DiaMetra

DCM124-0
Ed. 01/2012

DHEA

per analisi di routine

Determinazione immunoenzimatica del DHEA nel siero o plasma umano

IVD | LOT Vedere etichetta esterna | 2°C 8°C | Σ = 96 tests | REF DKO124

DESTINAZIONE D'USO

Metodo competitivo immunoenzimatico colorimetrico per la determinazione quantitativa della concentrazione di deidroepiandrosterone (DHEA) nel siero o plasma umano.
Il kit DHEA è destinato al solo uso di laboratorio.

1. SIGNIFICATO CLINICO

Il Deidroepiandrosterone è uno steroide a 19 atomi di carbonio prodotto nella cortecca adrenale e in minore quantità nelle gonadi. Il DHEA è un precursore della sintesi del testosterone e vari estrogeni.
Il ruolo fisiologico del DHEA non è completamente chiaro, in quanto sono stati evidenziati molteplici effetti sia in vivo che in vitro; tra questi va ricordato la prevenzione e regressione di tumori al colon, spontanei o indotti, nei roditori. Alcuni studi hanno mostrato una diminuzione della produzione di DHEA in donne con rischio di cancro al seno. Altri ruoli del DHEA dimostrati in modelli animali comprendono l'azione terapeutica nei confronti del diabete, dell'obesità e di malattie cardiovascolari, e ruoli non ben chiariti nelle funzioni immunologiche, nel metabolismo dei lipidi (colesterolo compreso) e all'interno del sistema nervoso.
I livelli sierici di DHEA sono relativamente alti in età fetale e neonatale, si abbassano durante la fanciullezza e hanno un nuovo aumento durante la pubertà e fino ai 30 anni. Durante la gravidanza o il ciclo mestruale non si osservano variazioni del DHEA.
I livelli sierici di DHEA sono 100-1000 volte inferiori a quelli del Deidroepiandrosterone-Solfato (DHEA-S).
La misura dei livelli sierici del DHEA è un marker per la sintesi di androgeni adrenali. Possono essere osservati livelli bassi anormali nell'ipoadrenalismo e livelli elevati in varie patologie quali l'adenoma surrenalico, deficienze di 21-idroxilasi e 3b-idroxisteroid deidrogenasi e in alcuni casi di irsutismo femminile.

2. PRINCIPIO DEL METODO

I reagenti essenziali richiesti per questo test immunoenzimatico sono un anticorpo anti DHEA biotinilato, l'antigene DHEA coniugato con l'enzima HRP (perossidasi di rafano), l'antigene DHEA nativo presente nel campione ed una micropiastra coattata con Streptavidina (altamente affine per la Biotina). L'antigene nativo è in quantità sconosciuta, mentre l'anticorpo e l'antigene coniugato ad HRP sono in eccesso.
Nella prima fase del saggio questi tre componenti vengono miscelati insieme; ne risulta una reazione competitiva per l'anticorpo anti DHEA tra l'antigene nativo e l'antigene coniugato con enzima HRP.
L'interazione è illustrata dall'equazione seguente:

$$EAg + Ag + Ab_{BT} \underset{k\text{-}a}{\overset{ka}{\Leftrightarrow}} Ag\text{-}Ab_{BT} + EAg\text{-}Ab_{BT}$$

EAg = antigene marcato con enzima HRP
Ag = antigene nativo (quantità presente nel campione sconosciuta)
Ab_{BT} = anticorpo anti DHEA biotinilato
$Ag\text{-}Ab_{BT}$ = complesso antigene nativo-anticorpo
$EAg\text{-}Ab_{BT}$ = complesso antigene marcato HRP - anticorpo
ka = Costante di associazione
k-a = Costante di dissociazione

Contemporaneamente alla loro formazione, i complessi si fissano sui pozzetti della micropiastra tramite la reazione ad alta affinità tra la Streptavidina e l'anticorpo biotinilato.
I reagenti in eccesso che non si sono fissati nei pozzetti vengono eliminati nelle fasi di lavaggio.
Nell'ultima fase del dosaggio, l'enzima HRP legato nel pozzetto catalizza la reazione tra il Substrato (H_2O_2) ed il TMB-Substrate (TMB), sviluppando una colorazione blu che vira al giallo dopo aggiunta della Stop solution (H_2SO_4).
L'intensità del colore sviluppato è inversamente proporzionale alla concentrazione di antigene nativo DHEA presente nel campione.
La concentrazione di DHEA nel campione è infine calcolata sulla base di una curva di calibrazione.

3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

1. DHEA Calibrators (6 flaconi, 1 mL ciascuno)

CAL0	REF **DCE002/12406-0**
CAL1	REF **DCE002/12407-0**
CAL2	REF **DCE002/12408-0**
CAL3	REF **DCE002/12409-0**
CAL4	REF **DCE002/12410-0**
CAL5	REF **DCE002/12411-0**

2. DHEA Enzyme Reagent (1 flacone, 6 mL)
DHEA coniugato con perossidasi di rafano (HRP)
REF **DCE002/12402-0**

3. DHEA Biotin Reagent (1 flacone, 6 mL)
Anticorpo anti DHEA biotinilato
REF **DCE019/12419-0**

4. Coated Microplate (1 micropiastra breakable)
Micropiastra coattata con Streptavidina
REF **DCE002/12403-0**

5. TMB Substrate (1 flacone, 12 mL)
H_2O_2-TMB (0,26 g/L) *(evitare il contatto con la pelle)*
REF **DCE004/12404-0**

6. Stop Solution (1 flacone, 8 mL)
Acido Solforico 0,15 mol/L *(evitare il contatto con la pelle)* REF **DCE005/12405-0**

7. 50X Conc. Wash Solution (1 flacone, 20 mL)
NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L REF **DCE006/12406-0**

3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit

Acqua distillata.

3.3. Materiale ausiliario e strumentazione

Dispensatori automatici.
Lettore per micropiastre (450 nm).

Note

Conservare tutti i reattivi a 2÷8°C, al riparo dalla luce.
Aprire la busta del Reattivo 4 (Coated Microplate) solo dopo averla riportata a temperatura ambiente e chiuderla subito dopo il prelievo delle strip da utilizzare.

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.
- Tutti i reattivi di origine umana usati nella preparazione dei reagenti sono stati testati e sono risultati negativi per la presenza di anticorpi anti-HIV 1&2, per HbsAg e per anticorpi anti-HCV. Tuttavia nessun test offre la certezza completa dell'assenza di HIV, HBV, HCV o di altri agenti infettivi. Pertanto, i Calibratori devono essere maneggiati come materiali potenzialmente infettivi.
- 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/H_2O_2 a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.

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 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'addizione del TMB Substrato dà inizio ad una reazione cinetica, la quale termina con l'addizione della Stop Solution. L'addizione 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 (C_0…C_5)

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

	C_0	C_1	C_2	C_3	C_4	C_5
ng/mL	0	0,5	2,0	5,0	10,0	30,0

Una volta aperti sono stabili per 6 mesi a 2÷8°C.

6.2. Preparazione del Campione

La determinazione del Deidroepiandrosterone 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.

6.3. Preparazione della Wash Solution

Prima dell'uso, diluire il contenuto di ogni fiala di "50X Conc. Wash Solution" con acqua distillata fino al volume di 1000 mL. Per preparare volumi minori rispettare il rapporto di diluizione di 1:50. La soluzione di lavaggio diluita è stabile a 2÷8°C per almeno 30 giorni.

6.4. Procedimento

- **Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (22-28°C).**
- 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 (C_0-C_5), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagente	Calibratore	Campione	Bianco
Calibratore C_0-C_5	25 µL		
Campione		25 µL	
DHEA Enzyme Reagent	50 µL	50 µL	
Agitare delicatamente la micropiastra per 20-30 secondi per miscelare bene la soluzione.			
DHEA Biotin Reagent	50 µL	50 µL	
Agitare delicatamente la micropiastra per 20-30 secondi per miscelare bene la soluzione. Coprire la micropiastra Incubare 1 h a temperatura ambiente (22-28°C). Allontanare la miscela di reazione; lavare i pozzetti 3 volte con 350 µL di wash solution diluita.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubare 20 minuti a temperatura ambiente (22÷28°C), al riparo dalla luce.			
Stop Solution	50 µL	50 µL	50 µL
Agitare delicatamente la micropiastra. Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro il Bianco.			

7. CONTROLLO QUALITA'

Ogni laboratorio dovrebbe analizzare i campioni nella gamma dei livelli elevati, normali e bassi di DHEA 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 standard 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.

7.1. Interpretazione dei risultati

Se per calcolare i risultati è stato usato il computer, è imperativo che i valori dei calibratori cadano entro il 10% delle concentrazioni assegnate.

8. RISULTATI

8.1. Estinzione media

Calcolare l'estinzione media (Em) di ciascun punto della curva di calibrazione (C_0-C_5) e di ogni campione.

8.2. Curva di calibrazione

Tracciare sul grafico delle assorbanze i valori calcolati delle estinzioni medie (Em) di ciascun calibratore (C_0-C_5) 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 ng/mL

9. VALORI DI RIFERIMENTO

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

	Femmine	Maschi
Range (ng/mL)	1,3 - 9,8	1,8 - 12,5

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 Fabbricante 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 la misura di tre differenti sieri di controllo. La variabilità intra-assay è ≤ 9,8%.

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 ≤ 10,7%.

10.2. Sensibilità

La concentrazione minima di DHEA misurabile che può essere distinta dal Calibratore 0 è 0,10 ng/mL con un limite di confidenza del 95%.

10.3. Specificità

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

Substance	%
DHEA	100
DHEA-S	0,004
Androstenedione	0,056
Corticosterone	0,004
Cortisolo	0,001
Pregnenolone	0,070
Testosterone	0,002
Dihydrotestosterone	0,007
Estriolo	< 0,001
Estradiolo	< 0,001
Estrone	< 0,001

11. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

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

BIBLIOGRAFIA

1. Dorfman RI, Shipley, RA, *Adrogens*, John Wiley and Sons, New York, 1956, pp. 116-128.
2. Pang S, Riddick L, Hirsutism, IN Lifshitz (ed), *Pediatric Endocrinology, A Clinical Guide, second edition*, Marcel Dekker Inc., New York 1990, pp 259-291
3. De Peretti E, Forest MG, Pattern of plasma dehydroepiandrosterone sulfate levels ih humans from birth to adulthood: evidence for testicular production, *J Clin Endocrinol Metab*, 47, 572-577 (1978)
4. Lashansky G, Saenger P, Fishman K, Gautier T, Mayes D, Berg G, Di Martino-Nardi J, Reiter E, Normative data for adrenal steroidogenesis in a healthy pediatric population: age and sex-related changes after adrenocorticotropin stimulation, *J Clin Endocrinol Metab*, 73, 674-686 (1991)
5. Zurnoff B, Roenfeld RS, Stain GW, Levin J, Fukushima DK, Sex differences in twenty-four hour mean plasma concentration of dehydroepiandrosterone (DHEA) and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) and the DHEA to DHEAS ratio in normal adults, *J Clin Endocrinol Metab* 51, 330-333 (1980)
6. Pang S, Lerner A, Stoner E, Oberfield S, Engle I, New M, Late-onset adrenal steroid 3'-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency: a cause of hirsutism in pubertal and postpubertal women, *J Clin Endocrinol Metab* 60, 428-439 (1985)
7. Lee PDK, Winter RJ, and Gree OC, Virilizing adrenocortical tumors in childhood: eight cases and a review of the literature, *Pediatrics*, 76, 437-444 (1985)
8. Tietz NW, *Textbook of clinical chemistry, 2nd ed.* Philadelphia WB Saunders, 1994

Ed. 01/2012 **DCM124-0**

DiaMetra S.r.l. Headquater: Via Garibaldi, 18 – 20090 SEGRATE (MI) Italy
Tel. 0039-02-2139184 – 02-26921595
Fax 0039–02–2133354.
Manufactory: Via Giustozzi, 35/35a – Z.I Paciana – 06034 FOLIGNO (PG) Italy
Tel. 0039-0742–24851
Fax 0039–0742–316197
E-mail: info@diametra.com

DiaMetra

CE

DCM124-0
Ed. 01/2012

DHEA

for routine analysis

Immunoenzymatic determination of DHEA in human serum or plasma

IVD | LOT See external label | 2°C 8°C | Σ = 96 tests | REF DKO124

INTENDED USE

Competitive immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination of Dehydroepiandrosterone (DHEA) concentration in human serum or plasma.
DHEA kit is intended for laboratory use only.

1. CLINICAL SIGNIFICANCE

Dehydroepiandrosterone (DHEA) is a C19 steroid secreted by the adrenal cortex and in smaller quantities by the gonads. DHEA is a precursor in testosterone and various estrogens biosynthesis.
The physiologic role of DHEA is not-well defined, because of a lot of ascertained in vivo and in vitro effects, for example the prevention and regression of colon tumor, spontaneous and inducted, in rodents.
Some studies showed a decrease in the DHEA production in women with risk for the breast cancer. In animal models DHEA showed a role in the therapeutic action against diabetes, obesity and cardiovascular pathologies, and unclear roles in immunology, in lipid metabolism (also cholesterol) and in the nervous system.
Seric levels of DHEA are relatively high in fetal and neonatal age, decrease during childhood and increase again during puberty until 30 years. No DHEA variations have been observed during pregnancy or menstrual cycle. Seric levels of DHEA are 100-1000 times lower than the levels of DHEA sulphate (DHEA-S).
The measurement of seric levels of DHEA is a marker for adrenal androgen synthesis. Abnormal low levels of DHEA can be observed in the hypoadrenalism, while elevated levels can be observed in various pathologies such as the surrenalic adenomas, 21-hydroxylase and 3b-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency and in some cases of female hirsutism.

2. PRINCIPLE OF THE METHOD

The essential reagents required for this immunoenzymatic assay are a biotinylated anti DHEA antibody, the DHEA antigen conjugated with the enzyme HRP (horseradish peroxidase), the DHEA antigen present in the sample, and a microplate coated with Streptavidin (highly specific for Biotin). The quantity of native antigen is unknown, while the antibody and the antigen linked to HRP are in excess.
In the first part of the assay these three components are mixed together; a competitive reaction for the anti DHEA antibody between the native antigen and the antigen linked to HRP develops.

The interaction is illustrated by the following equation:

$$EAg + Ag + Ab_{BT} \underset{k\text{-}a}{\overset{ka}{\Leftrightarrow}} Ag\text{-}Ab_{BT} + EAg\text{-}Ab_{BT}$$

EAg = antigen linked to HRP enzyme
Ag = native antigen (unknown amount in the sample)
Ab_{BT} = biotinylated anti DHEA antibody
$Ag\text{-}Ab_{BT}$ = native antigen-antibody complex
$EAg\text{-}Ab_{BT}$ = native antigen linked to HRP - antibody complex
ka = rate constant of association
k-a = rate constant of dissociation

Simultaneously to their formation, the complexes are fixed to the microplate wells through the interaction between the Streptavidin and the biotinylated antibody.
The reagents in excess that have not react are eliminated in the washing steps.
In the last part of the assay, the enzyme HRP linked in the wells reacts with the Substrate (H_2O_2) and the TMB Substrate and develops a blu color that changes into yellow when the Stop Solution (H_2SO_4) is added.
The colour intensity is inversely proportional to the native antigen DHEA in the sample.
DHEA concentration in the sample is finally calculated through a calibration curve.

3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

3.1. Reagents and materials supplied in the kit

1. DHEA Calibrators (6 vials, 1 mL each)

CAL0	**REF DCE002/12406-0**
CAL1	**REF DCE002/12407-0**
CAL2	**REF DCE002/12408-0**
CAL3	**REF DCE002/12409-0**
CAL4	**REF DCE002/12410-0**
CAL5	**REF DCE002/12411-0**

2. DHEA Enzyme Reagent (1 vial, 6 mL)
DHEA conjugated with horseradish peroxydase (HRP)
REF DCE002/12402-0

3. DHEA Biotin Reagent (1 vial, 6 mL)
Antibody anti DHEA biotinylated
REF DCE019/12419-0

4. Coated Microplate (1 breakable microplate)
Microplate coated with Streptavidin
REF DCE002/12403-0

5. TMB Substrate (1 vial, 12 mL)
H_2O_2-TMB 0.26 g/L *(avoid any skin contact)*
REF DCE004/12404-0

6. Stop Solution (1 vial, 8 mL)
Sulphuric acid 0.15 mol/L *(avoid any skin contact)*
REF DCE005/12405-0

7. 50X Conc. Wash Solution (1 vial, 20 mL)
NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L
REF DCE006/12406-0

3.2. Reagents necessary not supplied

Distilled water.

3.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.
Microplates reader (450 nm)

Notes

Store all reagents between 2÷ 8°C in the dark.
Open the bag of reagent 4 (Coated Microplate) only when it is at room temperature and close it immediately after use.

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.
- All human source material used in the preparation of reagents has been tested and found negative for antibody to HIV 1&2, HbsAg, and HCV. No test method however can offer complete assurance that HIV, HBV, HCV or other infectious agents are absent. Therefore, the Calibrators should be handled in the same manner as potentially infectious material.
- Some reagents contain small amounts of Proclin 300^R as preservative. 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/H_2O_2 to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.

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.
- 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 reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemeic 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 (C_0…C_5)

The Calibrators are ready for use and have the following concentration of DHEA:

	C_0	C_1	C_2	C_3	C_4	C_5
ng/mL	0	0,5	2,0	5,0	10,0	30,0

Once opened, the Calibrators are stable for 6 months at 2÷8°C.

6.2. Preparation of the Sample

The determination of Dehydroepiandrosterone 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.

6.3. Preparation of Wash Solution

Dilute the content of each vial of the "50X Conc. Wash Solution" with distilled water to a final volume of 1000 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:50 dilution ratio. The diluted wash solution is stable for 30 days at 2÷8°C.

6.4. PROCEDURE

- **Allow all reagents to reach room temperature (22-28°C).**
- 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 (C_0-C_5), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample	Blank
Calibrator C_0-C_5	25 µL		
Sample		25 µL	
DHEA Enzyme Reagent	50 µL	50 µL	
Shake gently the microplate for 20-30 seconds to mix.			
DHEA Biotin Reagent	50 µL	50 µL	
Shake gently the microplate for 20-30 seconds to mix. Cover the plate. Incubate 1 h at room temperature (22-28°C). Remove the contents from each well; wash the wells 3 times with 350 µL of diluted Wash Solution.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate 20 minutes at room temperature (22÷28°C), in the dark.			
Stop Solution	50 µL	50 µL	50 µL
Shake gently the micoplate. Read the absorbance (E) at 450 nm against blank.			

7. QUALITY CONTROL

Each laboratory should assay controls at normal, high and low levels range of DHEA 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.

7.1. Interpretation of Results

If computer controlled data reduction is used to calculate the results of the test, it is imperative that the predicted values for the calibrators fall within 10% of the assigned concentrations.

8. RESULTS

8.1. Mean Absorbance

Calculate the mean of the absorbances (Em) for each point of the calibration curve (C_0-C_5) and of each sample.

8.2. Calibration Curve

Plot the values of absorbance (Em) of the calibrators (C_0-C_5) 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 ng/mL.

9. REFERECE VALUES

The serum or plasma Dehydroepiandrosterone reference values are:

	Female	Male
Range (ng/mL)	1,3 - 9,8	1,8 - 12,5

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 Manufacurer 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 the measurement of three different control sera in one assay. The within assay variability is ≤ 9,8%.

10.1.2. Inter-Assay Variation

Between run variation was determined by replicate the measurement of three different control sera in different lots. The between assay variability is ≤ 10,7%.

10.2. Sensitivity

The lowest detectable concentration of DHEA that can be distinguished from the Calibrator 0 is 0,10 ng/mL at the 95% confidence limit.

10.3. Specificity

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

Substance	%
DHEA	100
DHEA-S	0,004
Androstenedione	0,056
Corticosterone	0,004
Cortisol	0,001
Pregnenolone	0,070
Testosterone	0,002
Dihydrotestosterone	0,007
Estriol	< 0,001
Estradiol	< 0,001
Estrone	< 0,001

11. WASTE MENAGEMANT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

BIBLIOGRAPHY

1. Dorfman RI, Shipley, RA, *Adrogens*, John Wiley and Sons, New York, 1956, pp. 116-128.
2. Pang S, Riddick L, Hirsutism, IN Lifshitz (ed), *Pediatric Endocrinology, A Clinical Guide, second edition*, Marcel Dekker Inc., New York 1990, pp 259-291
3. De Peretti E, Forest MG, Pattern of plasma dehydroepiandrosterone sulfate levels ih humans from birth to adulthood: evidence for testicular production, *J Clin Endocrinol Metab*, 47, 572-577 (1978)
4. Lashansky G, Saenger P, Fishman K, Gautier T, Mayes D, Berg G, Di Martino-Nardi J, Reiter E, Normative data for adrenal steroidogenesis in a healthy pediatric population: age and sex-related changes after adrenocorticotropin stimulation, *J Clin Endocrinol Metab*, 73, 674-686 (1991)
5. Zurnoff B, Roenfeld RS, Stain GW, Levin J, Fukushima DK, Sex differences in twenty-four hour mean plasma concentration of dehydroepian-drosterone (DHEA) and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) and the DHEA to DHEAS ratio in normal adults, *J Clin Endocrinol Metab* 51, 330-333 (1980)
6. Pang S, Lerner A, Stoner E, Oberfield S, Engle I, New M, Late-onset adrenal steroid 3'-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency: a cause of hirsutism in pubertal and postpubertal women, *J Clin Endocrinol Metab* 60, 428-439 (1985)
7. Lee PDK, Winter RJ, and Gree OC, Virilizing adrenocortical tumors in childhood: eight cases and a review of the literature, *Pediatrics*, 76, 437-444 (1985)
8. Tietz NW, *Textbook of clinical chemistry, 2nd ed.* Philadelphia WB Saunders, 1994

Ed. 01/2012 **DCM124-0**

DiaMetra S.r.l. Headquater: Via Garibaldi, 18 – 20090 SEGRATE (MI) Italy
Tel. 0039-02-2139184 – 02-26921595 – Fax 0039–02–2133354.
Manufactory: Via Giustozzi, 35/35a – Z.I Paciana – 06034 FOLIGNO (PG) Italy
Tel. 0039-0742–24851 Fax 0039–0742–316197
E-mail: info@diametra.com

	DIA.METRA SRL	
Mod. PIS	**PACKAGING INFORMATION SHEET**	

IT *Spiegazione dei simboli* GB *Explanation of symbols* FR *Explication des symboles* ES *Significado de los simbolos*

DE *Verwendete Symbole* PT *Explicaçao dos simbolos*

IVD	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
REF	DE ES FR GB IT PT	Bestellnummer Nûmero de catálogo Réferéncès du catalogue Catalogue number Numero di Catalogo Número do catálogo	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
Σ = 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 Límitaciôn de temperatura Limites de température de conservation Temperature limitation Limiti di temperatura Temperaturas limites de conservação			

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 temperature 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