



DCM005-12
Ed. 11/2016

DHEA-S ELISA

per analisi di routine

Determinazione immunoenzimatica diretta del Deidroepiandrosterone solfato (DHEA-S) nel siero o plasma umano

IVD



LOT

Vedere etichetta esterna

2°C 8°C



Σ = 96 tests

REF DKO005

DESTINAZIONE D'USO

Metodo competitivo immunoenzimatico colorimetrico per la determinazione quantitativa della concentrazione di Deidroepiandrosterone solfato (DHEA-S) nel siero o plasma umano.

Il kit DHEA-S ELISA è destinato al solo uso di laboratorio.

1. SIGNIFICATO CLINICO

Il DHEA-S è un ormone steroideo naturale presente principalmente nei reni nel corpo umano.

Il DHEA-S deriva dalla conversione enzimatica di DHEA nei tessuti adrenali ed extra-adrenali.

Il DHEA-S inoltre è prodotto nelle gonadi, nel tessuto adiposo e nel cervello. È l'ormone più abbondante nel corpo umano ed è precursore di tutti gli ormoni sessuali steroidei. La maggior parte del DHEA-S è prodotto dalla zona reticolare dell'adrenale, vi è un ruolo nella risposta immunitaria e agli stress. Il DHEA-S può avere più ruoli biologici. La relativa produzione nel cervello suggerisce che ha un ruolo come neurosteroidi.

La misura nel siero di DHEA-S è un indicatore utile della sintesi degli androgeni. Livelli molto bassi possono suggerire stati di ipoadrenalismo, mentre livelli elevati si presentano in diverse circostanze, per esempio adenoma adrenale e carcinoma, mancanza dell'idrossilasi 21 e della 3-idrossisteroide deidrogenasi ed in alcuni casi dell'irsutismo femminile. Le donne con la sindrome dell'ovaio policistica tendono ad avere livelli normali o leggermente elevati di DHEA-S.

I livelli di DHEA-S non mostrano variazione giornaliera.

2. PRINCIPIO DEL METODO

Il Deidroepiandrosterone solfato (DHEA-S) (antigene) presente nel campione, compete con l'antigene marcato con perossidasi di rafano (HRP) nei confronti dell'anticorpo anti-DHEA-S adsorbito su micropiastra (fase solida).

Dopo l'incubazione, la separazione libero-legato si ottiene mediante semplice lavaggio della fase solida. Successivamente, l'enzima HRP presente nella frazione legata, catalizza la reazione tra il Substrato (H₂O₂) ed il TMB-Substrate, sviluppando una colorazione blu che vira al giallo dopo aggiunta dello Stop solution (H₂SO₄).

L'intensità del colore sviluppato è inversamente proporzionale alla concentrazione del DHEA-S presente nel campione.

La concentrazione di DHEA-S nel campione è calcolata sulla base di una curva di calibrazione.

3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

1. Calibrators (6 flaconi, 1 mL ciascuno, pronti all'uso)

CAL0 **REF DCE002/0506-0**

CAL1 **REF DCE002/0507-0**

CAL2 **REF DCE002/0508-0**

CAL3 **REF DCE002/0509-0**

CAL4 **REF DCE002/0510-0**

CAL5 **REF DCE002/0511-0**

2. Controlli (2 flaconi, 1 mL ciascuno)

Control A **REF DCE045/0503A-0**

Control B **REF DCE045/0503B-0**

La concentrazione dei Controlli è indicata sul Certificato di Analisi

3. Serum Diluent (1 flacone, 100 mL, pronto all'uso)

HEPES 187 mM pH 7,5; BSA 0,5 g/L

REF DCE049/0549-0

4. Conjugate (1 flacone, 12 mL)

DHEA-S coniugato con perossidasi di rafano (HRP)

REF DCE002/0502-0

5. Coated Microplate (1 micropiastra breakable)

Anticorpo anti DHEA-S adsorbito su micropiastra

REF DCE002/0503-0

6. TMB Substrate (1 flacone, 15 mL)

H₂O₂-TMB (0,26 g/L) (evitare il contatto con la pelle)

REF DCE004-0

7. Stop Solution (1 flacone, 15 mL)

Acido Solforico 0,15 mol/L (evitare il contatto con la pelle)

REF DCE005-0

8. 10X Conc. Wash Solution (1 flacone, 50 mL)

Tampone fosfato 0,2M pH 7.4 **REF DCE054-0**

3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit

Acqua distillata.

3.3. Materiale ausiliario e strumentazione

Dispensatori automatici.

Letture per micropiastre (450 nm, 620-630 nm)

Note

Conservare tutti i reattivi a 2-8°C, al riparo dalla luce.

Aprire la busta del Reattivo 5 (Coated Microplate) solo dopo averla riportata a temperatura ambiente e chiuderla subito dopo il prelievo delle strip da utilizzare; una volta aperta è stabile fino alla data di scadenza del kit.

Evitare di staccare la sheet adesiva dalle strip che non vengono utilizzate nella seduta analitica.

4. AVVERTENZE

- Questo test kit è per uso in vitro, da eseguire da parte di personale esperto. Non per uso interno o esterno su esseri Umani o Animali.
- Usare i previsti dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le Buone Pratiche di Laboratorio (GLP) per la manipolazione di prodotti derivati da sangue.
- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di Proclin 300^R come conservante. Evitare il contatto con la pelle e le mucose.
- Il TMB Substrato contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito attraverso la cute. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con la cute e con gli occhi.
- La Stop Solution è costituita da una soluzione di acido solforico diluito. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire possibili ustioni chimiche, evitare il contatto con la cute e con gli occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente TMB/H₂O₂ a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.
- Questo metodo consente di determinare concentrazioni di Deidroepiandrosterone solfato da 0,1 µg/mL a 10,0 µg/mL.
- La somministrazione di steroidi naturali o sintetici può alterare i livelli ematici di Deidroepiandrosterone solfato.

5. PRECAUZIONI

- Si prega di attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi indicata in questo protocollo. I risultati presentati qui sono stati ottenuti usando specifici reagenti elencati in queste Istruzioni per l'Uso.
- Tutti i reattivi devono essere conservati a temperatura controllata di 2-8°C nei loro contenitori originali. Eventuali eccezioni sono chiaramente indicate. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza se conservati e trattati seguendo le istruzioni fornite.
- Prima dell'uso lasciare tutti i componenti dei kit e i campioni a temperatura ambiente (22-28°C) e mescolare accuratamente.
- Non scambiare componenti dei kit di lotti diversi. Devono essere osservate le date di scadenza riportate sulle etichette della scatola e di tutte le fiale. Non utilizzare componenti oltre la data di scadenza.

- Qualora si utilizzi strumentazione automatica, è responsabilità dell'utilizzatore assicurarsi che il kit sia stato opportunamente validato.
- Un lavaggio incompleto o non accurato dei pozzetti può causare una scarsa precisione e/o un'elevato background. Per migliorare le prestazioni del kit su strumentazione automatica, si consiglia di aumentare il numero di lavaggi.
- Per la riproducibilità dei risultati, è importante che il tempo di reazione di ogni pozzetto sia lo stesso. Per evitare il time shifting durante la dispensazione degli reagenti, il tempo di dispensazione dei pozzetti non dovrebbe estendersi oltre i 10 minuti. Se si protrae oltre, si raccomanda di seguire lo stesso ordine di dispensazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva di calibrazione in ogni piastra.
- L'aggiunta del TMB Substrato dà inizio ad una reazione cinetica, la quale termina con l'aggiunta della Stop Solution. L'aggiunta del TMB Substrato e della Stop Solution deve avvenire nella stessa sequenza per evitare tempi di reazione differenti.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori clinici testando controlli e/o pool di sieri.
- Osservare la massima precisione nella ricostituzione e dispensazione dei reagenti.
- Non usare campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici o emolizzati.
- I lettori di micropiastre leggono l'assorbanza verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.

6. PROCEDIMENTO

6.1. Preparazione dei Calibratori (C₀...C₅) e dei Controlli

I Calibratori sono pronti all'uso ed hanno le seguenti concentrazioni:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
µg/mL	0	0.1	0.4	1.0	4.0	10.0

I Calibratori sono stabili fino alla data di scadenza riportata in etichetta. Una volta aperti sono stabili per 6 mesi a 2-8°C.

I Controlli sono pronti all'uso.

6.2. Preparazione del Campione

La determinazione del Deidroepiandrosterone solfato può essere effettuata su plasma o siero umano. Se il dosaggio non viene effettuato lo stesso giorno del prelievo conservare il campione a -20°C. Evitare cicli di congelamento e scongelamento del campione.

Immediatamente prima dell'uso, diluire ogni campione 1:50 con il Serum Diluent (ad esempio aggiungere 20 µL di campione a 980 µL di Serum Diluent). Mescolare bene.

6.3. Preparazione della Wash Solution

Prima dell'uso, diluire il contenuto di ogni fiala di "10X Conc. Wash Solution" con acqua distillata fino al volume di 500 mL. Per preparare volumi minori rispettare il rapporto di diluizione di 1:10. La soluzione

di lavaggio diluita è stabile a 2-8°C per almeno 30 giorni.

Nella wash solution concentrata è possibile osservare la presenza di cristalli; in tal caso agitare a temperatura ambiente fino a completa dissoluzione dei cristalli; per una maggiore precisione diluire tutto il flacone della soluzione di lavaggio concentrata a 500 mL, avendo cura di trasferire anche i cristalli, poi agitare fino a completa dissoluzione dei cristalli.

6.4. Procedimento

- **Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (22-28°C) per almeno 30 minuti.** Al termine del dosaggio riporre immediatamente tutti i reagenti a 2-8°C: evitare lunghi periodi a temperatura ambiente.
- Le strisce di pozzetti non utilizzate devono essere rimesse immediatamente nella busta richiudibile contenente il materiale essicante e conservate a 2-8°C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche non rimettere i reagenti inutilizzati nei flaconi originali.
- Al fine di aumentare l'accuratezza dei risultati del test è necessario operare in doppio, allestendo due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C₀-C₅), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagente	Calibratore	Campione /Controllo	Bianco
Campione diluito/ Controllo		30 µL	
Calibratori C ₀ -C ₅	30 µL		
Conjugate	100 µL	100 µL	
Incubare 1 h a +37°C. Allontanare la miscela di reazione lavare i pozzetti 3 volte con 0,3 mL di wash solution diluita. Nota importante: ad ogni step di lavaggio, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e successivamente rimuovere l'eccesso di soluzione di lavaggio sbattendo delicatamente la micropiastra capovolta su fogli di carta assorbente. Lavaggi automatici: se si utilizza strumentazione automatica effettuare almeno 5 lavaggi.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubare 15 minuti a temperatura ambiente (22÷28°C), al riparo dalla luce.			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Agitare delicatamente la micropiastra. Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm oppure contro il Bianco entro 5 minuti.			

7. CONTROLLO QUALITA'

Ogni laboratorio dovrebbe analizzare i campioni nella gamma dei livelli elevati, normali e bassi di DHEA-S per il controllo delle prestazioni dell'analisi. Questi campioni dovrebbero essere trattati come ignoti ed i valori determinati in ogni test effettuato. Le tabelle di controllo qualità dovrebbero essere effettuate per seguire le prestazioni dei reagenti forniti. Metodi statistici adeguati dovrebbero essere impiegati per accertare il trend. Il laboratorio dovrebbe fissare i limiti di accettabilità di prestazioni dell'analisi. Altri parametri che dovrebbero essere controllati includono le intercette di 80, 50 e 20% della curva di calibrazione per valutare la riproducibilità. In più, la capacità di assorbimento massima dovrebbe essere costante con l'esperienza precedente. La deviazione significativa dalle prestazioni stabilite può indicare il cambiamento inosservato negli stati o nella degradazione sperimentali dei reagenti del kit. Reagenti freschi dovrebbero essere usati per determinare il motivo delle variazioni.

8. RISULTATI

8.1. Estinzione media

Calcolare l'estinzione media (Em) di ciascun punto della curva di calibrazione (C₀-C₅) e di ogni campione.

8.2. Curva di calibrazione

Tracciare sul grafico delle assorbanze i valori calcolati delle estinzioni medie (Em) di ciascun calibratore (C₀-C₅) in funzione delle concentrazioni. Tracciare la miglior curva passante per i punti di calibrazione (es: Four Parameter Logistic).

8.3 Calcolo dei risultati

Interpolare, dal grafico, i valori di assorbanza relativi a ciascun campione e leggerne la corrispondente concentrazione in µg/mL

9. VALORI DI RIFERIMENTO

Le concentrazioni seriche o plasmatiche di Deidroepiandrosterone solfato sono comprese nei seguenti intervalli:

	FEMMINE µg/mL	MASCHI µg/mL
Neonati	0,9 - 1,8	0,9 - 1,8
Prepuberi	0,25 - 1	0,25 - 1
Adulti	0,9 - 3,6	0,9 - 3,6
Postmenopausa	< 0,25 - 1	---
Gravidanza	0,25 - 1,8	---

È importante tenere presente che la determinazione di un range di valori attesi in un dato metodo per una popolazione "normale" è dipendente da molteplici fattori, quali la specificità e sensibilità del metodo in uso, e la popolazione in esame. Perciò ogni laboratorio dovrebbe considerare i range indicati dal Fabbriante come un'indicazione generale e produrre range di valori attesi propri basati sulla popolazione indigena dove il laboratorio risiede.

10. PARAMETRI CARATTERISTICI

10.1. Precisione

10.1.1. Intra-Assay

La variabilità all'interno dello stesso kit è stata determinata replicando (16x) la misura di tre differenti sieri. La variabilità intra-assay è 7,9%.

10.1.2. Inter-Assay

La variabilità tra kit differenti è stata determinata replicando la misura di tre differenti sieri di controllo con kit appartenenti a lotti diversi. La variabilità inter-assay è 10,4%.

10.2. Accuratezza

La prova di recupero condotta su campioni arricchiti con 0,6 - 1,25 - 2,5 e 5 µg/mL di DHEA-S, ha dato un valore medio (±SD) di 102,87% ± 8,63%.

La prova di diluizione condotta su tre campioni diluiti 2 - 4 e 8 volte ha dato un valore medio (± SD) di 100,15% ± 9,02%.

10.3. Sensibilità

La concentrazione minima di DHEA-S misurabile che può essere distinta dal Calibratore 0 è 0,04 µg/mL con un limite di confidenza del 95%.

10.4. Specificità: cross reagenti

L'anticorpo impiegato presenta le seguenti reazioni crociate, calcolate al 50% secondo Abraham:

Cross-reagente	Cross reattività (%)
DHEA-S	100 %
DHEA	100 %
Androstenedione	59 %
Androsterone	16 %
DHT	1,0 %
Testosterone	0,63 %
Estrone	0,3 %
Progesterone	0,27 %
Pregnenolone	0,18 %
17OH Progesterone	0,15 %
11-deoxycortisol	0,08 %
Cortisone	0,013 %
Cortisol	< 0,01 %
17B-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 %

10.5. Specificità: sostanze interferenti

L'interferenza da Bilirubina, Emoglobina e Trigliceridi è stata testata con il kit Diametra DHEA-S ELISA:

Sostanza	Conc. testata	Interferenza
Bilirubina	0.2 mg/mL	No
Emoglobina	2 mg/mL	No
Trigliceridi	6 mg/mL	No

Non è stata osservata interferenza con nessuna delle sostanze indagate; per le buone pratiche di laboratorio, si raccomanda comunque di non utilizzare campioni altamente lipemici o emolizzati.

10.6. Specificità: plasma e SST tube

È stata valutata l'interferenza in campioni plasmatici e in campioni ottenuti con SST (serum separation tube). Come riferimento è stato utilizzato siero ottenuto dal medesimo paziente.

Campione	Interferenza
SST (serum separation tube)	No
EDTA plasma	No
Litio-eparina plasma	No
Sodio-eparina plasma	No

Non sono state osservate interferenze.

10.7. Correlazione con il dosaggio RIA

Il kit DHEA-S ELISA Diametra è stato comparato con un kit disponibile in commercio.

Sono stati testati 42 campioni di siero.

La curva di regressione è:

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

$$r^2 = 0,961$$

11. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

I reagenti devono essere smaltiti in accordo con le leggi locali.

BIBLIOGRAFIA

- Abraham G.E., et al Obstet. Gynecol., 47 (4), 395 (1976)
- Granoff A.B. et al Obstet. Gynecol., 53 (1), 111 (1979)
- Hopper B.R. et al J. Clinic. Endocrin. Metab. 40 (3), 458 (1975)
- Winter J.S.D, et al Clinic. Obstetric and Gynecol., 21 (1), 67 (1978)
- Cristina Mihaela Ghiciuc C.M et al., Neuroendocrinol Lett 2011; 32(4):475-480

Ed. 11/2016

DCM005-12

DiaMetra S.r.l. Headquarter: Via Calabria 15, 20090 SEGRATE (MI) Italy

Tel. +39-02-2139184 - Fax +39-02-2133354

Manufactory: Via Pozzuolo 14, 06038 SPELLO (PG) Italy

Tel. +39-0742-24851 - Fax +39-0742-316197

E-mail: info@diametra.com



DCM005-12
Ed. 11/2016

DHEA-S ELISA

for routine analysis

Direct immunoenzymatic determination of Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S) in human serum or plasma

IVD



LOT

See external label

2°C 8°C



Σ = 96 tests

REF DKO005

INTENDED USE

Competitive immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination of Dehydro-epiandrosterone sulfate (DHEA-S) concentration in human serum or plasma.

DHEA-S ELISA kit is intended for laboratory use only.

1. CLINICAL SIGNIFICANCE

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 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 biologic roles. Its production in the brain suggests that is also has a role as a neurosteroid.

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

DHEA-S levels show no diurnal variation.

2. PRINCIPLE OF THE METHOD

The DHEA-S (antigen) in the sample competes with the antigenic DHEA-S conjugated with horseradish peroxidase (HRP) for binding to the limited number of antibodies anti DHEA-S coated on the microplate (solid phase). After the incubation, the bound/free separation is performed by a simple solid-phase washing.

Then, the enzyme HRP in the bound-fraction reacts with the Substrate (H₂O₂) and the TMB Substrate and develops a blu color that changes into yellow when the Stop Solution (H₂SO₄) is added.

The colour intensity is inversely proportional to the DHEA-S concentration of in the sample.

DHEA-S concentration in the sample is calculated through a calibration curve.

3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

3.1. Reagents and materials supplied in the kit

1. Calibrators (6 vials, 1 mL each, ready to use)

CAL0	REF DCE002/0506-0
CAL1	REF DCE002/0507-0
CAL2	REF DCE002/0508-0
CAL3	REF DCE002/0509-0
CAL4	REF DCE002/0510-0
CAL5	REF DCE002/0511-0

2. Controls (2 vials, 1 mL each)

Control A	REF DCE045/0503A-0
Control B	REF DCE045/0503B-0

Controls Concentration is indicated on the Certificate of Analysis

3. Serum diluent (1 vial, 100 mL, pronto all'uso)

HEPES 187 mM pH 7.5; BSA 0.5 g/L	REF DCE049/0549-0
----------------------------------	-------------------

4. Conjugate (1 vial, 12 mL)

DHEA-S conjugate with horseradish peroxidase (HRP)	REF DCE002/0502-0
--	-------------------

5. Coated Microplate (1 breakable microplate)

Antibody anti DHEA-S adsorbed on microplate	REF DCE002/0503-0
---	-------------------

6. TMB Substrate (1 vial, 15 mL)

H ₂ O ₂ -TMB 0.26 g/L (avoid any skin contact)	REF DCE004-0
--	--------------

7. Stop Solution (1 vial, 15 mL)

Sulphuric acid 0.15 mol/L (avoid any skin contact)	REF DCE005-0
--	--------------

8. 10X Conc. Wash Solution (1 vial, 50 mL)

Phosphate buffer 0.2M pH 7.4	REF DCE054-0
------------------------------	--------------

3.2. Reagents necessary not supplied

Distilled water.

3.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.

Microplates reader (450 nm, 620-630 nm)

Notes

Store all reagents between 20-8°C in the dark.

Open the bag of reagent 5 (Coated Microplate) only when it is at room temperature and close it immediately after use; once opened, it is stable until expiry date of the kit.

Do not remove the adhesive sheets on the unused strips.

4. WARNINGS

- This kit is intended for in vitro use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
- Some reagents contain small amounts of Proclin 300^R as preservatives. Avoid the 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.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H₂O₂ to directed sunlight, metals or oxidants.
- This method allows the determination of Dehydroepiandrosterone Sulphate from 0.1 µg/mL to 10 µg/mL.
- The clinical significance of the determination Dehydroepiandrosterone Sulphate can be invalidated if the patient was treated with cortisone or natural or synthetic steroids.

5. PRECAUTIONS

- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol. The performance data represented here were obtained using specific reagents listed in this Instruction For Use.
- All reagents should be stored refrigerated at 2-8°C in their original container. Any exceptions are clearly indicated. The reagents are stable until the expiry date when stored and handled as indicated.
- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22-28°C) and mix well prior to use.
- Do not interchange kit components from different lots. The expiry date printed on box and vials labels must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- If you use automated equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately tested.
- 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.
- 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

- 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.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of the reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

6. PROCEDURE

6.1. Preparation of Calibrators (C₀...C₅) and Controls

The Calibrators are ready to use and have the following concentrations:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
µg/mL	0	0.1	0.4	1.0	4.0	10.0

The Calibrators are stable until the expiry date printed on the label. Once opened, the Calibrators are stable for 6 months at 2-8°C.

The Controls are ready to use.

6.2. Preparation of the Sample

The determination of Dehydroepiandrosterone Sulphate 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 connection. Avoid repetitive freezing and thawing of samples.

Immediately before use, dilute each sample 1:50 with the Serum Diluent (i.e. add 20 µL of sample to 980 µL of Serum Diluent). Mix well.

6.3. Preparation of Wash Solution

Dilute the content of each vial of the "10X Conc. Wash 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 wash solution is stable for 30 days at 2-8°C.

In concentrated wash solution is possible to observe the presence of crystals; in this case mix at room temperature until the complete dissolution of crystals; for greater accuracy, dilute the whole bottle of concentrated wash solution to 500 mL, taking care to transfer completely the crystals, then mix until crystals are completely dissolved.

6.4. Procedure

- **Allow all reagents to reach room temperature (22-28°C) for at least 30 minutes.** At the end of the assay, store immediately the reagents at 2-8°C: avoid long exposure to room temperature.
- Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2-8°C.
- To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.
- As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the calibration curve (C₀-C₅), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample/ Control	Blank
Diluted Sample/ Control		30 µL	
Calibrators C ₀ -C ₅	30 µL		
Conjugate	100 µL	100 µL	
Incubate at 37°C for 1 hour. Remove the content from each well. Wash the wells 3 times with 300 µL of diluted wash solution. 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: if you use automated equipment, wash the wells at least 5 times.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate at room temperature (22÷28°C) for 15 minutes in the dark.			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Shake the microplate gently. Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against Blank within 5 minutes.			

7. 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 calibration 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.

8. RESULTS

8.1. Mean Absorbance

Calculate the mean of the absorbances (E_m) for each point of the calibration curve (C₀-C₅) and of each sample.

8.2. Calibration Curve

Plot the values of absorbance (E_m) of the Calibrators (C₀-C₅) against concentration. Draw the best-fit curve through the plotted points (es: Four Parameter Logistic).

8.3. Calculation of Results

Interpolate the values of the samples on the calibration curve to obtain the corresponding values of the concentrations expressed in µg/mL.

9. REFERENCE VALUES

The serum or plasma Dehydroepiandrosterone Sulphate 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. PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

10.1. Precision

10.1.1. Intra-Assay Variation

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

10.1.2. Inter-Assay Variation

Between run variation was determined by replicate (20x) the measurement of three different control sera in different lots. The between assay variability is 10.4%.

10.2. 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%.

10.3. Sensitivity

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

10.4. Specificity: cross reagent

The cross reaction of the antibody calculated at 50% according to Abraham are shown in the table:

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 %
17OH Progesterone	0,15 %
11-deoxycortisol	0,08 %
Cortisone	0,013 %
Cortisol	< 0,01 %
17b 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 %

10.5. Specificity: interfering substances

Interference by Bilirubin, Hemoglobin and Triglycerides has been investigated on Diametra 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 to use highly lipemic or haemolysed samples.

10.6. 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.

10.7. Correlation with RIA

Diametra DHEA-S ELISA kit was compared to another commercially available DHEA-S assay.

42 serum samples have been analysed.

The linear regression curve was calculated:

$$y = 0.93x + 0.28$$

$$r^2 = 0.961$$

11. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

BIBLIOGRAPHY

- Abraham G.E., et al Obstet. Gynecol., 47 (4), 395 (1976)
- Granoff A.B. et al Obstet. Gynecol., 53 (1), 111 (1979)
- Hopper B.R. et al J. Clin. Endocrin. Metab. 40 (3), 458 (1975)
- Winter J.S.D, et al Clin. Obstetric and Gynecol., 21 (1), 67 (1978)
- Cristina Mihaela Ghiciuc C.M et al., Neuroendocrinol Lett 2011; 32(4):475-480

Ed. 11/2016

DCM005-12

DiaMetra S.r.l. Headquarter: Via Calabria 15, 20090 SEGRATE (MI) Italy
Tel. +39-02-2139184
Fax +39-02-2133354

Manufactory: Via Pozzuolo 14, 06038 SPELLO (PG) Italy
Tel. +39-0742-24851
Fax +39-0742-316197
E-mail: info@diametra.com



DCM005-12

Ed. 11/2016

DHEA-S ELISA

para análisis de rutina

Determinación inmunoenzimática directa de la dehidroepiandrosterona sulfato (DHEA-S) en suero o plasma humano

IVD



LOT

Ver etiqueta externa



Σ = 96 ensayos

REF DKO005

USO PREVISTO

Método inmunoenzimático colorimétrico competitivo para la determinación cuantitativa de la concentración de dehidroepiandrosterona sulfato (DHEA-S) en suero y plasma.

El kit DHEA-S ELISA está destinado al uso en laboratorio exclusivamente.

1. IMPORTANCIA CLÍNICA

La dehidroepiandrosterona sulfato (DHEA-S) es una hormona esteroide natural que se encuentra principalmente en los riñones en el cuerpo humano. DHEA-S se deriva de la conversión enzimática de la DHEA en los tejidos adrenales y extra-adrenal.

DHEA-S también se produce en las gónadas, tejido adiposo y el cerebro. Es la hormona más abundante en el cuerpo humano y es el precursor de todas las hormonas esteroides. La mayoría de DHEA-S se produce por la zona reticular de la suprarrenal; tiene un papel en la respuesta inmune y el estrés. DHEA-S puede tener múltiples funciones biológicas. Su producción en el cerebro sugiere que juega un papel como neuroesteroides.

La medición del suero DHEA-S es un indicador útil de la síntesis de andrógenos. Niveles muy bajos puede sugerir estados ipoadrenalismo, mientras que los niveles elevados se presentan en diversas circunstancias, tales como adenoma suprarrenal y carcinoma, la falta de de la hidroxilasa 21 y 3 - hidroxisteroide deshidrogenasa, y en algunos casos, el hirsutismo femenino. Las mujeres con síndrome de ovario poliquístico tienen niveles normales o ligeramente elevados de DHEAS.

Los niveles de DHEA-S no muestran variación diaria.

2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

La DHEA-S (antígeno) de la muestra compete con la DHEA-S antigénica marcada con peroxidasa de rabano (HRP, Conjugado) por la unión al anticuerpo anti-DHEA-S adsorbido en la microplaca (fase sólida).

Después de la incubación, la separación de las fracciones libre y unida se obtiene mediante un simple lavado de la fase sólida.

Por último, al reaccionar con el sustrato (H₂O₂) y el sustrato TMB (TMB), la enzima HRP presente en la fracción unida desarrolla una coloración azul que se

torna amarilla tras añadir la solución de interrupción (H₂SO₄).

La intensidad del color desarrollado es inversamente proporcional a la concentración de DHEA-S en la muestra.

La concentración de DHEA-S en la muestra se calcula según una curva de calibración.

3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTOS

3.1 Reactivos y materiales incluidos en el kit

1. Calibradores (6 frascos, 1 mL cada uno, listo para usar)

CAL0

REF DCE002/0506-0

CAL1

REF DCE002/0507-0

CAL2

REF DCE002/0508-0

CAL3

REF DCE002/0509-0

CAL4

REF DCE002/0510-0

CAL5

REF DCE002/0511-0

2. Controles (2 frascos, 1 mL cada uno)

Control A

REF DCE045/0503A-0

Control B

REF DCE045/0503B-0

La concentración de los Controles se indica en la Hoja de Control (Certificate of Analysis)

3. Diluyente de muestra (1 frasco, 100 mL, listo para usar)

HEPES 187 mM pH 7.5; BSA 0,5 g/L

REF DCE049/0549-0

4. Conjugado (1 frasco, 12 mL)

DHEA-S conjugado con peroxidasa de rabano (HRP)

REF DCE002/0502-0

5. Microplaca recubierta (1 microplaca divisible)

Anticuerpo anti DHEA-S adsorbido en la microplaca

REF DCE002/0503-0

6. Sustrato TMB (1 frasco, 15 mL)

H₂O₂ -TMB (0,26 g/L) (evítese el contacto con la piel)

REF DCE004-0

7. Solución de parada (1 frasco, 15 mL)

Ácido sulfúrico 0,15 mol/L (evítese el contacto con la piel)

REF DCE005-0

8. Solución de lavado conc.10X (1 frasco, 50 mL)

Tampón fosfato 0,2M pH 7.4

REF DCE054-0

3.2 Reactivos necesarios no incluidos en el kit

Agua destilada

3.3 Material e instrumental auxiliar

Dispensadores automáticos

Lector de microplacas (450 nm, 620-630 nm).

Notas

Conservar los reactivos a oscuras, a temperatura entre 2 y 8°C.

Llevar a temperatura ambiente la bolsa del reactivo 5 (microplaca recubierta) antes de abrirla; cerrarla de inmediato después de sacar las tiras que se han de utilizar; una vez abierta, permanece estable hasta la fecha de caducidad del kit.

No separe la hoja adhesiva de las tiras que no vaya a utilizar de inmediato.

4. ADVERTENCIAS

- Este kit de ensayo está previsto para usarse in vitro y por personal experto. No es para uso interno o externo en humanos o animales.
- Usar los equipos de protección individual previstos al trabajar con los reactivos suministrados.
- Siga las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) en el manejo de las muestras sanguíneas y sus derivados.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Proclin 300^R como conservante. Evite el contacto con la piel y las mucosas.
- El cromógeno TMB contiene un irritante que puede ser dañino si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para prevenir lesiones, evitar la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y con los ojos.
- La solución de parada está formada por una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo, y puede ser tóxico si se ingiere. Para prevenir posibles quemaduras químicas, evitar el contacto con la piel y con los ojos.
- Evite la exposición de los reactivos TMB/H₂O₂ a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.
- Este método permite determinar concentraciones de DHEA-S de 0,1 µg/mL hasta 10,0 µg/mL.
- El suministro de esteroides naturales o sintéticos puede alterar los niveles hemáticos de DHEA-S.

5. PRECAUCIONES

- Respetar rigurosamente la secuencia de los pasos indicados en este protocolo. Los resultados aquí presentados se han obtenido utilizando los reactivos específicos que figuran en estas instrucciones de uso.
- Todos los reactivos deben conservarse a una temperatura controlada de 2-8°C en sus recipientes originales. Todas las excepciones están claramente marcados. Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad cuando se almacenan y manipulan de acuerdo con las instrucciones proporcionadas.
- Antes del uso, esperar hasta que todos los componentes del kit y las muestras se encuentren

a temperatura ambiente (22-28°C) y mezclar cuidadosamente.

- No mezclar componentes de kits de lotes distintos. Se debe observar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja y de todas las ampollas. No usar componentes después de la fecha de caducidad.
- Si utiliza un equipo automático, es responsabilidad del usuario asegurar que la metodología aplicada sea debidamente validada.
- Un lavado incompleto o impreciso y la aspiración insuficiente del líquido de los pocillos ELISA pueden causar una precisión pobre y/o un elevado fondo. Para mejorar el rendimiento del kit en los sistemas automatizados, se recomienda aumentar el número de lavados.
- Para la reproducibilidad de los resultados, es importante que el tiempo de reacción sea igual para cada pocillo. El tiempo de dispensación de los pocillos no debe superar los 10 minutos; si se prolongara más allá de los 10 minutos, respétese el orden de dispensación. Si utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva de calibración en cada plato.
- Al añadir el sustrato TMB inicia una reacción cinética que termina al agregar la solución de interrupción. Tanto el sustrato como la solución de interrupción deben agregarse en la misma secuencia para evitar diferentes tiempos de reacción.
- Observar las directrices para la ejecución del control de calidad en los laboratorios clínicos al comprobar controles y/o pool de sueros.
- Observar la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- No use muestras con contaminación microbiana, altamente lipémicas o hemolizadas.
- Los lectores de microplacas leen las DO verticalmente, por tanto no debe tocarse el fondo de los pocillos.

6. PROCEDIMIENTO

6.1 Preparación de los Calibradores (C₀...C₅)

Los Calibradores son listo para usar y tienen las siguientes concentraciones:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
µg/mL	0	0.1	0.4	1.0	4.0	10.0

Los Calibradores son estables hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. Una vez abiertos, los Calibradores permanecen estables por lo menos 6 meses conservados a 2-8°C.

Los Controles está listo para usar.

6.3 Preparación de la muestra

La determinación de DHEA-S se puede realizar en el plasma o suero humano. Si la dosis no se llevó a cabo el mismo día de la recolección, mantener la muestra a -20°C. Se recomienda no congelar y descongelar repetidamente las muestras.

Inmediatamente antes de su uso, diluir cada muestra 1:50 con diluyente de suero (por

ejemplo, añadir 980 µL de diluyente de suero y 20µL de la muestra). Mezclar bien.

6.4 Preparación de la 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 Procedimiento

- **Esperar hasta que todos los reactivos se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) durante al menos 30 minutos.** Al final del ensayo inmediatamente poner todos los reactivos a 2-8°C para evitar largos periodos a temperatura ambiente.
- Las tiras de pocillos no utilizados se deben guardar de inmediato en la bolsa desechable que contiene desecantes y almacenarse a 2-8°C.
- Para evitar la contaminación microbiana y/o química no regrese porciones de reactivos no usados en los viales originales.
- Para aumentar la precisión de los resultados de la prueba es necesario trabajar en duplicado: preparar dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (C₀-C₅), dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

Reactivo	Calibrador	Muestra/ Control	Blanco
Muestra diluida/ Control		30 µL	
Calibrador C ₀ -C ₅	30 µL		
Conjugado	100 µL	100 µL	
<p>Incubar 1 h a 37°C. Retirar la mezcla de reacción. Lave los pozos 3 veces con 0,3 mL de solución de lavado diluida.</p> <p>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.</p> <p>Lavados automático: si está utilizando una lavadora automática, lavar los pocillos al menos 5 veces.</p>			
TMB Substrato	100 µL	100 µL	100 µL

Incubar 15 minutos a temperatura ambiente (22÷28°C), protegida de la luz.

Solución de parada	100 µL	100 µL	100 µL
--------------------	--------	--------	--------

Agitar suavemente la placa.
Leer la absorbancia (E) a 450 nm frente una segunda lectura de referencia a 620-630 nm o frente al blanco dentro de los 5 minutos.

7. CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe analizar sueros control para los rangos bajo, medio y alto de DHEA-S para supervisar el rendimiento del análisis. Estas muestras deben tratarse como desconocidas y los valores deben determinarse en cada ensayo realizado. Se deben mantener los gráficos de control de calidad para seguir el rendimiento de los reactivos suministrados. Se deben emplear métodos estadísticos adecuados para determinar las tendencias. El laboratorio debe establecer los límites de aceptabilidad del rendimiento del análisis. Entre otros parámetros que se deben controlar, se incluyen las intersecciones de 80, 50 y 20% de la curva de calibración para evaluar la reproducibilidad. Además, la capacidad de absorción máxima debe ser constante con la experiencia anterior. Una desviación significativa del rendimiento establecido puede indicar un cambio inadvertido en las condiciones experimentales o la degradación de los reactivos del kit. Se deben usar reactivos frescos para determinar la causa de las variaciones. Si no se elimina completamente la solución de lavado de los pocillos se pueden producir repeticiones pobres y resultados erróneos.

8. RESULTADOS

8.1 Absorbancia media

Calcular la extinción media (E_m) de cada punto de la curva de calibración (C₀-C₅) y de cada muestra.

8.2 Curva de calibración

Trazar el gráfico de la absorbancia en función de las concentraciones de los Calibradores (C₀-C₅). Trazar la curva de ajuste óptimo para los puntos de calibración (p. ej.: Logística de cuatro parámetros).

8.3 Cálculo de los resultados

Interpolarse del gráfico los valores de absorbancia relativos a cada muestra y leer la concentración correspondiente en µg/mL.

9. VALORES DE REFERENCIA

Las concentraciones de DHEA-S en suero o plasma están incluidas en los siguientes intervalos:

	Mujeres µg/mL	Hombres µg/mL
Bebés	0,9 - 1,8	0,9 - 1,8
Prepuberal	0,25 - 1	0,25 - 1
Adultos	0,9 - 3,6	0,9 - 3,6
Post-menopausicas	< 0,25 - 1	---
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. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

10.1 Precisión

10.1.1 Intra ensayo

La variabilidad dentro del mismo kit se determinó repitiendo (16x) tres niveles diferentes de sueros.

La variabilidad dentro del ensayo es 7,9%.

10.1.2 Entre ensayos

La variabilidad entre kits diferentes se determinó repitiendo tres niveles diferentes de suero con kit de lotes diferentes.

La variabilidad entre ensayos es 10,4%.

10.2 Exactitud

La prueba de recuperación realizada en muestras enriquecidas con 0,6 - 1,25 - 2,5 - 5 µg/mL de DHEA-S ha dado un valor medio (±SE) de 102,87% ± 8,63%.

La prueba de dilución a cabo en tres muestras diluidas 2 - 4 - 8 veces dio una media (± DE) de 100,15% ± 9,02%.

10.3 Sensibilidad

La concentración mínima de DHEA-S detectable que puede distinguirse del Calibrador 0 es de 0,04 µg/mL con un límite de confianza del 95%.

10.4 Especificidad: reactividad cruzada

El anticuerpo empleado presenta las siguientes reacciones cruzadas, calculadas al 50% según el método de Abraham:

DHEA-S	100 %
DHEA	100 %
Androstenediona	59 %
Androsterona	16 %
DHT	1,0 %
Testosterona	0,63 %
Estrona	0,3 %
Progesterona	0,27 %
Pregnenolona	0,18 %
17OH Progesterona	0,15 %
11-deoxycortisol	0,08 %
Cortisona	0,013 %
Cortisol	< 0,01 %
17b Estradiol	< 0,01 %
Corticosterona	< 0,01 %

17a Estradiol	< 0,01 %
Cholesterol	< 0,001 %
Estriol	< 0,001 %
Estradiol Sulphate	< 0,001 %
Aldosterona	< 0,001 %
Estradiol-3-Sulphate-17-Glucoronida	< 0,001 %

10.5 Especificidad: sustancias interferentes

Se investigó la interferencia de la Bilirrubina, Hemoglobina y Triglicéridos:

Sustancia	Concentración	Interferencia
Bilirrubina	0,2 mg/mL	No
Hemoglobina	2 mg/mL	No
Triglicéridos	6 mg/mL	No

Las sustancias investigadas no presentan interferencia con el Kit Diametra DHEA-S ELISA; sin embargo para las buenas prácticas de laboratorio se recomienda no utilizar muestras altamente lipémicas o hemolizadas.

10.6 Especificidad: plasma y "SST Tube"

Se investigó si muestras plasmáticas o muestras obtenidas con "tubos separadores de suero" (SST Tube) presenten algún tipo de interferencia (como referencia se utilizó una muestra del mismo paciente).

Muestra	Interferencia
SST (tubos separadores de suero)	No
EDTA plasma	No
Litio-heparina plasma	No
Sodio-heparina plasma	No

El Kit Diametra DHEA-S ELISA no presenta interferencia.

10.7 Correlación

El DHEA-S ELISA fue comparado con otro ensayo comercial de DHEA-S. Con ambos sistemas de prueba, se analizaron 42 muestras de suero.

Se calculó la curva de regresión lineal.

$$Y = 0,93 \cdot X + 0,28$$

$$r^2 = 0,961$$

11. INDICACIONES PARA LA ELIMINACIÓN

Eliminar los reactivos conforme con la normativa local sobre la materia.

BIBLIOGRAFÍA

- Abraham G.E., et al Obstet. Gynecol., 47 (4), 395 (1976)
- Granoff A.B. et al Obstet. Gynecol., 53 (1), 111 (1979)
- Hopper B.R. et al J. Clinic. Endocrin. Metab. 40 (3), 458 (1975)
- Winter J.S.D, et al Clinic. Obstetric and Gynecol., 21 (1), 67 (1978)
- Cristina Mihaela Ghiciuc C.M et al., Neuroendocrinol Lett 2011; **32**(4):475–480

Ed. 11/2016

DCM005-12

DiaMetra S.r.l. Headquater: Via Calabria 15

20090 SEGRATE (MI) Italy

Tel. +39-02-2139184

Fax +39-02-2133354

Manufactory: Via Pozzuolo 14,

06038 SPELLO (PG) Italy

Tel. +39-0742-24851

Fax +39-0742-316197

E-mail: info@diametra.com

	DE ES FR GB IT PT	In vitro Diagnostikum Producto sanitario para diagnóstico In vitro Dispositif medical de diagnostic in vitro In vitro Diagnostic Medical Device Dispositivo medico-diagnostico in vitro Dispositivos medicos de diagnostico in vitro		DE ES FR GB IT PT	Hergestellt von Elaborado por Fabriqué par Manufacturer Produttore Produzido por
	DE ES FR GB IT PT	Achtung, Begleitdokumente Precaución, consulte los documentos adjuntos Attention, veuillez consulter les documents d'accompagnement Caution, consult accompanying documents Attenzione, consultare la documentazione allegata Atenção, consultar os documentos de acompanhamento	 yyyy-mm	DE ES FR GB IT PT	Herstellungs datum Fecha de fabricacion Date de fabrication Date of manufacture Data di produzione Data de produção
 yyyy-mm-dd	DE ES FR GB IT PT	Verwendbar bis Establa hasta (usar antes de último día del mes) Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) Use by (last day of the month) Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) Utilizar (antes ultimo dia do mês)		DE ES FR GB IT PT	Biogefährdung Riesco biológico Risque biologique Biological risk Rischio biologico Risco biológico
	DE ES FR GB IT PT	Gebrauchsanweisung beachten Consultar las instrucciones Consulter le mode d'emploi Consult instructions for use Consultare le istruzioni per l'uso Consultar instruções para uso	LOT	DE ES FR GB IT PT	Chargenbezeichnung Codigo de lote Numero de lot Batch code Codice del lotto Codigo do lote
 $\Sigma = xx$	DE ES FR GB IT PT	Ausreichend für "n" Tests Contenido suficiente para "n" tests Contenu suffisant pour "n" tests Contains sufficient for "n" tests Contenuto sufficiente per "n" saggi Contém o suficiente para "n" testes	CONT	DE ES FR GB IT PT	Inhalt Contenido del estuche Contenu du coffret Contents of kit Contenuto del kit Conteúdo do kit
 Max Min	DE ES FR GB IT PT	Temperaturbereich Límitación de temperatura Limites de température de conservation Temperature limitation Limiti di temperatura Temperaturas limites de conservação	REF	DE ES FR GB IT PT	Bestellnummer Número de catálogo Références du catalogue Catalogue number Numero di Catalogo Número do catálogo
	DE ES FR GB IT PT	Vor direkter Sonneneinstrahlung schützen Mantener alejado de la luz solar Tenir à l'écart de la lumière du soleil Keep away from sunlight Tenere lontano dalla luce solare Mantenha longe da luz solar			

SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI/TROUBLESHOOTING**ERRORE CAUSE POSSIBILI/ SUGGERIMENTI****Nessuna reazione colorimetrica del saggio**

- mancata dispensazione del coniugato
- contaminazione del coniugato e/o del Substrato
- errori nell'esecuzione del saggio (es. Dispensazione accidentale dei reagenti in sequenza errata o provenienti da flaconi sbagliati, etc.)

Reazione troppo blanda (OD troppo basse)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo breve, temperatura di incubazione troppa bassa

Reazione troppo intensa (OD troppo alte)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo lungo, temperatura di incubazione troppa alta
- qualità scadente dell'acqua usata per la soluzione di lavaggio (basso grado di deionizzazione,)
- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

Valori inspiegabilmente fuori scala

- contaminazione di pipette, puntali o contenitori- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

CV% intrasaggio elevato

- reagenti e/o strip non portate a temperatura ambiente prima dell'uso
- il lavatore per micropiastre non lava correttamente (suggerimento: pulire la testa del lavatore)

CV% intersaggio elevato

- condizioni di incubazione non costanti (tempo o temperatura)
- controlli e campioni non dispensati allo stesso tempo (con gli stessi intervalli) (controllare la sequenza di dispensazione)
- variabilità intrinseca degli operatori

ERROR POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS**No colorimetric reaction**

- no conjugate pipetted reaction after addition
- contamination of conjugates and/or of substrate
- errors in performing the assay procedure (e.g. accidental pipetting of reagents in a wrong sequence or from the wrong vial, etc.)

Too low reaction (too low ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too short, incubation temperature too low

Too high reaction (too high ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too long, incubation temperature too high
- water quality for wash buffer insufficient (low grade of deionization)
- insufficient washing (conjugates not properly removed)

Unexplainable outliers

- contamination of pipettes, tips or containers
- insufficient washing (conjugates not properly removed) too high within-run
- reagents and/or strips not pre-warmed to CV% Room Temperature prior to use
- plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)
- too high between-run - incubation conditions not constant (time, CV % temperature)
- controls and samples not dispensed at the same time (with the same intervals) (check pipetting order)
- person-related variation

ERROR / POSIBLES CAUSAS / SUGERENCIAS**No se produce ninguna reacción colorimétrica del ensayo**

- no se ha dispensado el conjugado
- contaminación del conjugado y/o del sustrato
- errores en la ejecución del ensayo (p. ej., dispensación accidental de los reactivos en orden incorrecto o procedentes de frascos equivocados, etc.)

Reacción escasa (DO demasiado bajas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado corto, temperatura de incubación demasiado baja

Reacción demasiado intensa (DO demasiado altas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado largo, temperatura de incubación demasiado alta
- calidad escasa del agua usada para la solución de lavado (bajo grado de desionización)
- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

Valores inexplicablemente fuera de escala

- contaminación de pipetas, puntas o contenedores- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

CV% intraensayo elevado

- los reactivos y/o tiras no se encontraban a temperatura ambiente antes del uso
- el lavador de microplacas no funciona correctamente (sugerencia: limpiar el cabezal del lavador)

CV% interensayo elevado

- condiciones de incubación no constantes (tiempo o temperatura)
- controles y muestras no dispensados al mismo tiempo (con los mismos intervalos) (controlar la secuencia de dispensación)
- variación en función de los operadores

ERREUR CAUSES POSSIBLES / SUGGESTIONS**Aucune réaction colorimétrique de l'essai**

- non distribution du conjugué
- contamination du conjugué et/ou du substrat
- erreurs dans l'exécution du dosage (par ex., distribution accidentelle des réactifs dans le mauvais ordre ou en provenance des mauvais flacons, etc.)

Réaction trop faible (DO trop basse)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop court, température d'incubation trop basse

Réaction trop intense (DO trop élevée)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop long, température d'incubation trop élevée
- mauvaise qualité de l'eau utilisée pour la solution de lavage (bas degré de déionisation)
- lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

Valeurs inexplicablement hors plage

- contamination des pipettes, embouts ou récipients - lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

CV% intra-essai élevé

- les réactifs et/ou les bandes n'ont pas atteint la température ambiante avant usage
- le laveur de microplaques ne lave pas correctement (suggestion : nettoyer la tête du laveur)

CV% inter-essai élevé

- conditions d'incubation non constantes (temps ou température)
- contrôles et échantillons non distribués en même temps (avec les mêmes intervalles) (contrôler l'ordre de distribution)
- variabilité intrinsèque des opérateurs