Assay Variation

Between run variations was determined by replicate measurements (20x) of three different control sera in different lots. The between assay variability is $\leq 10.4\%$.

11.2. Specificity

The cross reaction of the antibody calculated at 50% according to Abraham:

Cross-reagent	Cross reactivity (%)
DHEA-S	100 %
DHEA	100 %
Androstenedione	59 %
Androsterone	16 %
DHT	1.0 %
Testosterone	0.63 %
Estrone	0.3 %
Progesterone	0.27 %
Pregnenolone	0.18 %
17-OH Progesterone	0.15 %
11-deoxycortisol	0.08 %
Cortisone	0.013 %
Cortisol	< 0.01 %
17 beta- Estradiol	< 0.01 %
Corticosterone	< 0.01 %
17a-Estradiol	< 0.01 %
Cholesterol	< 0.001 %
Estriol	< 0.001 %
Estradiol Sulphate	< 0.001 %
Aldosterone	< 0.001 %
Estradiol-3-Sulphate-17-Glucuronide	< 0.001 %

11.3. Specificity: interfering substances

Interference by Bilirubin, Hemoglobin and Triglycerides has been investigated on the DHEA-S ELISA kit:

Substance	Assayed Conc.	Interference
Bilirubin	0.2 mg/ml	No
Hemoglobin	2 mg/ml	No
Triglycerides	6 mg/ml	No

No interference has been observed with the substances under investigation; following good laboratory practices, it is anyway advised to avoid using highly lipemic or haemolysed samples.

11.4. Specificity: plasma and SST tube

Interference in plasma and SST (serum separation tube) samples has been evaluated. Serum obtained from the same patient has been used as reference.

Sample	Interference
SST (serum separation tube)	No
EDTA plasma	No
Lithium heparin plasma	No
Sodium-heparin plasma	No

No interference has been observed.

11.5. Sensitivity

The lowest detectable concentration of DHEA-S that can be distinguished from standard 0 is 0.04 µg/ml at the 95% confidence limit.

11.6. Accuracy

The recovery of 0.6 - 1.25 - 2.5 and 5 µg/ml of DHEA-S added to sample gave an average value (±SD) of 102.87% ± 8.63 % with reference to the original concentrations.

The dilution test performed on three sera diluted 2 - 4 and 8 times gave an average value (±SD) of 100.15% ± 9.02 %.

11.7. Correlation with RIA

The DHEA-S ELISA was compared to another commercially available DHEA-S assay. 42 serum samples have been analysed.

The linear regression curve was calculated:

$$y = 0.93x + 0.28$$

$$r^2 = 0.961$$

12. PRECAUTIONS AND WARNINGS

- The test procedure, the information, the precautions and warnings in the instructions for use have to be strictly followed. The use of the testkits with analyzers and similar equipment has to be validated. Any change in design, composition and test procedure as well as for any use in combination with other products not approved by the manufacturer is not authorized; the user himself is responsible for such changes. The manufacturer is not liable for false results and incidents for these reasons. The manufacturer is not liable for any results by visual analysis of the patient samples.
- Only for in-vitro diagnostic use by professional persons. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
- All components of human origin used for the production of these reagents have been tested for anti-HIV antibodies, anti-HCV antibodies and HBsAg and have been found to be non-reactive. Nevertheless, all materials should still be regarded and handled as potentially infectious.
- Do not interchange reagents or strips of different production lots.
- No reagents of other manufacturers should be used along with reagents of this test kit.
- Do not use reagents after expiry date stated on the label.
- Use only clean pipette tips, dispensers, and lab ware.
- Do not interchange screw caps of reagent vials to avoid cross-contamination.
- Close reagent vials tightly immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- After first opening and subsequent storage check conjugate and control vials for microbial contamination prior to further use.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense conjugate without splashing accurately to the bottom of wells.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background. To improve the performance of the kit on automatic systems is recommended to increase the number of washes.
- Microbiologically contaminated samples should not be used in the assay. Highly lipemic or haemolysed specimens should also not be used.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.
- Some reagents contain small amounts of Proclin 300® as preservative. Avoid contact with skin or mucosa.
- The TMB Substrate contains an irritant, which may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous and corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.

12.1. Disposal Considerations

Residues of chemicals and preparations are generally considered as hazardous waste. The disposal of this kind of waste is regulated through national and regional laws and regulations. Contact your local authorities or waste management companies which will give advice on how to dispose hazardous waste.

For information about the packaging materials refer to PACKAGING MATERIALS.

13. ORDERING INFORMATION

REF

DNOV005

DHEA-S (96 Determinations)

FRANÇAIS

1. INTRODUCTION

Le sulfate de déshydroépiandrostérone (DHEA-S) est une hormone stéroïde naturelle présente au sommet des reins du corps humain. DHEA-S dérivé de la conversion enzymatique de la DHEA dans les tissus surrénaliens et extradrénaux. La DHEA-S est également produite dans les gonades, le tissu adipeux et le cerveau. C'est l'hormone la plus abondante dans le corps humain et le précurseur de tous les stéroïdes sexuels.

Étant donné que la plus grande quantité de DHEA-S est produite par la zone réticulée de la surrénale, il est expliqué qu'il existe un rôle dans la réponse immunitaire et la réaction au stress. La DHEA-S peut avoir plus de rôles biologiques. Sa production dans le cerveau suggère qu'il joue également un rôle de neurostéroïde.

La mesure de la DHEA-S sérique est un marqueur utile de la synthèse des androgènes surrénaliens. Des taux anormalement bas ont été rapportés dans l'hypoadrénalisme, tandis que des taux élevés se produisent dans plusieurs conditions, par exemple: adénome et carcinome surrénaliens virilisants, déficiences en 21-hydroxylase et en 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase et, dans certains cas, d'hirsutisme chez la femme. Les femmes atteintes du syndrome des ovaires polykystiques ont tendance à avoir des taux de DHEA-S normaux ou légèrement élevés. Étant donné que très peu de DHEA-S est produite par les gonades, la mesure des niveaux de DHEA-S peut aider à localiser la source d'androgènes dans des conditions virilisantes.

La DHEA-S ne montre aucune variation diurne.

2. INDICATION D'UTILISATION

Méthode immunoenzymatique colorimétrique par compétition pour la détermination quantitative de DHEA-S dans le sérum ou le plasma humain.

3. PRINCIPE DU TEST

Les puits des bandes de microtitration sont préalablement recouverts d'anticorps anti-DHEA-S (phase solide). La DHEA-S présente dans l'échantillon entre en compétition avec la DHEA-S (antigène marqué par une enzyme) marquée à la peroxydase de raifort pour la liaison de l'anticorps. Après incubation, une séparation libre-lié est réalisée par lavage de la phase solide. Le complexe immun formé par l'antigène marqué par une enzyme est visualisé en ajoutant un substrat de tétraméthylbenzidine (TMB) qui donne un produit de réaction bleu. L'intensité de ce produit est inversement proportionnelle à la quantité de DHEA-S dans l'échantillon. De l'acide sulfurique est ajouté pour arrêter la réaction. Cela produit une couleur jaune du point final. L'absorption à 450 nm est lue à l'aide d'un lecteur de plaques à micropuits ELISA.

4. MATERIEL

4.1. Réactifs fournis

- **Puits recouverts d'Anti DHEA-S:** 12 bandes sécables à 8 puits sécables revêtues d'anticorps anti-DHEA-S; en feuille d'aluminium refermable.
- **Solution d'arrêt:** 1 flacon contenant 15 ml d'acide sulfurique, 0.15 mol/l (éviter tout contact avec la peau).
- **Conjugué DHEA-S-HRP :** 1 flacon contenant 12 ml de DHEA-S marqué à la peroxydase de raifort.
- **Solution de TMB :** 1 flacon contenant 15 ml de 3, 3', 5, 5'-Tétraméthylbenzidine (H₂O₂-TMB 0.26g/l) (éviter tout contact avec la peau).
- **Diluant:** 1 flacon contenant 100 ml de HEPES 187 mM pH 7,5; BSA 0,5 g / l.
- **Contrôle A:** 1 flacon contenant 1 ml d'un lot spécifique solution de contrôle. La concentration est indiquée sur l'étiquette.
- **Contrôle B:** 1 flacon contenant 1 ml d'un lot spécifique solution de contrôle. La concentration est indiquée sur l'étiquette.
- **Tampon de lavage (concentré x 10):** 1 flacon contenant 50 ml d'une solution concentrée à 10 fois 0,2 M, pH 7,4.
- **Étalons de DHEA-S :** 6 flacons, 1 ml chaque :
 - Étalon 0: 0 μ g/ml
 - Étalon 1: 0,1 μ g/ml
 - Étalon 2: 0,4 μ g/ml
 - Étalon 3: 1,0 μ g/ml
 - Étalon 4: 4,0 μ g/ml
 - Étalon 5: 10,0 μ g/ml

4.2. Matériel fourni

- 1 couvercle autocollante
- 1 notice d'utilisation

4.3. Matériel et équipement requis

- Lecteur de microplaques ELISA, pour mesure l'absorbance à 450 nm, 620-630 nm
- Equipement manuel ou automatique pour le rinçage des puits
- Pipettes permettant de délivrer un volume de 10 à 1000 µl
- Vortex
- Eau distillée
- Tubes jetables
- Chronomètre

5. STABILITE ET CONSERVATION

Les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette s'ils sont conservés entre +2...+8 °C à l'obscurité.

6. PREPARATION DES REACTIFS

Il est très important que tous les réactifs, échantillons et contrôles soient portés à température ambiante (+22°C...+28 °C) pour au moins 30 minutes. À la fin de l'essai conservent les réactifs immédiatement à +2...+8 °C; évitez la longue exposition à température ambiante.

6.1. Bandes détachables enduites

Les bandes détachables sont enduites d'anticorps d'IgG anti-DHEA-S et sont prêtes à l'emploi. Conserver entre +2...+8 °C. N'ouvrir l'emballage que si la pièce est à température ambiante. *Après avoir prélevé les bandes nécessaires, refermer immédiatement les autres dans le sachet d'aluminium avec le déshydratant fourni et les conserver entre +2...+8 °C; elles sont stables jusqu'à la date de péremption.*

6.2. Conjugué DHEA-S -HRP

Solution de conjugué DHEA-S-HRP prête à l'emploi.

6.3. Diluant

Le diluant est prête à l'emploi.

6.4. Solution de lavage

Diluer le contenu de la solution de lavage concentrée avec de l'eau distillée jusqu'à un volume final de 500 ml avant utilisation. Pour les petits volumes respecter la dilution au 10^{ème}. La solution de lavage diluée est stable pendant 30 jours entre 2 °C et 8 °C. Il est possible d'observer la présence de cristaux dans la solution de lavage concentrée, dans ce cas, mélanger à température ambiante jusqu'à la dissolution complète des cristaux, pour une meilleure efficacité diluer tout le flacon de solution de lavage jusqu'à 500 ml en surveillant le transfert de cristaux avec le lavage de la bouteille, puis mélanger jusqu'à la dissolution complète des cristaux.

6.5. Étalons de DHEA-S

Les standards sont prêts à l'emploi et sont stables jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette. Les étalons ouverts sont stables pendant encore 6 mois s'ils sont conservés à +2...+8 °C.

6.6. Solution TMB

Le flacon contient 15 ml d'un mélange de peroxyde d'hydrogène et de tétraméthylbenzidine. *La solution doit être incolore ou avoir une légère color bleue. Si le substrat devient bleu, il a pu être contaminé et doit être jeté.*

6.7. Solution d'arrêt

Le flacon contient 15 ml d'une solution d'acide sulfurique 0.15 mol/l.

6.8. Contrôles

Le flacon contient 1 ml d'un lot spécifique solution de contrôle. La concentration est indiquée sur l'étiquette. Les commandes sont prêtes à l'emploi.

7. PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

La détermination de DHEA-S peut être effectuée sur du plasma ou du sérum humain du Patient. Conserver les échantillons à -20°C si la détermination n'est pas effectuée le même jour du prélèvement de l'échantillon. *Évitez les cycles répétés de congélation et de décongélation.*

7.1. Dilution de l'échantillon

Immédiatement avant utilisation, diluer chaque échantillon à 1:50 avec le diluant (c'est-à-dire ajouter 20 µl d'échantillon à 980 µl de diluant). Bien mélanger.

7.2. Précaution

- Évitez l'exposition du substrat TMB à la lumière directe du soleil, aux métaux ou aux oxydants. Ne pas congeler la solution.
- Une précision maximale est requise pour la distribution des réactifs.
- Cette méthode permet de déterminer la DHEA-S de 0,1 à 10 µg / ml
- Le traitement du patient avec de la cortisone, des stéroïdes naturels ou synthétiques peut altérer la détermination de la DHEA-S.

8. PROCEDE DE TEST

8.1. Préparation du dosage

Lire attentivement la notice d'emploi **avant de** réaliser le dosage. La fiabilité des résultats dépend du suivi strict du protocole. Avant de commencer le dosage, déterminer le plan de distribution et d'identification des échantillons et des étalons. Sélectionner le nombre de bandes ou de puits nécessaires et les placer sur le support. Le pipetage des échantillons ne doit pas dépasser 10 minutes pour éviter toute dérive. Si vous utilisez plus d'une plaque, il est recommandé de répéter la courbe de réponse à la dose. S'il vous plaît allouer au moins:

1 puits	(ex. A1)	Pour le blanc
2 puits	(ex. B1+C1)	Pour l'étalon 0
2 puits	(ex. D1+E1)	Pour l'étalon 1
2 puits	(ex. F1+G1)	Pour l'étalon 2
2 puits	(ex. H1+A2)	Pour l'étalon 3
2 puits	(ex. B2+C2)	Pour l'étalon 4
2 puits	(ex. D2+E2)	Pour l'étalon 5
2 puits	(ex. F2+G2)	Pour le contrôle A
2 puits	(ex. H2+A3)	Pour le contrôle B

Il est recommandé de déterminer les étalons, contrôles et les échantillons du patient en doublets.

Réaliser toutes les étapes du dosage dans l'ordre donné et sans interruption entre les étapes.

Un cône de pipette propre et jetable doit être utilisé pour distribuer chaque contrôle et échantillon.

1. Pipeter 30 µl des étalons, de contrôle et d'échantillons dilué dans leurs puits respectifs.
2. Ajouter 100 µl de conjugué DHEA-S -HRP dans chaque puits. Garder le puits A1 pour le blanc.
3. Couvrir les puits avec le couvercle fourni dans le kit.
4. **Incuber pendant 1 heure à 37 °C.**
5. À la fin de l'incubation, enlever le couvercle, aspirer le contenu des puits et laver chaque puits trois fois avec 300 µl de solution de lavage diluée. Eviter les débordements de puits de réaction.

Note importante: Pendant chaque, agitez doucement la plaque pendant 5 secondes et enlevez la solution d'excès en tapant la plaque inversée sur un essuie-mains en papier absorbant.

Note : L'étape de lavage est très importante ! Un lavage insuffisant peut conduire à une précision faible et des valeurs d'absorbance faussement élevées.

6. Pipeter 100 µl de solution de TMB dans tous les puits.
7. **Incuber pendant exactement 15 min à température ambiante (+22...+28 °C) à l'obscurité.**
8. Pipeter 100 µl de solution d'arrêt dans tous les puits dans le même ordre à la même vitesse que pour la solution de TMB. Secouer doucement la microplaque.
La couleur bleue développée pendant l'incubation vire au jaune.
9. Mesurer l'absorbance des échantillons à 450 nm contre une longueur d'onde de référence de 620-630 nm ou contre le blanc au cours de 5 minutes.

8.2. Mesure

Faire le **zéro** du lecteur ELISA à l'aide du blanc dans le puits A1.

Si - pour des raisons techniques - le lecteur d'ELISA ne peut pas être ajusté à zéro en utilisant le blanc dans le puits A1, soustraire la valeur d'absorbance du puits A1 de toutes les autres valeurs d'absorbance mesurées afin d'obtenir des résultats fiables !

Mesurer l'absorbance de tous les puits à 450 nm et enregistrer les valeurs d'absorbance pour chaque contrôle et échantillon de patient.

Calculer **les valeurs moyennes d'absorbance pour tous les doublets, si nécessaires.**

9. RESULTATS

9.1. Calcul des résultats

Calculer la moyenne des absorbances pour chaque point de la courbe d'étalonnage et de chaque échantillon.

Tracer les valeurs d'absorbance des étalons en rapport à la concentration.

Tracez la courbe d'ajustement optimale à travers les points tracés (notamment la logistique à quatre paramètres). Interpoler les valeurs des échantillons sur la courbe étalon pour obtenir les valeurs correspondantes de la concentration exprimée en µg/ml.

9.2. Valeurs de Référence

Les valeurs de référence du plasma ou du sérum de DHEA-S sont:

	Femme [$\mu\text{g/ml}$]	Homme [$\mu\text{g/ml}$]
Nouveau-nés	0,9 – 1,8	0,9 – 1,8
Avant la puberté	0,25 – 1,0	0,25 – 1,0
Adultes	0,9 – 3,6	0,9 – 3,6
Après la ménopause	< 0,25 – 1,0	--
Grossesse	0,25 – 1,8	--

Veillez tenir compte du fait que la détermination d'une fourchette de valeurs attendues pour une population "normale" dans une méthode donnée dépend de nombreux facteurs, tels que la spécificité et la sensibilité de la méthode utilisée et le type de population sous étude. Par conséquent, chaque laboratoire devrait considérer la plage donnée par le fabricant comme une indication générale et produire sa propre plage de valeurs attendues sur la base de la population autochtone dans laquelle le laboratoire travaille.

10. CONTROLE QUALITE

Chaque laboratoire doit faire des contrôles de dosage à des niveaux de gammes normales, élevées et faibles de DHEA-S pour surveiller la performance des dosages. Ces contrôles doivent être considérés comme inconnus et les valeurs doivent être déterminées dans chaque test effectué. Les chartes de contrôles qualité doivent être maintenues pour suivre les performances des réactifs fournis. Des méthodes de statistiques pertinentes doivent être employées pour établir des tendances. Le laboratoire individuel doit établir des limites de performance de dosage acceptables. D'autres paramètres devant être surveillés impliquent les intersections à 80, 50 et 20% de la courbe étalon pour la reproductibilité. De plus, l'absorbance maximale doit être dans la même ligne que les expériences passées. Les déviations significatives provenant des performances établies peuvent indiquer un changement non remarquable dans les conditions expérimentales ou dans la dégradation des réactifs du kit. Les réactifs frais doivent être utilisés pour déterminer la raison des variations.

11. PERFORMANCES DU TEST

11.1. Précision

Variation Intra Dosage

La variation intra dosage a été déterminée par un répliquant (16x) sur trois sérums différents dans un dosage. La variation intra dosage est $\leq 7,9\%$.

Variation Inter Dosage

La variation inter dosage a été déterminée en répliquant la mesure (20x) de trois sérums de contrôle différents en lots différents. La variation inter dosage est $\leq 10,4\%$.

11.2. Spécificité analytique

La réaction croisée des anticorps calculée à 50% selon Abraham :

Réactif croisés	Réaction croisée
DHEA-S	100 %
DHEA	100 %
Androstenedione	59 %
Androsterone	16 %
DHT	1,0 %
Testosterone	0,63 %
Estrone	0,3 %
Progesterone	0,27 %
Pregnenolone	0,18 %
17-OH Progesterone	0,15 %
11-deoxycortisol	0,08 %
Cortisone	0,013 %
Cortisol	< 0,01 %
17 beta- Estradiol	< 0,01 %
Corticosterone	< 0,01 %
17a-Estradiol	< 0,01 %
Cholesterol	< 0,001 %
Estriol	< 0,001 %
Estradiol Sulphate	< 0,001 %
Aldosterone	< 0,001 %
Estradiol-3-Sulphate-17-Glucuronide	< 0,001 %

11.3. Spécificité: Substances interférentes

Les interférences par la bilirubine, l'hémoglobine et les triglycérides ont été étudiées dans le kit DHEA-S ELISA:

Substance	Concentration testée	Interférence
Bilirubine	0,2 mg/ml	Non
Hémoglobine	2 mg/ml	Non
Triglycérides	6 mg/ml	Non

Aucune interférence n'a été observée avec les substances à l'étude ; suite à de bonnes pratiques de laboratoire, il est de toute façon conseillé d'éviter d'utiliser des échantillons hautement lipidiques ou hémolysés.

11.4. Spécificité: Plasma et tube SST

Interférence dans les échantillons de plasma et SST (tube de séparation du sérum) a été évaluée. Le sérum obtenu à partir du même patient a été utilisé comme référence.

Échantillon	Interférence
SST (tube de séparation du sérum)	Non
EDTA plasma	Non
Plasma d'héparine de lithium	Non
Plasma de sodium-héparine	Non

Aucune interférence n'a été observée.

11.5. Sensibilité

La plus petite concentration détectable de DHEA-S que l'on peut distinguer de l'étalon 0 est de 0,04 µg/ml à la limite de confiance de 95%.

11.6. Exactitude

La récupération de 0,6 - 1,25 - 2,5 et 5 µg/ml de DHEA-S ajouté à l'échantillon a donné une valeur moyenne (±SD) de 102,87% ± 8,63 % par rapport aux concentrations initiales.

La dilution de le dosage effectué sur trois sérums dilués 2 à 4 et 8 fois a donné une valeur moyenne (±SD) de 100,15 % ± 9,02 %.

11.7. Corrélation avec l'AIR

Le test DHEA-S ELISA a été comparé à un autre test DHEA-S disponible sur le marché. 42 échantillons de sérum ont été analysés.

La courbe de régression linéaire a été calculée :

$$y = 0,93x + 0,28$$

$$r^2 = 0.961$$

12. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

- La procédure de dosage, l'information, les précautions et mises en garde du mode d'emploi doivent être suivies de façon stricte. L'utilisation de ces kits avec des automates ou dispositifs similaires doit être validée. Aucun changement de la conception, composition et procédure de dosage, ainsi que l'utilisation avec d'autres produits non approuvés par le fabricant, ne sont autorisés ; seul l'utilisateur est responsable de tels changements. Le fabricant n'est pas responsable des faux résultats et des incidents dus à ces modifications. Le fabricant n'est pas responsable des résultats fournis par analyse visuelle des échantillons des patients.
- Uniquement pour diagnostic in vitro. Ne pas utiliser pour usage interne ou externe chez les Humains ou les Animaux.
- Suivre les Bonnes Pratiques de Laboratoires (BPL) pour la manipulation de produits sanguins.
- Tous les composants d'origine humaine utilisés pour la fabrication de ces réactifs ont été analysés et ont été testés non réactifs aux antigènes HBs, en anticorps anti-VIH et en anticorps anti-VHC. Néanmoins, tous les produits doivent être considérés et traités comme étant potentiellement infectieux.
- Ne pas échanger les réactifs ou les bandes provenant de différents lots de production.
- Ne pas utiliser de réactifs provenant d'autres fabricants avec les réactifs de ce kit.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
- Utiliser seulement des cônes de pipette, des distributeurs et du matériel de laboratoire propres.
- Ne pas échanger les bouchons des flacons, pour éviter la contamination croisée
- Fermer les flacons de réactifs immédiatement après l'utilisation pour éviter l'évaporation et la contamination microbienne.
- Après la première ouverture et après la conservation, vérifiez si le conjugué et les flacons sont contaminés par une contamination microbienne avant de les utiliser
- Pour éviter la contamination croisée et des résultats faussement élevés, introduire les échantillons de patients et le conjugué exactement au fond des puits en évitant les éclaboussures.
- Tenez compte des directives pour effectuer un contrôle de qualité dans les laboratoires cliniques en testant des contrôles et / ou des sérums.
- Il est important que le temps de réaction dans chaque puits soit maintenu constant pour des résultats reproductibles. Le pipetage des échantillons ne doit pas dépasser 10 minutes pour éviter toute dérive. Si plus de 10 minutes sont nécessaires, suivez le même ordre de dispense. Si vous utilisez plus d'une plaque, il est recommandé de répéter la courbe de réponse à la dose dans chaque plaque.

- L'élimination incomplète ou imprécise du liquide des puits pourrait influencer la précision du test et / ou augmenter l'arrière-plan. Pour améliorer les performances du kit sur les systèmes automatiques, il est recommandé d'augmenter le nombre de lavages.
- Les échantillons contaminés microbiologiquement ne doivent pas être utilisés dans le test. Les échantillons très lipémiques ou hémolysés ne doivent pas non plus être utilisés.
- Les lecteurs de plaques mesurent verticalement. Ne touchez pas le fond des puits.
- Certains réactifs contiennent de petites quantités de Proclin 300® comme agent de conservation. Eviter le contact avec la peau ou les muqueuses.
- Le substrat TMB contient un irritant qui peut être nocif s'il est inhalé, ingéré ou absorbé par la peau. Pour prévenir les blessures, éviter l'inhalation, l'ingestion ou le contact avec la peau et les yeux.
- La solution d'arrêt consiste en une solution diluée d'acide sulfurique. L'acide sulfurique est toxique et corrosif et peut être toxique s'il est ingéré. Pour prévenir les brûlures chimiques, éviter le contact avec la peau et les yeux.
- L'addition de la solution de substrat TMB déclenche une réaction cinétique, qui se termine par l'addition de la solution d'arrêt. Par conséquent, le substrat TMB et la solution d'arrêt doivent être ajoutés dans le même ordre pour éliminer tout écart de temps pendant la réaction.

12.1. Élimination des déchets

Les résidus des produits chimiques et des préparations sont considérés en général comme des déchets dangereux. L'élimination de ce type de déchet est réglementée par des lois et réglementations nationales et régionales. Contacter les autorités compétentes ou les sociétés de gestion des déchets pour obtenir des renseignements sur l'élimination des déchets dangereux.

Pour plus d'informations sur les matériaux d'emballage, reportez-vous à la section MATÉRIELS D'EMBALLAGE.

13. INFORMATION POUR LES COMMANDES

REF	DNOV005	DHEA-S	(96 déterminations)
------------	---------	--------	---------------------

ESPAÑOL

1. INTRODUCCIÓN

Sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEA-S), es una hormona esteroidea natural encontrado encima de los riñones en el cuerpo humano. DHEA-S derivada de la conversión enzimática de la DHEA en los tejidos adrenales y extradrenal. DHEA-S también se produce en las gónadas, tejido adiposo y el cerebro. Es la hormona más abundante en el cuerpo humano y es precursor de todos los esteroides sexuales.

Como la mayoría de la DHEA-S se produce por la zona reticular de la suprarrenal, se argumenta que hay un papel en la respuesta inmune y el estrés. DHEA-S puede tener un más roles biológicos. Su producción en el cerebro sugiere que también tiene un papel como neuroesteroides.

Medición de DHEA-S en suero es un marcador útil de la síntesis de andrógenos adrenales. Niveles anormalmente bajos se han reportado en hipoadrenalismo, mientras que los niveles elevados se presentan en una serie de condiciones, por ejemplo, adenoma suprarrenal virilizante y carcinoma, deficiencias de 21-hidroxilasa y 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa y en algunos casos de hirsutismo femenino.

Las mujeres con síndrome de ovarios poliquísticos tienden a presentar niveles normales o ligeramente elevados de DHEA-S. Como muy poca DHEA-S es producida por las gónadas, la medición de los niveles de DHEA-S pueden ayudar en la localización de la fuente de andrógenos en condiciones virilizantes.

DHEA-S no muestra variación diurna.

2. USO PREVISTO

Método inmunoenzimático competitivo y colorimétrico para la determinación cuantitativa de DHEA-S en suero o plasma (EDTA) humano.

3. PRINCIPIO DEL ENSAYO

Los pozos de microtitulación de las tiras se encuentran recubiertos con anticuerpos anti -DHEA-S (fase sólida). La DHEA-S de la muestra compite por la unión a éstos anticuerpos con DHEA-S marcada con peroxidasa de rábano picante. Una vez finalizada la incubación, se lleva a cabo una separación del complejo unido/libre mediante el lavado de la fase sólida. El complejo inmune formado por el antígeno marcado con enzima se visualiza mediante la adición de Tetrametilbencidina (TMB), la cual produce un producto de reacción azul. La intensidad de este producto es **inversamente** proporcional a la cantidad de DHEA-S presente en la muestra. El ácido sulfúrico se agrega para detener la reacción. Esto produce un color amarillo de punto final. La absorción a 450 nm se lee con un lector de microplacas de ELISA.

4. MATERIALES

4.1. Reactivos suministrados

- **Pozos recubiertos con anticuerpos anti-DHEA-S:** 12 tiras de 8 pozos separables. Los pozos están recubiertas con anticuerpos anti- DHEA-S y vienen empacados en una bolsa de papel de aluminio resellable.
- **Solución de parada:** 1 vial que contiene 15 ml de ácido sulfúrico 0,15 mol/l (evitar cualquier contacto con la piel).
- **Conjugado DHEA-S-HRP:** 1 vial que contiene 12 ml DHEA-S marcada con peroxidasa de rábano.
- **Solución de sustrato TMB:** 1 vial que contiene 15 ml de 3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina (H₂O₂-TMB 0,26 g/l) (evitar cualquier contacto con la piel).
- **Diluyente:** 1 vial contiene 100 ml HEPES mM pH 7.5; BSA 0.5 g/l.
- **Control A:** 1 vial contiene 1 ml de un lote específico de solución de control. La concentración se indica en la etiqueta de la botella.
- **Control B:** 1 vial contiene 1 ml de un lote específico de solución de control. La concentración se indica en la etiqueta de la botella.
- **Solución de lavado concentrada 10x:** 1 vial contiene 50 ml de una solución concentrada 10 x de tampón fosfato 0,2 M, ph 7.4.
- **Estándares de DHEA-S:** 6 viales, 1 ml cada uno.
 - Estándar 0: 0 μ g /ml
 - Estándar 1: 0.1 μ g /ml
 - Estándar 2: 0.4 μ g /ml
 - Estándar 3: 1.0 μ g /ml
 - Estándar 4: 4.0 μ g /ml
 - Estándar 5: 10.0 μ g /ml

4.2. Materiales suministrados

- 1 lámina autoadhesiva
- 1 instrucciones de uso

4.3. Materiales y equipos necesarios

- Lector de de ELISA equipado para medir absorbancia a 450 nm, 620-630 nm
- Equipo manual o automático para el lavado de los pozos
- Pipetas para proporcionar volúmenes entre 10 y 1000 µl
- Mezclador de tubos Vórtex
- Agua destilada
- Tubos desechables
- Temporizador

5. ESTABILIDAD Y ALMACENAMIENTO

Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta cuando se almacenan a 2...8° C en oscuridad.

6. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

¡Es muy importante que tenga todos los reactivos, muestras y patrones a temperatura ambiente (22...28° C) durante al menos 30 minutos antes de iniciar la ejecución de la prueba! ¡Al final del ensayo inmediatamente poner todos los reactivos a 2 – 8° C para evitar largos periodos a temperatura ambiente !

6.1. Tiras recubiertas rompibles

Las tiras vienen listas para ser usadas y se rompen para separar los pozos. Están recubiertas con anticuerpos IgG anti- DHEA-S. Se deben conservar a una temperatura de entre 2...8° C. Abra la bolsa sólo cuando ésta se encuentre a temperatura ambiente. *Inmediatamente después de retirar las tiras que va a utilizar, asegúrese de guardar las tiras que no van a ser usados dentro de la bolsa de aluminio resellable junto con el desecante suministrado y almacenarla a una temperatura entre 2...8° C; las tiras son estables hasta la fecha de caducidad.*

6.2. Conjugado DHEA-S-HRP

DHEA-S-HRP está listo para su uso.

6.3. Diluyente

El diluyente está listo para su uso.

6.4. Solución de lavado

Antes del uso diluir el contenido del frasco de la "Solución de lavado conc. 10X" con agua destilada hasta un volumen de 500 ml. Para preparar volúmenes menores, respetar la relación de dilución de 1:10. La solución de lavado diluida se mantiene estable a 2÷8° C durante al menos 30 días. En la solución de lavado concentrada es posible observar la presencia de cristales. En ese caso, agitar a temperatura ambiente hasta que los cristales se disuelvan por completo. Para una mayor precisión, diluir todo el frasco de la solución de lavado concentrada en 500 ml teniendo cuidado para transferir también los cristales y, a continuación, agitar hasta que se disuelvan por completo.

6.5. Estándares

Los estándares están listos para su uso y son estables hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. *Después de abiertas las soluciones estándar son estables por 6 meses de 2 ... 8° C.*

6.6. Solución de sustrato TMB

El frasco contiene 15 ml de un sistema de tetrametilbencidina/peróxido de hidrógeno. *La solución debe estar incolora o puede tener un ligero tinte azul. Si el sustrato se torna azul, esto indica que puede haberse contaminado y por lo tanto debe desecharse.*

6.7. Solución de parada

El frasco contiene 15 ml de solución de ácido sulfúrico 0,15 M.

6.8. Controles

Las botellas contienen 1 ml de una solución de control específica para el lote. La concentración se indica en la etiqueta. Listo para usar.

7. RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

La determinación de DHEA-S puede realizarse tanto en plasma humano como en suero de pacientes. Almacene la muestra a -20°C si la determinación no se realiza el mismo día de la toma de la muestra. *Evite congelar y descongelar repetidamente.*

7.1. Diluyente de muestra

Inmediatamente antes de su uso diluya cada muestra 1:50 con el diluyente (i.e. añada 20 µl de muestra a 980 µl de diluyente). Mezclar bien.

7.2. Precauciones

- Evitar la exposición del sustrato TMB a la luz solar directa, metal u oxidantes. Non congelar la solución.
- La máxima precisión es necesaria al momento de dispensar los reactivos
- Este método permite la determinación de la DHEA-S a partir de 0.1 to 10 µg/ml.
- El tratamiento del paciente con cortisona, esteroides naturales o sintéticos pueden afectar la determinación de DHEA-S.

8. PROCEDIMIENTO

8.1. Preparación para la prueba

Por favor, lea detenidamente el protocolo de la prueba **antes** de realizar el ensayo. La confiabilidad de los resultados depende del seguimiento estricto del protocolo de la prueba tal cual se describe en el inserto. Antes de comenzar, especifique exactamente la repartición y posición de las muestras y de los estándares/controles. Seleccione el número necesario de tiras de microtitulación o pozos e insértelos en el soporte. El pipeteo de muestras no debe tomar más de diez minutos para evitar la deriva del análisis. Si utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva dosis-respuesta. Por favor, destinar al menos:

1 pozo (por ejemplo, A1)	para el sustrato blanco
2 pozos (por ejemplo, B1+C1)	para el estándar 0
2 pozos (por ejemplo, D1+E1)	para el estándar 1
2 pozos (por ejemplo, F1+G1)	para el estándar 2
2 pozos (por ejemplo, H1+A2)	para el estándar 3
2 pozos (por ejemplo, B2+C2)	para el estándar 4
2 pozos (por ejemplo, D2+E2)	para el estándar 5
2 pozos (por ejemplo, F2+G2)	para el control A
2 pozos (por ejemplo, H2+A3)	para el control B

Se recomienda determinar los estándares, controles y muestras de pacientes por duplicado.

Realice todos los pasos del ensayo en el orden indicado y sin retrasos apreciables entre los pasos.

Debe usar una punta desechable limpia para la dosificación de cada estándar y cada muestra.

1. Agregue 30 µl de estándares, controles y muestras en sus respectivos pozos.
2. Agregue 100 µl de conjugado DHEA-S-HRP a cada pozo. Deje el pozo A1 libre para el blanco del sustrato.
3. Mezclar la microplaca suavemente de 20 a 30 segundos, para mezclar cubrir los pozos con la lámina autoadhesiva suministrado en el kit.
4. **Incube durante 1 hora a 37° C).**
5. Cuando se complete el tiempo de incubación, retire la lámina autoadhesiva, aspire el contenido de los pozos y lave cada pozo tres veces con 300 µl de solución de lavado diluida. Evite desbordamientos entre los pozos de reacción.

Nota importante: Agite suavemente la placa durante 5 segundos en cada paso del lavado. Después del último lavado asegúrese haber eliminado completamente la solución de lavado de los pozos, invierta la placa y golpéela repetidas veces contra una servilleta de papel absorbente.

Lavados automático: Si está utilizando una lavadora automática, hacer 5 lavados.

Nota: ¡El lavado es crítico! Un lavado insuficiente resulta en una mala precisión y valores de absorbancia falsamente elevados.

6. Agregue 100 µl de solución de sustrato TMB en todos los pozos.
7. **Incube durante exactamente 15 minutos a temperatura ambiente (22...28° C) en oscuridad.**
8. Agregue 100 µl de solución de parada en todos los pozos en el mismo orden y a la misma velocidad que agregó la solución de sustrato TMB. Agite la microplaca suavemente.
Cualquier color azul desarrollado durante la incubación se convertirá en amarillo.
9. Mida la absorbancia de la muestra a 450 nm frente una segunda lectura de referencia a 620-630 nm o frente al blanco entre 5 minutos.

8.2. Lectura

Ajuste el lector de placas de micropozos de ELISA a **cero** usando el **sustrato blanco en el pozo A1**.

¡Si - por razones técnicas - el lector de ELISA no se puede ajustar a cero con el blanco del sustrato en el pozo A1, restar el valor de absorbancia del pocillo A1 de todos los valores de absorbancia otras medidas con el fin de obtener resultados fiables!

Mida la absorbancia de todos los pozos a **450 nm** y registre los valores de absorbancia para cada estándar y muestra.

9. RESULTADOS

9.1. Cálculo de resultados

Calcule la absorbancia media para cada punto de la curva estándar y cada muestra. Grafique el valor medio de absorbancia de los estándares versus la concentración. Dibuje la curva que mejor se ajuste a los puntos trazados (Ej.: Logística de cuatro parámetros). Interpolar los valores de las muestras en la curva estándar para obtener los valores correspondientes para las concentraciones expresadas en µg /ml.

9.2. Valores de referencia

Los valores de referencia para suero y plasma de DHEA-S son:

	Mujeres [$\mu\text{g/ml}$]	Hombres [$\mu\text{g/ml}$]
Recién nacidos	0.9 – 1.8	0.9 – 1.8
Antes de la pubertad	0.25 – 1.0	0.25 – 1.0
Adultos	0.9 – 3.6	0.9 – 3.6
Después de la pubertad	< 0.25 – 1.0	--
Embarazo	0.25 – 1.8	--

Es importante señalar que la determinación de un rango de valores esperados en un método dado para una población "normal" depende de muchos factores, tales como la especificidad y sensibilidad del método en uso, y la población en estudio. Por lo tanto, cada laboratorio debe considerar el intervalo especificado por el fabricante como una guía general y producir su propio rango de valores calculados en base al estadístico obtenido por el laboratorio, donde reside la población local.

10. CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe evaluar sus controles que correspondan a niveles normal, alto y bajo del DHEA-S para supervisar el desempeño del ensayo. Estos controles deben ser tratados como muestras desconocidas y se deben determinar sus valores cada vez que se realice el ensayo. Se deben llevar gráficas de éstos controles de calidad para hacerle seguimiento al desempeño de los reactivos. Se deben emplear los métodos estadísticos pertinentes para verificar las tendencias. Cada laboratorio debe establecer los límites aceptables de desempeño para el ensayo. Otros parámetros que se deben controlar son los interceptos al 80, 50 y 20% de la curva estándar para evaluar la reproducibilidad intercorrida. Además, la absorción máxima debe ser consistente con la experiencia del laboratorio. Una desviación significativa del desempeño establecido puede indicar un cambio en las condiciones experimentales o la degradación de los reactivos. Deben usarse reactivos frescos para determinar la razón de las variaciones.

11. CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE DESEMPEÑO

11.1. Precisión

Variación intraensayo

La variación intracorrida fue determinada por mediciones repetidas (16x) de tres muestras de suero diferentes en un mismo ensayo. La variación intracorrida del ensayo es $\leq 7.9\%$.

Variación interensayo

La variación intercorrida fue determinada por mediciones repetidas (20x) de tres sueros control diferentes con lotes distintos. La variabilidad interensayo es $\leq 10.4\%$.

11.2. Especificidad

La reacción cruzada del anticuerpo calcula en el 50% de acuerdo con Abraham es la siguiente:

Reactivo cruzado	Reacción cruzada (%)
DHEA-S	100 %
DHEA	100 %
Androstenedione	59 %
Androsterone	16 %
DHT	1,0 %
Testosterone	0,63 %
Estrone	0,3 %
Progesterone	0,27 %
Pregnenolone	0,18 %
17-OH Progesterone	0,15 %
11-deoxycortisol	0,08 %
Cortisone	0,013 %
Cortisol	< 0,01 %
17 beta- Estradiol	< 0,01 %
Corticosterone	< 0,01 %
17a-Estradiol	< 0,01 %
Cholesterol	< 0,001 %
Estriol	< 0,001 %
Estradiol Sulphate	< 0,001 %
Aldosterone	< 0,001 %
Estradiol-3-Sulphate-17-Glucuronide	< 0,001 %

11.3. Especificidad: sustancias interferentes

La interferencia por bilirrubina, hemoglobina y triglicéridos se ha investigado en el kit DHEA-S ELISA:

Substancia	Conc. Ensayada.	Interferencia
Bilirrubina	0,2 mg/ml	No
Hemoglobina	2 mg/ml	No
Triglicéridos	6 mg/ml	No

No se han observado interferencias con las sustancias investigadas; Siguiendo buenas prácticas de laboratorio, se aconseja evitar el uso de muestras altamente lipémicas o hemolizadas.

11.4. Especificidad: plasma y tubo SST

Se ha evaluado la interferencia en muestras de plasma y SST (tubo de separación de suero). El suero obtenido del mismo paciente se ha utilizado como referencia.

Muestra	Interferencia
SST (tubo de separación de suero)	No
EDTA plasma	No
Plasma de heparina de litio	No
Plasma de sodio y heparina	No

No se han observado interferencias.

11.5. Sensibilidad

La concentración detectable más baja de DHEA-S que se puede distinguir del estándar 0 es 0.04 µg/ml con un límite de confianza del 95 %.

11.6. Exactitud

La recuperación de 0.6 – 1.25 – 2.5 and 5 µg/ml de DHEA-S añadido a la muestra dio un valor medio (±DE) de 102.87 % ± 8.63 % con respecto a las concentraciones original.

La prueba de dilución efectuada en tres sueros diluidos 2 - 4 - 8 veces le dio un valor medio (±DE) de 100.15 % ±9.02 %.

11.7. Correlación con RIA

El ensayo DHEA-S ELISA fue comparado con otro ensayo de DHEA-S disponible comercialmente. Se han analizado 42 muestras de suero.

Se calculó la curva de regresión lineal

$$y = 0.93x + 0.28$$

$$r^2 = 0.961$$

12. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

- El procedimiento, la información, las precauciones y los avisos de las instrucciones de uso han de ser seguidas estrictamente. El uso de los kits con analizadores y equipos similares debe ser validado. No está autorizado realizar ningún cambio en el diseño, composición y procedimiento del ensayo, así como ningún uso en combinación con otros productos no aprobados por el fabricante; el usuario es responsable de tales cambios. El fabricante no se hace responsable por resultados falsos o por cualquier incidente causado por esta razón. El fabricante no se responsabiliza por los resultados obtenidos mediante el análisis visual de las muestras de los pacientes.
- Sólo para uso en diagnóstico in vitro y por la personal experto. No es para uso interno o externo en humanos o animales.
- Siga las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) en el manejo de las muestras sanguíneas y sus derivados.
- Todos los componentes de origen humano utilizados para la producción de estos reactivos han sido examinado para determinar la presencia de anticuerpos anti-VIH, anticuerpos anti-HCV y anticuerpos anti-HBsAg y se ha determinado que no son reactivos. Sin embargo, todo el material debe ser considerado y tratado como potencialmente infeccioso.
- No intercambiar reactivos o tiras de diferentes lotes de producción.
- No se deben utilizar reactivos de otros fabricantes en combinación con los reactivos de este kit.
- No utilizar los reactivos después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- Use sólo puntas para micropipeta, dispensadores y material de laboratorio limpio.
- No intercambie las tapas de los viales. Esto evita la contaminación cruzada.
- Cierre los viales de los reactivos con fuerza inmediatamente después de usarlos para evitar la evaporación y contaminación microbiana.
- Después de abrir el kit por primera vez y almacenarlo, verifique que los viales del conjugado y los estándares no presenten contaminación microbiana antes continuar usándolo.
- Para prevenir la contaminación cruzada y la obtención de resultados falsamente elevados, pipeteo las muestras de los pacientes y dispense el conjugado con precisión hacia el fondo de los pozos evitando que se produzcan salpicaduras.
- Tenga en cuenta las directrices para llevar a cabo el control de calidad en los laboratorios clínicos por los controles de ensayo y / o sueros.
- Es importante que el tiempo de reacción en cada pozo se mantenga constante para obtener resultados reproducibles. El pipeteo de las muestras no debe exceder más allá de diez minutos para evitar la deriva del análisis. Si son más de 10 minutos

se necesitan seguir el mismo orden de dispensación. Si se utilizo más de una placa, se recomienda repetir la curva dosis-respuesta en cada placa.

- La eliminación de líquidos incompleta o inexacta de los pozos podría influir en la precisión del ensayo y/o aumentar el fondo. Para mejorar el rendimiento del kit en los sistemas automatizados de ELISA, se recomienda aumentar el número de lavados.
- Muestras con contaminación microbiana no debe ser utilizado en el ensayo. Muestras muy lipémicas o hemolizadas no deberían también ser utilizado.
- Lectores de placas miden verticalmente. No tocar el fondo de los pozos
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Proclin 300® como conservante. Evite el contacto con la piel o mucosa.
- El sustrato de TMB contiene un irritante, que puede ser nocivo si es inhalado, ingerido o absorbido por la piel. Para prevenir lesiones, evite la inhalación, ingestión o contacto con la piel y los ojos.
- La solución de parada se compone de una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo y puede ser tóxico si se ingiere. Para evitar quemaduras, evitar contacto con la piel y los ojos.
- Para valores superiores, por ejemplo en el embarazo, diluir la muestra y, considerando el factor de dilución para el cálculo del resultado.
- Además de la solución de sustrato TMB inicia una reacción cinética, que es terminada por la adición de la parada Solución. Por lo tanto, el sustrato TMB y la solución de parada debe ser añadido en la misma secuencia para eliminar cualquier desviación de tiempo durante la reacción.

12.1. Consideraciones para El Descarte

Los residuos de productos y preparaciones químicos generalmente son considerados como residuos peligrosos. La eliminación de éste tipo de residuos está regulada por leyes y regulaciones nacionales y regionales. Póngase en contacto con las autoridades locales o empresas de manejo de residuos para que lo asesoren sobre cómo eliminar los residuos peligrosos.

Para obtener información sobre los materiales de embalaje, consulte MATERIALES DE EMBALAJE.


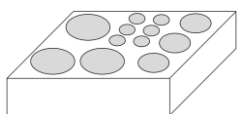


13. INFORMACIONES PARA PEDIDOS

REF	DNOV005	DHEA-S	(96 determinaciones)
------------	---------	--------	----------------------







LITERATURE/ BIBLIOGRAPHIE / BIBLIOGRAFÍA

Abraham G.E., Maroulis G.B., Buster J.E. Chang R.J. and Marshall J.R. (1976) *Obstet. Gynecol.* 47 (4), 395.
 Granoff A.B. and Abraham G.E. (1979) *Obstet. Gynecol.* 53 (1), 111.
 Hopper B.R. and Yen S.S.C. (1975) *Journal of Clinical Endocrinology Metab.* 40 (3), 458.
 Winter J.S.D., Frainam C. and Reyes F.I. (1978) *Clinical Obstetric and Gynecol.* 21 (1), 67.
 Cristina Mihaela Ghiciuc C.M. et al., *Neuroendocrinol Lett* 2011; 32(4):475-480

PACKAGING MATERIALS/ MATÉRIELS D'EMBALLAGE/ MATERIALES DE EMBALAJE

 PAP 21	 PAP 21	 PAP 22	MTP  ALU / LDPE 90
------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

SYMBOLS KEY / EXPLICATION DES SYMBOLES / SÍMBOLOS

	Manufactured by / Fabriqué par/ Fabricado por
IVD	In Vitro Diagnostic Medical Device/ Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> / Producto para diagnóstico In vitro
LOT	Lot Number/ Numéro de lot/ Número de lote
	Expiration Date/ Date de péremption/ Fecha de caducidad
	Storage Temperature/ Température de conservation/ Temperatura de almacenamiento
	Keep away from sunlight / Protéger de rayonnement solaire / Mantener alejado de la luz solar
CE	CE Mark/ Marquage CE / Marca CE
UDI	Unique Device Identifier / identification unique des dispositifs / identificación única del producto
REF	Catalogue Number/ Référence du catalogue/ Número de Catálogo
	Consult Instructions for Use/ Consulter la notice d'utilisation/ Consulte las Instrucciones de Uso
MTP	Microplate/ Microplaque/ Microplaca
CONJ	Conjugate/ Conjugué / Conjugado
CONTROL A	Control A / Contrôle A / / Contro A
CONTROL B	Control B / Contrôle B / Contro B
DIL	Diluent buffer / Tampon diluant / / solución tampón
CAL	Calibrator resp. Standard/ Callibrateur resp Étalon / Calibrador o bien Estándar
SOLN STOP	Stop solution / Solution d'arrêt / Solución de parada
SUB TMB	TMB Substrate solution / Substrat TMB/ solución substrato TMB
WASH BUF 10x	Wash solution 10x concentrated / Solution de lavage concentré 10 x / solución de lavado concentrado x10
	Contains sufficient for "n" tests/ Contenu suffisant pour "n" tests/ Contenido suficiente para "n" tests

SCHEME OF THE ASSAY

DHEA-S

Test Preparation

Prepare reagents and samples as described.
 Establish the distribution and identification plan for all specimens and controls.
 Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Assay Procedure

	Substrate blank	Standard 0 - 5	Controls	Sample
Standard 0 - 5	-	30 µl	-	-
Controls	-	-	30 µl	-
Sample	-	-	-	30 µl
Conjugate	-	100 µl	100 µl	100 µl
Cover wells with foil supplied in the kit Incubate for 1 hour at 37° C Wash each well three times with 300 µl of diluted wash solution In case you use automatic equipment, wash the wells at least 5 times.				
TMB Substrate	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Incubate for exactly 15 min at room temperature (22...28° C) in the dark				
Stop Solution	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Shake the microplate gently Photometric measurement at 450 nm, 620-630 nm				



Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH

Waldstrasse 23 A6

63128 Dietzenbach, Germany

Tel.: +49 6074 23698-0

Fax: +49 6074 23698-900

E-Mail: info.frankfurt@eu.goldstandarddiagnostics.com

Website: clinical.goldstandarddiagnostics.com

DNOV005_DHEA-S_IFU_rev01_fromLot_5990BN