



## Instructions for Use

# Salivary DHEA ELISA (0 – 1440 pg/mL)

IVD



REF SLV-3012

Σ 96



**DRG** 

DRG Instruments GmbH, Germany  
Frauenbergstraße. 18, D-35039 Marburg  
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50  
Website: [www.drg-diagnostics.de](http://www.drg-diagnostics.de)  
E-mail: [drg@drg-diagnostics.de](mailto:drg@drg-diagnostics.de)

Distributed by:

**DRG** 

DRG International, Inc., USA  
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081  
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556  
Website: [www.drg-international.com](http://www.drg-international.com)  
E-mail: [corp@drg-international.com](mailto:corp@drg-international.com)

**Contents / Inhaltsverzeichnis / Contenido**

1 INTRODUCTION ..... 2  
 2 PRINCIPLE OF THE TEST..... 2  
 3 WARNINGS AND PRECAUTIONS..... 3  
 4 REAGENTS ..... 4  
 5 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION ..... 5  
 6 ASSAY PROCEDURE ..... 5  
 7 EXPECTED NORMAL VALUES ..... 7  
 8 QUALITY CONTROL ..... 7  
 9 PERFORMANCE CHARACTERISTICS ..... 7  
 10 LIMITATIONS OF USE ..... 9  
 11 LEGAL ASPECTS..... 9  
 12 REFERENCES / LITERATURE ..... 9

1 EINLEITUNG ..... 10  
 2 TESTPRINZIP..... 10  
 3 VORSICHTSMAßNAHMEN ..... 10  
 4 BESTANDTEILE DES KITS..... 11  
 5 PROBENVORBEREITUNG ..... 12  
 6 TESTDURCHFÜHRUNG ..... 13  
 7 ERWARTETE WERTE ..... 14  
 8 QUALITÄTS-KONTROLLE ..... 14  
 9 ASSAY CHARACTERISTIKA ..... 14  
 10 GRENZEN DES TESTS ..... 15  
 11 RECHTLICHE GRUNDLAGEN..... 15  
 12 REFERENZEN / LITERATUR..... 15

1 INTRODUCCIÓN ..... 16  
 2 FUNDAMENTO DEL ENSAYO..... 16  
 3 PRECAUCIONES ..... 16  
 4 COMPONENTES DEL KIT ..... 17  
 5 RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA..... 18  
 6 PROCEDIMIENTO DE ENSAYO..... 18  
 7 VALORES ESPERADOS..... 20  
 8 CONTROL DE CALIDAD ..... 20  
 9 CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO ..... 20  
 10 LIMITACIONES DE USO ..... 21  
 11 ASPECTOS LEGALES ..... 21  
 12 REFERENCIAS / BIBLIOGRAFÍA..... 21

SYMBOLS USED ..... 22

## 1 INTRODUCTION

### 1.1 Intended Use

An enzyme immunoassay for the quantitative *in vitro diagnostic* measurement of Dehydroepiandrosterone (DHEA) in saliva.

### 1.2 Summary and Explanation

Dehydroepiandrosterone (DHEA; androstenedione; 3 $\beta$ -hydroxy-5-androsten-17-one) is a C<sub>19</sub> steroid produced in the adrenal cortex and, to a lesser extent, gonads. DHEA serves as a precursor in testosterone and estrogen synthesis. Due to the presence of a 17-oxo (rather than hydroxyl) group, DHEA has relatively weak androgenic activity, which has been estimated at ~10% that of testosterone. However in neonates, peripubertal children and in adult women, circulating DHEA levels may be several-fold higher than testosterone concentrations, and rapid peripheral tissue conversion to more potent androgens (androstenedione and testosterone) and estrogens may occur. Moreover, DHEA has relatively low affinity for sex-hormone binding globulin. These factors may enhance the physiologic biopotency of DHEA.

The physiologic role of DHEA has not been conclusively defined. A variety of *in vitro* effects, including antiproliferative effects in different cell lines and effects on enzyme-mediated cell metabolism, have been reported. *In vivo* studies suggest that DHEA may affect cholesterol and lipid metabolism, insulin sensitivity and secretion and immune function. Abnormal DHEA levels have been reported in schizophrenia and obesity. Therapeutic administration of DHEA has been proposed for several conditions, including obesity and cardiovascular disease.

## 2 PRINCIPLE OF THE TEST

The **DRG Salivary DHEA ELISA** Kit is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), based on the principle of competitive binding.

The microtiter wells are coated with a polyclonal antibody directed towards an antigenic site of the DHEA molecule. Endogenous DHEA of a patient sample competes with a DHEA-horseradish peroxidase conjugate for binding to the coated antibody. After incubation the unbound conjugate is washed off.

The amount of bound peroxidase conjugate is inversely proportional to the concentration of DHEA in the sample. After addition of the substrate solution, the intensity of colour developed is inversely proportional to the concentration of DHEA in the patient sample.

**3 WARNINGS AND PRECAUTIONS**

1. This kit is for in vitro diagnostic use only. For professional use only.
2. All reagents of this test kit which contain human serum or plasma have been tested and confirmed negative for HIV I/II, HBsAg and HCV by FDA approved procedures. All reagents, however, should be treated as potential biohazards in use and for disposal.
3. Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of the package insert provided with the kit. Be sure that everything is understood.
4. The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 °C to 8 °C in the sealed foil pouch and used in the frame provided.
5. Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step.
6. Use reservoirs only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing a substrate solution that had previously been used for the conjugate solution may turn solution colored. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur.
7. Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells.
8. Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.
9. Allow the reagents to reach room temperature (21 °C to 26 °C) before starting the test. Temperature will affect the absorbance readings of the assay. However, values for the patient samples will not be affected.
10. Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and specimens with skin and mucous membranes.
11. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.
12. Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents or specimens may give false results.
13. Handling should be done in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.
14. Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
15. All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiter plate readers.
16. Do not mix or use components from kits with different lot numbers. It is advised not to exchange wells of different plates even of the same lot. The kits may have been shipped or stored under different conditions and the binding characteristics of the plates may result slightly different.
17. Avoid contact with *Stop Solution* containing 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. It may cause skin irritation and burns.
18. Some reagents contain Proclin, BND and/or MIT as preservatives. In case of contact with eyes or skin, flush immediately with water.
19. TMB substrate has an irritant effect on skin and mucosa. In case of possible contact, wash eyes with an abundant volume of water and skin with soap and abundant water. Wash contaminated objects before reusing them. If inhaled, take the person to open air.
20. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guideline or regulation.
21. For information on hazardous substances included in the kit please refer to Safety Data Sheets. Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from DRG.

## 4 REAGENTS

### 4.1 Reagents provided

1. **Microtiterwells**, 12 x 8 (break apart) strips, 96 wells;  
Wells coated with a anti-DHEA antibody (polyclonal).
2. **Standard (Standard 0-5)**, 6 vials, 1 mL each, ready to use;  
Concentrations: 0 – 10.0 – 60.0 – 120.0 - 480.0 - 1440.0 pg/mL,  
Conversion: DHEA (pg/mL) x 3.47 = pmol/L  
Contain a non-mercury preservative.
3. **Control Low and High**, 2 vials, 1.0 mL each, ready to use;  
For control values and ranges please refer to vial label or QC-Datasheet.  
Contain a non-mercury preservative.
4. **Enzyme Conjugate**, 1 vial, 14 mL, ready to use;  
DHEA conjugated to horseradish peroxidase;  
Contains a non-mercury preservative.
5. **Substrate Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use;  
Tetramethylbenzidine (TMB).
6. **Stop Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use;  
contains 0.5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.
7. **Wash Solution**, 1 vial, 30 mL (40X concentrated);  
see „Preparation of Reagents“.

**Note:** Additional *Standard 0* for sample dilution is available upon request.

### 4.2 Materials required but not provided

- A microtiter plate calibrated reader (450±10 nm), (e.g. the DRG Instruments Microtiter Plate Reader).
- Calibrated variable precision micropipettes (50 µL, 100 µL, 200 µL).
- Absorbent paper.
- Distilled or deionized water
- Timer (60 min. range).
- Semi logarithmic graph paper or software for data reduction

### 4.3 Storage Conditions

When stored at 2 °C to 8 °C unopened reagents will retain reactivity until expiration date. Do not use reagents beyond this date.

Opened reagents must be stored at 2 °C to 8 °C. Microtiter wells must be stored at 2 °C to 8 °C. Once the foil bag has been opened, care should be taken to close it tightly again.

Opened kits retain activity for 8 weeks if stored as described above.

### 4.4 Reagent Preparation

Bring all reagents and required number of strips to room temperature prior to use.

#### **Wash Solution**

Add deionized water to the 40X concentrated *Wash Solution*.

Dilute 30 mL of concentrated *Wash Solution* with 1170 mL deionized water to a final volume of 1200 mL.

*The diluted Wash Solution is stable for 2 weeks at room temperature.*

### 4.5 Disposal of the Kit

The disposal of the kit must be made according to the national regulations. Special information for this product is given in the Safety Data Sheet.

### 4.6 Damaged Test Kits

In case of any severe damage to the test kit or components, DRG has to be informed in writing, at the latest, one week after receiving the kit. Severely damaged single components should not be used for a test run. They have to be stored until a final solution has been found. After this, they should be disposed according to the official regulations.

## 5 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Eating, drinking, chewing gums or brushing teeth should be avoided for 30 minutes before sampling. Otherwise, it is recommended to rinse mouth thoroughly with cold water 5 minutes prior to sampling.

Do not collect samples when oral diseases, inflammation or lesions exist (blood contamination).

If there is visible blood contamination the patient specimen, it should be discarded, rinse the sampling device with water, wait for 10 minutes and take a new sample.

*Note:* Samples containing sodium azide should not be used in the assay.

### 5.1 Specimen Collection

Saliva samples should be collected only using special saliva sampling devices (vial and straw) SALI-TUBES 100 (SLV-4158).

Do not use any cotton swab for sampling, such as Salivettes; in most cases this will result in artificially high values.

Due to the cyclic secretion pattern of steroid hormones it is important to care for a proper timing of the sampling.

In order to avoid arbitrary results we recommend that 5 samples always be taken within a period of 2 – 3 hours (*multiple sampling*) preferably before a meal.

As food might contain significant amounts of steroid hormones samples preferably should be taken while fasting. If fasting should be a problem the collection period should be timed just before lunch or before dinner.

### 5.2 Specimen Storage and Preparation

Specimens should be capped and may be stored for up to one week at 2 °C to 8 °C prior to assaying.

Specimens held for a longer time should be frozen -20 °C prior to assay. Even repeated thawing and freezing is no problem.

Each sample has to be frozen, thawed, and centrifuged at least once in order to separate the mucins by centrifugation.

Upon arrival of the samples in the lab the samples have to stay in the deep freeze at least overnight. Next morning the frozen samples are warmed up to room temperature and mixed carefully.

Then the samples have to be centrifuged for 5 to 10 minutes (at 3000 - 2000 x g).

Now the clear colorless supernatant is easy to pipette.

If a set of multiple samples is to be tested, the lab (after at least one freezing, thawing, and centrifugation cycle) has to mix the 5 single samples in a separate sampling device and perform the testing from this mixture.

### 5.3 Specimen Dilution

If in an initial assay, a specimen is found to contain more than the highest standard, the specimens can be diluted with *Standard 0* and re-assayed as described in Assay Procedure.

For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

Example:

a) Dilution 1:10: 10 µl saliva + 90 µl *Standard 0* (mix thoroughly)

b) Dilution 1:100: 10 µl of dilution a) + 90 µl *Standard 0* (mix thoroughly).

## 6 ASSAY PROCEDURE

### 6.1 General Remarks

- All reagents and specimens must be allowed to come to room temperature before use. All reagents must be mixed without foaming.
- Once the test has been started, all steps should be completed without interruption.
- Use new disposal plastic pipette tips for each standard, control or sample in order to avoid cross contamination.
- Absorbance is a function of the incubation time and temperature. Before starting the assay, it is recommended that all reagents are ready, caps removed, all needed wells secured in holder, etc. This will ensure equal elapsed time for each pipetting step without interruption.
- As a general rule the enzymatic reaction is linearly proportional to time and temperature.

## 6.2 Test Procedure

Each run must include a standard curve.

1. Secure the desired number of Microtiter wells in the frame holder.
2. Dispense **50 µL** of each **Standard, control and samples** with new disposable tips into appropriate wells.
3. Dispense **100 µL Enzyme Conjugate** into each well.  
Thoroughly mix for 10 seconds. It is important to have a complete mixing in this step.
4. Incubate for **60 minutes** at room temperature.
5. Briskly shake out the contents of the wells.  
Rinse the wells 5 times with diluted Wash Solution (400 µL per well). Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.

### Important note:

The sensitivity and precision of this assay is markedly influenced by the correct performance of the washing procedure!

6. Add **100 µL** of **Substrate Solution** to each well.
7. Incubate for **20 minutes** at room temperature.
8. Stop the enzymatic reaction by adding **100 µL** of **Stop Solution** to each well.
9. Determine the absorbance (OD) of each well at **450 ± 10 nm** with a microtiter plate reader.  
It is recommended that the wells be read **within 10 minutes** after adding the **Stop Solution**.

## 6.3 Calculation of Results

1. Calculate the average absorbance values for each set of standards, controls and patient samples.
2. Using semi-logarithmic graph paper, construct a standard curve by plotting the mean absorbance obtained from each standard against its concentration with absorbance value on the vertical (Y) axis and concentration on the horizontal (X) axis.
3. Using the mean absorbance value for each sample determine the corresponding concentration from the standard curve.
4. Automated method: The results in the Instructions for Use have been calculated automatically using a 4 Parameter curve fit. (4 Parameter Rodbard or 4 Parameter Marquardt are the preferred methods.) Other data reduction functions may give slightly different results.
5. The concentration of the samples can be read directly from this standard curve. Samples with concentrations higher than that of the highest standard have to be further diluted or reported as > 1440 pg/mL. For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

### 6.3.1 Example of Typical Standard Curve

The following data is for demonstration only and **cannot** be used in place of data generations at the time of assay.

Standard		Optical Units (450 nm)
Standard 0	0 pg/mL	1.85
Standard 1	10 pg/mL	1.56
Standard 2	60 pg/mL	1.28
Standard 3	120 pg/mL	1.14
Standard 4	480 pg/mL	0.77
Standard 5	1440 pg/mL	0.49

## 7 EXPECTED NORMAL VALUES

It is strongly recommended that each laboratory should determine its own normal and abnormal values.

In a study conducted with 198 apparently normal healthy men aged 21 - 75 years and 200 apparently normal healthy women aged 21 - > 60 years, using the DRG Salivary DHEA ELISA the following values are observed:

Age Group [Years]	Men			Women		
	5% - 95% Percentile [pg/mL]	Median [pg/mL]	n	5% - 95% Percentile [pg/mL]	Median [pg/mL]	n
21 - 30	103.9 – 578.3	296.3	40	82.5 – 496.1	206.3	40
31 - 40	116.2 – 471.8	202.7	38	75.4 – 328.5	175.4	40
41 - 50	109.1 – 475.3	187.8	40	54.4 – 412.0	121.5	40
51 - 60	86.1 – 488.0	134.0	40	43.8 – 236.1	95.4	40
60 - 75	41.8 – 184.3	98.1	40	33.8 – 229.7	89.4	40

The results alone should not be the only reason for any therapeutic consequences. The results should be correlated to other clinical observations and diagnostic tests.

## 8 QUALITY CONTROL

Good laboratory practice requires that controls be run with each calibration curve. A statistically significant number of controls should be assayed to establish mean values and acceptable ranges to assure proper performance.

It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results. Use controls at both normal and pathological levels.

The controls and the corresponding results of the QC-Laboratory are stated in the QC certificate added to the kit. The values and ranges stated on the QC sheet always refer to the current kit lot and should be used for direct comparison of the results.

It is also recommended to make use of national or international Quality Assessment programs in order to ensure the accuracy of the results.

Employ appropriate statistical methods for analysing control values and trends. If the results of the assay do not fit to the established acceptable ranges of control materials patient results should be considered invalid.

In this case, please check the following technical areas: Pipetting and timing devices; photometer, expiration dates of reagents, storage and incubation conditions, aspiration and washing methods.

After checking the above mentioned items without finding any error contact your distributor or DRG directly.

## 9 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### 9.1 Assay Dynamic Range

The range of the assay is between 2.2 – 1440 pg/mL.

### 9.2 Specificity of Antibodies (Cross Reactivity)

The following materials have been evaluated for cross reactivity.

Steroid	% Cross reactivity
DHEA	100
17-OH Pregnenolone	0.072
Androsterone	0.056
Desoxycorticosterone	0.052
Progesterone	0.23
Pregnenolone	0.013
11-Desoxycortisol	0.012
Corticosterone	0.004
DHEA-S	0.0037
Testosterone	0.002

Steroid	% Cross reactivity
5- $\alpha$ Dihydrotestosterone	0.0007
Cortisol	0.0007
17 $\alpha$ -Hydroxyprogesterone	0.0004
Aldosterone	0.0003
Estradiol 17 $\beta$	n.d.
Estradiol 17 $\alpha$	n.d.
Estrone	n.d.
Estriol	n.d.

\* n.d. = non detectable



### 9.3 Sensitivity

The analytical sensitivity of the DRG Salivary DHEA ELISA was calculated by subtracting 2 standard deviations from the mean of twenty (20) replicate analyses of *Standard 0* ( $S_0$ ).

The analytical sensitivity of the assay is 2.2 pg/mL.

The functional sensitivity of the DRG Salivary DHEA ELISA was determined by repeated measurements of two saliva samples.

The functional sensitivity of the assay is 5.6 pg/mL.

### 9.4 Reproducibility

#### 9.4.1 Intra-Assay

The intra-assay (within-run) variation of the DRG Salivary DHEA ELISA was determined by repeated measurements of four saliva samples.

Sample	1	2	3	4
Mean (pg/mL)	66.4	318.6	150.4	31.4
SD (pg/mL)	4.4	18.1	3.5	2.5
CV (%)	6.6	5.7	2.3	8.0
n	20	20	20	20

#### 9.4.2 Inter-Assay (Between-Run)

The inter-assay (between-run) variation was determined by repeated measurements of five saliva samples in duplicates in 10 different runs.

Sample	1	2	3	4	5
Mean (pg/mL)	239.9	71.7	48.9	65.9	98.8
SD (pg/mL)	8.2	3.0	2.3	3.0	4.1
CV (%)	3.4	4.2	4.7	4.5	4.2
n	20	20	20	20	20

#### 9.4.3 Inter-Assay (Between-Lot)

The inter-assay (between-lot) variation was determined by duplicate measurements of five saliva samples in three different kit lots.

Sample	1	2	3	4	5
Mean (pg/mL)	56.9	104.9	241.6	80.4	112.8
SD (pg/mL)	3.2	3.3	12.2	3.3	4.0
CV (%)	5.6	3.1	5.0	4.2	3.6
n	18	18	18	18	18

### 9.5 Recovery

Recovery of the DRG ELISA was determined by adding increasing amounts of the analyte to three different saliva samples containing different amounts of endogenous analyte. Each sample (native and spiked) was assayed and analyte concentrations of the samples were calculated from the standard curve. The percentage recoveries were determined by comparing expected and measured values of the samples

Sample	1	2	3
Concentration [pg/mL]	136.3	370.9	477.6
Average Recovery	103.3	103.5	104.2
Range of Recovery [%]	from	98.8	96.2
	to	108.2	108.3

## 9.6 Linearity

Three saliva samples containing different amounts of analyte were serially diluted with zero standard and assayed with the DRG ELISA. The percentage recovery was calculated by comparing the expected and measured values.

Sample	1	2	3
Concentration [pg/mL]	590.4	276.3	90.8
Average Recovery	95.4	101.1	91.6
Range of Recovery [%]	from	92.0	95.5
	to	99.2	106.6

## 10 LIMITATIONS OF USE

Reliable and reproducible results will be obtained when the assay procedure is performed with a complete understanding of the package insert instruction and with adherence to good laboratory practice.

Any improper handling of samples or modification of this test might influence the results.

### 10.1 Interfering Substances

Blood contamination of more than 0.04% in saliva samples will affect results,

Concentrations of sodium azide  $\geq$  0.02% interferes in this assay and may lead to false results.

### 10.2 Drug Interferences

Until today no substances (drugs) are known to us, which have an influence to the measurement of DHEA in a sample.

### 10.3 High-Dose-Hook Effect

No hook effect was observed in this test

## 11 LEGAL ASPECTS

### 11.1 Reliability of Results

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable national standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test.

The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications. In case of any doubt or concern please contact DRG.

### 11.2 Therapeutic Consequences

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as stated under point 11.1. Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of a patient.

Only in cases where the laboratory results are in acceptable agreement with the overall clinical picture of the patient should therapeutic consequences be derived.

The test result itself should never be the sole determinant for deriving any therapeutic consequences.

### 11.3 Liability

Any modification of the test kit and/or exchange or mixture of any components of different lots from one test kit to another could negatively affect the intended results and validity of the overall test. Such modification and/or exchanges invalidate any claim for replacement.

Claims submitted due to customer misinterpretation of laboratory results subject to point 11.2. are also invalid.

Regardless, in the event of any claim, the manufacturer's liability is not to exceed the value of the test kit. Any damage caused to the test kit during transportation is not subject to the liability of the manufacturer.

## 12 REFERENCES / LITERATURE

## 1 EINLEITUNG

Der **DRG Salivary DHEA ELISA** wird zur quantitativen Bestimmung von Dehydroepiandrosteron (DHEA) in Speichel eingesetzt.

**Nur für In-vitro Diagnostik.**

## 2 TESTPRINZIP

Der DRG Salivary DHEA ELISA ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay, der auf dem Prinzip der kompetitiven Bindung basiert.

Die Wells der Mikrotiterplatten sind mit einem polyklonalen Antikörper beschichtet, der gegen eine Antikörper-Bindungsstelle des DHEA-Moleküls gerichtet ist.

Die Proben werden in die beschichteten Wells gegeben und zusammen mit einem DHEA-Enzymkonjugat inkubiert. Während der Inkubation konkurriert das DHEA aus der Probe mit dem DHEA-Enzymkonjugat um die freien Bindungsstellen auf den beschichteten Wells.

Das nicht gebundene Konjugat wird durch Waschen der Wells entfernt. Anschließend wird die Substratlösung zugegeben und die Farbentwicklung nach einer definierten Zeit gestoppt.

Die Intensität der gebildeten Farbe ist umgekehrt proportional der DHEA-Konzentration in der Probe. Die Extinktion wird bei 450 nm mit einem Mikrotiterplattenleser gemessen.

## 3 VORSICHTSMAßNAHMEN

- Dieser Kit ist nur zum in vitro diagnostischen Gebrauch geeignet.
- Nur die gültige, im Testkit enthaltene, Arbeitsanleitung verwenden.
- Informationen zu im Kit enthaltenen gefährlichen Substanzen entnehmen Sie bitte dem Materialsicherheitsdatenblatt.
- Alle Bestandteile dieses Testkits, die humanes Serum oder Plasma enthalten, wurden mit FDA-geprüften Methoden auf HIV I/II, HbsAg und HCV getestet und als negativ bestätigt. Jedoch sollten alle Bestandteile im Umgang und bei der Entsorgung wie mögliche Gefahrenstoffe betrachtet werden.
- Der Kontakt mit der *Stop Solution* sollte vermieden werden, da sie 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> enthält. Schwefelsäure kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
- Nicht mit dem Mund pipettieren und den Kontakt von Kitbestandteilen und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
- In den Bereichen, in denen Proben oder Kitbestandteile verwendet werden, nicht rauchen, essen oder Kosmetika verwenden.
- Beim Umgang mit Proben oder Reagenzien Einweg-Latexhandschuhe tragen. Die Verunreinigung von Reagenzien oder Proben mit Mikroben kann zu falschen Ergebnissen führen.
- Der Gebrauch sollte gemäß der Vorschriften einer entsprechenden nationalen Gefahrenstoff-Sicherheitsrichtlinie erfolgen.
- Reagenzien nicht nach dem auf dem Kit-Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.
- Alle im Kit-Protokoll angegebenen Mengen müssen genau eingehalten werden. Optimale Ergebnisse können nur durch Verwendung kalibrierter Pipetten und Mikrotiterplatten-Lesegeräte erreicht werden.
- Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Lotnummern nicht untereinander vertauschen. Es wird empfohlen, keine Wells von verschiedenen Platten zu verwenden, auch nicht, wenn es sich um das gleiche Lot handelt. Die Kits können unter anderen Bedingungen gelagert oder versendet worden sein, so dass die Bindungscharakteristik der Platten leicht unterschiedlich ausfällt.
- Chemikalien und zubereitete oder bereits benutzte Reagenzien müssen gemäß den nationalen Gefahrenstoffvorschriften wie gefährlicher Abfall behandelt werden.
- Sicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt von der Firma DRG Instruments GmbH erhältlich.

## 4 BESTANDTEILE DES KITS

### 4.1 Kitinhalt

1. **Microtiterwells**, 96 Wells, 12x8 Wells (einzeln brechbar); mit anti-DHEA-Antikörper (polyklonal) beschichtet.
2. **Standard (Standard 0-5)**, 6 Fläschchen, je 1 mL, gebrauchsfertig; Konzentrationen: 0 – 10.0 – 60.0 – 120.0 - 480.0 - 1440.0 pg/mL Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
3. **Control Low und High** (Kontrolle), 2 Fläschchen, je 1,0 mL; gebrauchsfertig Kontrollwerte und –bereiche entnehmen Sie bitte dem Fläschchenetikett oder dem QC-Datenblatt. Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
4. **Enzyme Conjugate** (Enzymkonjugat), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig; DHEA mit Meerrettichperoxidase konjugiert. Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
5. **Substrate Solution** (Substratlösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig; Substratlösung TMB.
6. **Stop Solution** (Stopplösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig; Enthält 0,5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Kontakt mit der Stopplösung vermeiden! Kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
7. **Wash Solution** (Waschlösung), **40X** konzentriert, 1 Fläschchen, 30 mL; Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.

**Anmerkung:** Zusätzlicher *Standard 0* zur Probenverdünnung ist auf Anfrage erhältlich.

### 4.2 Nicht im Kit enthaltene aber erforderliche Geräte und Materialien

- Kalibriertes Mikrotiterplattenlesegerät mit 450±10 nm Filter), (z.B. das DRG Instruments Mikrotiterplattenlesegerät)
- Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipette
- Saugfähiges Papier
- Aqua dest.
- Semilogarithmisches Papier

### 4.3 Lagerung und Haltbarkeit des Kits

Die ungeöffneten Reagenzien behalten bei Lagerung um 2 °C - 8 °C ihre Reaktivität bis zum Verfallsdatum. Nach dem Verfallsdatum die Reagenzien nicht mehr verwenden.

Nach dem Öffnen sollten alle Reagenzien bei 2 °C - 8 °C gelagert werden. Die Mikrotiterwells sollten bei 2 °C - 8 °C gelagert werden. Der einmal geöffnete Folienbeutel sollte stets sehr sorgfältig wieder verschlossen werden. Unter den beschriebenen Lagerbedingungen behalten geöffnete Kits 8 Wochen ihre Reaktivität.

### 4.4 Vorbereitung der Reagenzien

Alle Reagenzien sowie die benötigte Anzahl von Wells sollen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht werden.

#### **Wash Solution**

Die 40-fach konzentrierte Waschlösung (30 mL) mit 1170 mL destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1200 mL verdünnen. *Die verdünnte Waschlösung ist bei Raumtemperatur für 2 Wochen stabil.*

### 4.5 Entsorgung des Kits

Die Entsorgung des Kits muss gemäß den nationalen gesetzlichen Vorschriften erfolgen. Spezielle Informationen für dieses Produkt finden Sie im Sicherheitsdatenblatt, Kapitel 13.

### 4.6 Beschädigte Testkits

Im Falle einer starken Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss die Firma DRG in schriftlicher Form spätestens eine Woche nach Erhalt des Kits informiert werden. Stark beschädigte Einzelkomponenten sollten nicht für den Testlauf verwendet werden. Sie müssen gelagert werden bis eine endgültige Lösung gefunden wurde. Danach sollten Sie gemäß den offiziellen Richtlinien entsorgt werden.

## 5 PROBENVORBEREITUNG

Speichelproben werden in diesem Test als Probenmaterial eingesetzt.

Der Patient sollte vor der Probenahme 30 Minuten nicht essen, trinken, Kaugummi kauen oder Zähne putzen. Andernfalls 5 Minuten vor der Probenahme den Mund gründlich mit kaltem Wasser spülen.

Speichelproben sollten nicht bei Krankheiten, Entzündungen oder Verletzungen der Mundhöhle entnommen werden (Blutkontamination).

Im Falle einer sichtbaren Kontamination mit Blut sollte die Probe verworfen werden. Das Probenbesteck wird mit Wasser gewaschen und nach 10 Minuten kann eine neue Probe genommen werden.

*Achtung:* Proben, die Natriumazid enthalten, sollten nicht verwendet werden.

### 5.1 Probenentnahme

Wir empfehlen Speichelproben mit einem kommerziell verfügbaren Besteck zu sammeln (z.B. SALI TUBES 100, REF SLV-4158 erhältlich bei DRG).

Bitte verwenden sie kein Besteck mit Baumwolle, wie z.B. Salivetten, dies führt zu falsch erhöhten Werten.

Da die Steroidhormone ein deutliches zyklisches Sekretionsmuster zeigen, ist es wichtig auf den richtigen Zeitpunkt der Probenentnahme zu achten.

Um arbiträre (willkürliche) Ergebnisse zu vermeiden, empfehlen wir 5 Proben in einem Zeitraum von 2 bis 3 Stunden zu sammeln (mehrfache Probeentnahme). Dies sollte vorzugsweise vor einer Mahlzeit durchgeführt werden.

Da Lebensmittel eine bedeutende Menge an Steroidhormonen enthalten können, sollten die Proben möglichst nüchtern entnommen werden. Ist dies nicht möglich, sollte die Sammelperiode auf jeden Fall vor einer Mahlzeit liegen.

### 5.2 Probenaufbewahrung

Proben sollten stets gut verschlossen sein und können vor Testbeginn bis zu 1 Woche bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden. Für eine längere Aufbewahrung sollten die Proben eingefroren bei -20 °C bis zum Testbeginn gelagert werden. Mehrfaches Auftauen und erneutes Einfrieren ist möglich.

Um Muzine aus der Probe zu entfernen, muss jede Probe mindestens einmal eingefroren und aufgetaut und anschließend zentrifugiert werden.

Nach der Ankunft im Labor muss eine Probe mindestens über Nacht tiefgekühlt gelagert werden. Am nächsten Morgen wird die eingefrorene Probe auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig gemischt. Dann muss die Probe 5 bis 10 Minuten zentrifugiert werden (bei 3000 – 2000 x g).

Der klare, farblose Überstand kann jetzt einfach pipettiert werden.

Wird ein solches Set an Mehrfach-Proben getestet (nach mindestens einem Einfrier- Auftau- und Zentrifugationszyklus) muss im Labor in einem separaten Probengefäß eine Mischprobe aus Aliquots aller 5 Einzelproben hergestellt werden. Diese Mischprobe wird im Test eingesetzt.

### 5.3 Probenverdünnung

Wenn in einem ersten Testdurchlauf bei einer Probe eine Konzentration höher als der höchste Standard gefunden wird, kann diese Probe mit *Standard 0* weiter verdünnt und nochmals bestimmt werden. Die Verdünnung muss jedoch bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

Beispiel:

a) Verdünnung 1:10: 10 µL Speichel + 90 µL *Standard 0* gründlich mischen)

b) Verdünnung 1:100: 10 µL Verdünnung a) 1:10 + 90 µL *Standard 0* (gründlich mischen).

## 6 TESTDURCHFÜHRUNG

### 6.1 Allgemeine Hinweise

Alle Reagenzien und Proben müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht und gut durchmischt werden. Dabei sollte Schaumbildung vermieden werden.

Wenn die Testdurchführung einmal begonnen wurde, muss sie ohne Unterbrechung zu Ende geführt werden.

Für jeden Standard, jede Kontrolle oder Probe eine neue Plastikspitze verwenden, um Verschleppungen zu vermeiden.

Die Optische Dichte ist abhängig von Inkubationszeit und Temperatur. Deshalb ist es notwendig, vor Beginn der Testdurchführung alle Reagenzien in einen arbeitsbereiten Zustand zu bringen, die Deckel der Fläschchen zu öffnen, alle benötigten Wells in den Halter zu setzen. Nur eine solche Vorbereitung garantiert gleiche Zeiten für jeden Pipettiervorgang ohne Pausen.

Als generelle Regel gilt, dass die enzymatische Reaktion linear proportional zu Zeit und Temperatur ist.

### 6.2 Testdurchführung

Jeder Lauf muss eine Standardkurve beinhalten.

1. Die benötigte Anzahl Wells in der Halterung befestigen.
2. **Je 50 µL Standards, Control** und Proben mit neuen Plastikspitzen in die entsprechenden Wells geben.
3. **100 µL Enzyme Conjugate** in jedes Well geben.  
Für 10 Sekunden gut schütteln. Es ist sehr wichtig, in diesem Schritt eine komplette Durchmischung zu erreichen.
4. **60 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
5. Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln. Wells **5-mal** mit verdünnter Waschlösung waschen. Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Wells auf saugfähigem Papier entfernen.  
**Achtung:** Die Sensitivität und Präzision dieses Assays wird erheblich beeinflusst von der korrekten Durchführung des Waschschrilles!
6. **100 µL Substrate Solution** in jedes Well geben.
7. **20 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
8. Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von **100 µL Stop Solution** in jedes Well abstoppen.
9. Die Optische Dichte bei **450±10 nm** mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät innerhalb von **10 Minuten** nach Zugabe der **Stop Solution** bestimmen.

### 6.3 Ergebnisermittlung

1. Die durchschnittlichen Werte der Optischen Dichte (OD) für jedes Set von Standards, Controls und Patientenproben bestimmen.
2. Eine Standardkurve ermitteln durch Auftragen der mittleren Optischen Dichte jedes Standards gegen die Konzentration, wobei der OD-Wert auf der vertikalen (Y) Achse und die Konzentration auf der horizontalen (X) Achse eingetragen wird.
3. Unter Verwendung der mittleren OD wird für jede Probe die entsprechende Konzentration aus der Standardkurve ermittelt.
4. Automatische Methode: Die in der Gebrauchsanweisung angegebenen Werte wurden automatisch mit Hilfe der 4 Parameter-Gleichung bestimmt. (4 Parameter Rodbard oder 4 Parameter Marquardt sind die bevorzugten Methoden.) Andere Auswertungsfunktionen können leicht abweichende Werte ergeben.
5. Die Konzentration der Proben kann direkt von der Standardkurve abgelesen werden. Proben, die eine höhere Konzentration als die des höchsten Standards enthalten, müssen verdünnt werden. Dieser Verdünnungsfaktor muss bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

#### 6.3.1 Beispiel für eine Standardkurve

Nachfolgend wird ein typisches Beispiel für eine Standardkurve mit dem DRG ELISA gezeigt. Diese Werte sollten nicht zur Berechnung von Patientendaten verwendet werden.

Standard		Optische Dichte (450 nm)
Standard 0	0 pg/mL	1,85
Standard 1	10 pg/mL	1,56
Standard 2	60 pg/mL	1,28
Standard 3	120 pg/mL	1,14
Standard 4	480 pg/mL	0,77
Standard 5	1440 pg/mL	0,49

## 7 ERWARTETE WERTE

Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen normalen und abnormalen Werte ermittelt.

In einer Studie ergaben sich mit dem DRG Salivary DHEA ELISA folgende Werte:

Alter [Jahre]	Männer			Frauen		
	5% - 95% Perzentile [pg/mL]	Median [pg/mL]	n	5% - 95% Perzentile [pg/mL]	Median [pg/mL]	n
21 - 30	103,9 – 578,3	296,3	40	82,5 – 496,1	206,3	40
31 - 40	116,2 – 471,8	202,7	38	75,4 – 328,5	175,4	40
41 - 50	109,1 – 475,3	187,8	40	54,4 – 412,0	121,5	40
51 - 60	86,1 – 488,0	134,0	40	43,8 – 236,1	95,4	40

## 8 QUALITÄTS-KONTROLLE

Es wird empfohlen, die Kontrollproben gemäß den nationalen gesetzlichen Bestimmungen einzusetzen. Durch die Verwendung von Kontrollproben wird eine Tag-zu-Tag Überprüfung der Ergebnisse erzielt. Es sollten Kontrollen sowohl mit normalem als auch pathologischem Level eingesetzt werden.

Die Kontrollen mit den entsprechenden Ergebnissen des QC-Labors sind im QC-Zertifikat, das dem Kit beiliegt, aufgeführt. Die im QC-Blatt angegebenen Werte und Bereiche beziehen sich stets auf die aktuelle Kitcharge und sollten zum direkten Vergleich der Ergebnisse verwendet werden.

Es sollten geeignete statistische Methoden zur Analyse von Kontroll-Werten und Trends angewendet werden. Wenn die Ergebnisse des Assays nicht mit den angegebenen Akzeptanzbereichen des Kontrollmaterials übereinstimmen, sollten die Patientenergebnisse als ungünstig eingestuft werden.

In diesem Fall überprüfen Sie bitte die folgenden Bereiche: Pipetten und Zeitnehmer, Photometer, Verfallsdatum der Reagenzien, Lagerungs- und Inkubationsbedingungen, Absaug- und Waschmethode.

Sollten Sie nach Überprüfung der vorgenannten Bereiche keinen Fehler erkannt haben, setzen Sie sich bitte mit Ihrem Lieferanten oder direkt mit der Firma DRG in Verbindung.

## 9 ASSAY CHARACTERISTIKA

### 9.1 Messbereich

Der Messbereich des Testes liegt zwischen 2,2 – 1440 pg/mL.

### 9.2 Spezifität der Antikörper (Kreuzreaktivität)

Die Daten entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

### 9.3 Sensitivität

Die analytische Sensitivität, definiert als Mittelwert minus der zweifachen Standardabweichung des Standards 0 (n = 20), beträgt 2,2 pg/mL.

Die funktionelle Sensitivität des Assays beträgt 5,6 pg/mL.

Die Daten zu:

### 9.4 Präzision

### 9.5 Wiederfindung

### 9.6 Linearität

entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

## 10 GRENZEN DES TESTS

Jede unsachgemäße Behandlung von Proben oder Modifikationen dieses Tests können die Ergebnisse beeinflussen.

### 10.1 Interferenzen

Eine Kontamination der Speichelproben mit Blut von mehr als 0,04 % beeinflusst das Ergebnis.

Konzentrationen von Natriumazid ab 0,02 % beeinflussen den Test und können zu falschen Ergebnissen führen.

### 10.2 Beeinflussung durch Medikamente

Uns sind bislang keine Stoffe (Medikamente) bekannt geworden, deren Einnahme die Messung des DHEA-Gehaltes der Probe beeinflussen würde.

### 10.3 High-Dose-Hook-Effekt

Ein Hook-Effekt tritt in diesem Test nicht auf.

## 11 RECHTLICHE GRUNDLAGEN

### 11.1 Zuverlässigkeit der Ergebnisse

Der Test muss exakt gemäß der Testanleitung des Herstellers abgearbeitet werden. Darüber hinaus muss der Benutzer sich strikt an die Regeln der GLP (Good Laboratory Practice) oder andere eventuell anzuwendende Regeln oder nationale gesetzliche Vorgaben halten. Dies betrifft besonders den Gebrauch der Kontrollreagenzien. Es ist sehr wichtig, bei der Testdurchführung stets eine ausreichende Anzahl Kontrollen zur Überprüfung der Genauigkeit und Präzision mitlaufen zu lassen.

Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn alle Kontrollen in den vorgegebenen Bereichen liegen, und wenn alle anderen Testparameter die vorgegebenen Spezifikationen für diesen Assay erfüllen. Wenn Sie bezüglich eines Ergebnisses Zweifel oder Bedenken haben, setzen Sie sich bitte mit der Firma DRG in Verbindung.

### 11.2 Therapeutische Konsequenzen

Therapeutische Konsequenzen sollten keinesfalls nur aufgrund von Laborergebnissen erfolgen, selbst dann nicht, wenn alle Testergebnisse mit den in 11.1. genannten Voraussetzungen übereinstimmen. Jedes Laborergebnis ist nur ein Teil des klinischen Gesamtbildes eines Patienten.

Nur in Fällen, in denen die Laborergebnisse in akzeptabler Übereinstimmung mit dem allgemeinen klinischen Bild des Patienten stehen, sollten therapeutische Konsequenzen eingeleitet werden.

Das Testergebnis allein sollte niemals als alleinige Grundlage für die Einleitung therapeutischer Konsequenzen dienen.

### 11.3 Haftung

Jegliche Veränderungen des Testkits und/oder Austausch oder Vermischung von Komponenten unterschiedlicher Chargen von einem Testkit zu einem anderen, können die gewünschten Ergebnisse und die Gültigkeit des gesamten Tests negativ beeinflussen. Solche Veränderungen und/oder Austausch haben den Ausschluss jeglicher Ersatzansprüche zur Folge.

Reklamationen, die aufgrund von Falschinterpretation von Laborergebnissen durch den Kunden gemäß Punkt 11.2. erfolgen, sind ebenfalls abzuweisen. Im Falle jeglicher Reklamation ist die Haftung des Herstellers maximal auf den Wert des Testkits beschränkt. Jegliche Schäden, die während des Transports am Kit entstanden sind, unterliegen nicht der Haftung des Herstellers.

## 12 REFERENZEN / LITERATUR

Angaben zu den Referenzen entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.



## 1 INTRODUCCIÓN

El Kit de inmunoensayo enzimático DRG Salivary DHEA proporciona los materiales necesarios para la determinación cuantitativa del DHEA (Dehidroepiandrosterona) en muestras de saliva.

**Este ensayo está diseñado solo para diagnóstico *in vitro*.**

## 2 FUNDAMENTO DEL ENSAYO

El Kit DRG Salivary DHEA ELISA es un ensayo en fase sólida de inmunoadsorción unido a enzimas (ELISA), basado en el principio de unión competitiva.

Los pocillos de las placas están recubiertos con un anticuerpo policlonal dirigido contra un foci antigénico en la molécula DHEA. En las muestras de los pacientes DHEA compete con un conjugado DHEA -peroxidasa de rábano en la unión al anticuerpo inmovilizado. Después de la incubación el conjugado no unido se lava.

La cantidad de conjugado de peroxidasa unido es inversamente proporcional a la concentración de DHEA en la muestra. Después de la adición de la solución sustrato, la intensidad de color desarrollado es inversamente proporcional a la concentración de DHEA en la muestra del paciente.

## 3 PRECAUCIONES

- Este kit es solamente para diagnóstico *in vitro*.
- Por favor, se usa solo la versión válida de la metodología técnica incluido aquí en el kit.
- Para obtener información de las sustancias peligrosas incluidas en el kit por favor mirar las hojas de los datos de seguridad del material.
- Todos los reactivos en este kit de ensayo que contienen suero o plasma humano se han ensayado y confirmado ser negativos para HIV I/II, HBsAg y HCV mediante procedimientos aprobados por la FDA. Sin embargo, todos los reactivos deben ser tratados tanto en su uso como dispensación como potencialmente biopeligrosos.
- Evitar contacto con *Stop Solution* que contiene H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M. Puede provocar irritación y quemaduras en la piel.
- Nunca pipetear con la boca y evitar el contacto de los reactivos y las muestras con la piel y con membranas mucosas.
- No fumar, comer, beber o usar cosméticos en áreas donde las muestras o los reactivos del kit están siendo usados.
- Usar guantes de látex cuando se utilicen las muestras y los reactivos. La contaminación microbiana de los reactivos o las muestras puede dar resultados erróneos.
- El manejo debe realizarse de acuerdo a los procedimientos definidos por las guías o regulación nacionales de seguridad de sustancias biopeligrosas.
- No utilizar los reactivos después de su fecha de caducidad que aparece en las etiquetas del kit.
- Todos los volúmenes indicados han de ser realizados de acuerdo con el protocolo. Los resultados óptimos del ensayo se obtienen solo cuando se utilizan pipetas y lectores de microplacas calibrados.
- No mezclar o usar componentes de kits con distinto número de lote. Se recomienda no intercambiar pocillos de distintas placas incluso si son del mismo lote. Los kits pueden haber sido enviados o almacenados bajo diferentes condiciones y las características de unión de las placas pueden resultar diferentes.
- Los compuestos químicos y los reactivos preparados o utilizados han de tratarse como residuos peligrosos de acuerdo con las guías o regulación nacionales de seguridad de sustancias biopeligrosas.
- Las hojas de los datos de seguridad de este producto están disponibles bajo pedido directamente a DRG Instruments GmbH.

## 4 COMPONENTES DEL KIT

### 4.1 Componentes del Kit

1. **Microtiterwells** (Placas multipocillo), 12x8 tiras separables, 96 pocillos; Pocillos recubiertos con anticuerpo anti- DHEA (policlonal).
2. **Standard (Standard 0-5)**, (Estándar), 6 viales, 1 mL, listo para usar; Concentraciones: 0 – 10.0 – 60.0 – 120.0 - 480.0 - 1440.0 pg/mL. Contiene conservante.
3. **Control Low & High**, 2 viales, 1,0 mL, listo para usar; Referir los valores y rangos del control a la etiqueta del vial o a la Hoja de datos QC. Contiene conservante.
4. **Enzyme Conjugate** (Conjugado enzimático), 1 vial, 14 mL, listo para usar, DHEA conjugado con la Peroxidasa de rábano; Contiene conservante.
5. **Substrate Solution** (Solución de sustrato), 1 vial, 14 mL, listo para usar, Tetrametilbencidina (TMB).
6. **Stop Solution** (Solución de parada), 1 vial, 14 mL, listo para usar, contiene 0.5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Evitar el contacto con la Solución de parada. Puede causar irritación y quemaduras en la piel.
7. **Wash Solution** (Solución de lavado), 1 vial, 30 mL (concentrado 40X), ver "Preparación de los Reactivos".

**Nota:** Se puede solicitar el *Standard 0* para la dilución de la muestra.

### 4.2 Equipamiento y material requerido pero no provisto

- Lector de microplacas calibrado (450 ±10 nm) (ej. DRG Instruments Microtiter Plate Reader).
- Micropipetas de precisión variable calibradas.
- Papel absorbente.
- Agua destilada.

### 4.3 Almacenamiento y estabilidad del kit

Cuando se almacena a 2 °C - 8 °C, los reactivos sin abrir mantienen su reactividad hasta la fecha de caducidad. No utilizar los reactivos más allá de esta fecha.

Los reactivos abiertos han de almacenarse a 2 °C - 8 °C. Las placas multipocillo han de almacenarse a 2 °C - 8 °C. Una vez se ha abierto la bolsa hay que tener cuidado y cerrarla de nuevo.

Los kits abiertos conservan su actividad durante 8 semanas si se almacenan como se ha descrito arriba.

### 4.4 Preparación de los Reactivos

Dejar que todos los reactivos y el número requerido de tiras alcancen la temperatura ambiente antes de usarse.

#### **Wash Solution**

Mezclar 30 mL de *Wash Solution* concentrada con 1170 mL de agua desionizada hasta un volumen final de 1200 mL. *La solución del lavado diluida es estable durante 2 semanas a temperatura ambiente.*

### 4.5 Eliminación del Kit

La eliminación del kit debe realizarse de acuerdo con las leyes nacionales. En las hojas de datos de seguridad se proporciona información especial de este producto (ver capítulo 13).

### 4.6 Kits de ensayo dañados

En caso de que exista cualquier daño severo del kit de ensayo o de sus componentes, ha de informarse por escrito a DRG, no más tarde de una semana después de recibir el kit. No deben utilizarse componentes dañados para llevar a cabo un ensayo. Han de almacenarse hasta que se encuentre una solución. Después de esto, deben ser eliminados de acuerdo con las leyes oficiales.

## 5 RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Evitar: comer, beber, tomar chicles o limpiarse los dientes, al menos 30 minutos antes de la recogida de la muestra. Por el contrario, se recomienda enjuagarse la boca a fondo con agua fría 5 minutos antes de la recogida de la muestra. No recoger muestras cuando hay enfermedades bucales, inflamación o lesiones (contaminación por sangre) de la boca. Si existe una contaminación por sangre visible en la muestra del paciente, ésta debe ser descartada, enjuagar el aparato de recogida de muestra con agua, esperar 10 minutos y recoger una nueva muestra.

*Nota:* No deben utilizarse muestras que contengan acida sódica.

### 5.1 Recogida de la muestra

Las muestras de saliva han de ser recogidas solamente utilizando aparatos especiales para recogida de muestras de saliva (vial y pajita), Ej. SALI-TUBES 100 (SLV-4158).

No utilizar hisopo de algodón (ej. Salivette) para recogida de muestra. Esto puede llevar a resultados artificialmente altos.

Debido al patrón de secreción cíclica de las hormonas esteroideas, es importante preocuparse por una recogida coordinada.

Para evitar resultados arbitrarios recomendamos la recogida de 5 muestras siempre en un período de 2 - 3 horas (*recogida múltiple*) preferentemente antes de una comida.

Debido a que la comida puede contener una cantidad significativa de hormonas esteroideas, las muestras han de recogerse preferentemente en ayuno. Si el ayuno fuera un problema, el período de recogida debe ser coordinado justo antes de comer o de cenar.

### 5.2 Almacenamiento y Preparación de la muestra

Las muestras de saliva han de almacenarse entre 2 °C - 8 °C hasta una semana, y deben congelarse a -20°C para períodos superiores; no es un problema el descongelado y congelado repetido.

Cada muestra ha de ser congelada, descongelada y centrifugada al menos una vez para separar las mucinas por centrifugación.

Cuando llegan las muestras al laboratorio, estas han de permanecer en el congelador al menos durante una noche. A la mañana siguiente las muestras congeladas se calientan hasta temperatura ambiente y se mezclan cuidadosamente.

Entonces, las muestras han de ser centrifugadas de 5 a 10 minutos (a 3000 - 2000 x g).

Ahora el sobrenadante incoloro es fácil de pipetear.

Si se ha de ensayar un conjunto de múltiples muestras, se han de mezclar (al menos con un ciclo de congelado, descongelado y centrifugación) una mezcla de 5 muestras a parte y realizar el ensayo de esta mezcla.

### 5.3 Dilución de las muestras

Si en un ensayo inicial, se encuentra una muestra que presenta valores mayores que el estándar mas concentrado, ha de diluirse con *Standard 0* y volver a ensayarse como se describe en el Procedimiento de Ensayo.

Para el cálculo de las concentraciones habrá que tener en cuenta el factor de dilución.

Ejemplo:

a) dilución 1:10: 10 µL saliva + 90 µL *Standard 0* (mezclar totalmente)

b) dilución 1:100: 10 µL dilución a) 1:10 + 90 µL *Standard 0* (mezclar totalmente).

## 6 PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

### 6.1 Consideraciones generales

- Todos los reactivos y muestras han de estar a temperatura ambiente antes de su uso. Todos los reactivos deben mezclarse sin formar espuma.
- Una vez se ha comenzado el ensayo deben completarse todos los pasos sin interrupción.
- Utilizar puntas de pipeta de plástico nuevas para cada estándar, control o muestra para evitar combinaciones cruzadas.
- La absorbancia es función del tiempo de incubación y la temperatura. Antes de comenzar el ensayo, se recomienda que todos los reactivos estén preparados, tapas removidas, todos los pocillos que se necesiten asegurados en recipiente, etc. Esto asegurará un tiempo similar para cada paso de pipeteo sin que haya interrupciones.
- Como regla general, la reacción enzimática es linealmente proporcional al tiempo y a la temperatura.

## 6.2 Procedimiento de ensayo

Cada uno debe incluir una curva de estándares.

1. Asegurar el número deseado de pocillos en el recipiente.
2. Dispensar **50 µL** de cada *Standard*, *Control* y muestras con puntas nuevas en los pocillos adecuados.
3. Dispensar **100 µL** de *Enzyme Conjugate* a cada pocillo.  
Mezclar totalmente durante 10 segundos. Es importante mezclar completamente en este paso.
4. Incubar durante **60 minutos** a temperatura ambiente.
5. Sacudir enérgicamente el contenido de los pocillos.  
Lavar los pocillos 5 veces con *Wash Solution* diluida (400 µL por pocillo). Realizar un golpe seco de los pocillos contra el papel absorbente para eliminar las gotas residuales.  
**Nota importante:**  
La sensibilidad y la precisión de este ensayo se ve marcadamente influenciada por la realización correcta del proceso de lavado!
6. Adicionar **100 µL** de *Substrate Solution* a cada pocillo.
7. Incubar durante **20 minutos** a temperatura ambiente.
8. Parar la reacción enzimática mediante la adición de **100 µL** de *Stop Solution* a cada pocillo.
9. Leer la OD a **450±10 nm** con un lector de microplacas **dentro de los 10 minutos** después de la adición de la *Stop Solution*.

## 6.3 Cálculo de los Resultados

1. Calcular los valores de absorbancia media para cada conjunto de estándares, controles y muestras de pacientes.
2. Construir una curva estándar mediante la representación de la absorbancia media obtenida para cada estándar frente a su concentración con el valor de absorbancia en el eje vertical (Y) y la concentración en el eje horizontal (X).
3. Usando el valor de absorbancia media de cada muestra determinar la concentración correspondiente a partir de la curva estándar.
4. Método automatizado: Los resultados en las instrucciones de uso se han calculado automáticamente usando una curva de regresión 4 Parámetros. (4 Parámetros Rodbard o 4 Parámetros Marquardt son los métodos preferidos.) Otras funciones de regresión darán lugar a resultados sensiblemente diferentes.
5. La concentración de la muestra puede leerse directamente de la curva de estándares. Las muestras con concentraciones superiores al mayor estándar han de diluirse. Para el cálculo de las concentraciones hay que tener en cuenta el factor de dilución.

### 6.3.1 Ejemplo de una Curva Estándar Típica

Los siguientes datos son solamente para la explicación y **no** pueden ser utilizados en lugar de los datos generados en el momento del ensayo.

Estándar		Unidades Ópticas (450 nm)
Standard 0	0 pg/mL	1,85
Standard 1	10 pg/mL	1,56
Standard 2	60 pg/mL	1,28
Standard 3	120 pg/mL	1,14
Standard 4	480 pg/mL	0,77
Standard 5	1440 pg/mL	0,49

## 7 VALORES ESPERADOS

Se recomienda encarecidamente que cada laboratorio determine sus valores normales e inusuales.

En un estudio con adultos aparentemente sanos utilizando el DRG Salivary DHEA ELISA se observaron los siguientes valores:

Edad [Años]	Hombres			Mujeres		
	5% - 95% Percentil [pg/mL]	Median [pg/mL]	n	5% - 95% Percentil [pg/mL]	Median [pg/mL]	n
21 - 30	103,9 – 578,3	296,3	40	82,5 – 496,1	206,3	40
31 - 40	116,2 – 471,8	202,7	38	75,4 – 328,5	175,4	40
41 - 50	109,1 – 475,3	187,8	40	54,4 – 412,0	121,5	40
51 - 60	86,1 – 488,0	134,0	40	43,8 – 236,1	95,4	40
60 - 75	41,8 – 184,3	98,1	40	33,8 – 229,7	89,4	40

## 8 CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda usar muestras control de acuerdo con las leyes estatales y federales. El uso de muestras control se recomienda para asegurar la validez diaria de los resultados. Usar controles tanto a niveles normal como patológico. Los controles y los correspondientes resultados del Laboratorio de control de calidad están fijados en el certificado de control de calidad que acompañan al kit. Los valores y los rangos fijados en la hoja del control de calidad se refieren siempre al kit actual y deben usarse para la comparación directa de los resultados.

Es recomendable también hacer uso de programas de Aseguramiento de la Calidad nacionales o internacionales para asegurar la exactitud de los resultados.

Utilizar métodos estadísticos apropiados para el análisis de los valores y tendencia de los controles. Si los resultados del ensayo no se ajustan a los rangos aceptables establecidos en los controles, los resultados obtenidos de los pacientes han de considerarse inválidos.

En este caso, por favor comprobar las siguientes áreas técnicas: Pipeteo y tiempo empleado, fotómetro, fecha de caducidad de los reactivos, condiciones de almacenamiento e incubación, métodos de aspiración y lavado.

Después de comprobar los asuntos mencionados arriba sin encontrar ningún error, contactar con su distribuidor o con DRG directamente.

## 9 CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

### 9.1 Rango dinámico del ensayo

El rango del ensayo se encuentra entre 2,2 – 1440 pg/mL.

### 9.2 Especificidad de los Anticuerpos (Reactividad Cruzada)

Consultar el manual de usuario en inglés.

### 9.3 Sensibilidad Analítica

La sensibilidad analítica se calculó a partir de la media menos dos desviaciones estándar de veinte (20) réplicas del *Estándar 0* y resultó ser 2,2 pg/mL.

### 9.4 Precisión

Consultar el manual de usuario en inglés.

### 9.5 Recuperación

Consultar el manual de usuario en inglés.

### 9.6 Linealidad

Consultar el manual de usuario en inglés.

## 10 LIMITACIONES DE USO

Cualquier manipulación inadecuada de las muestras o modificaciones del ensayo pueden influenciar los resultados.

### 10.1 Sustancias que pueden interferir

Una contaminación con sangre de más de 0,04% en las muestras de saliva afectará los resultados, y puede verse normalmente a simple vista.

Las concentraciones de acida sódica  $\geq 0.02\%$  interfieren en el ensayo y pueden conducir a falsos resultados.

### 10.2 Interferencias con drogas

Hasta ahora no se han encontrado sustancias (drogas) conocidas por nosotros, que tengan influencia en la medida de DHEA en una muestra.

### 10.3 Efecto Gancho-Dosis-Elevada

No se ha observado efecto gancho en este ensayo.

## 11 ASPECTOS LEGALES

### 11.1 Fiabilidad de los Resultados

El ensayo debe realizarse exactamente de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Mas aún, el usuario debe ajustarse estrictamente a las reglas BPL (Buenas Prácticas de Laboratorio) o a otros estándares y/o leyes nacionales aplicables.

Esto es especialmente relevante para el uso de reactivos control. Es importante incluir siempre, dentro del procedimiento de ensayo, un número suficiente de controles para validar la exactitud y la precisión del ensayo.

Los resultados del ensayo son válidos sólo si todos los controles se encuentran dentro de los rangos especificados y si todos los otros parámetros del ensayo se encuentran dentro de las especificaciones dadas para el ensayo. En caso de alguna duda o inquietud, por favor, contactar con DRG.

### 11.2 Consecuencias Terapéuticas

Las consecuencias terapéuticas nunca deben basarse sólo en los resultados de laboratorio incluso si todos los resultados del ensayo están de acuerdo con los asuntos fijados en el punto 11.1. Cualquier resultado de laboratorio es solamente una parte del cuadro clínico de un paciente.

Solamente en los casos donde los resultados de laboratorio están en acuerdo con todo el cuadro clínico de un paciente, se pueden derivar consecuencias terapéuticas.

Nunca deben derivarse consecuencias terapéuticas a partir de solamente el resultado obtenido en el ensayo

### 11.3 Responsabilidad











Cualquier modificación del kit y/o cambio o mezcla de cualquier componente procedentes de kits de lotes diferentes puede afectar negativamente a los resultados esperados y en la validez de todo el test. Esas modificaciones y/o cambios invalidan cualquier reclamación de reposición.











Las reclamaciones emitidas debidas a una mala interpretación de los resultados de laboratorio por parte del comprador referidos al punto 11.2 son también inválidas. A pesar de todo, en el caso de cualquier reclamación, la responsabilidad del fabricante no excede el valor del kit. Cualquier daño provocado al kit durante su transporte no está sujeto a la responsabilidad del fabricante.

## 12 REFERENCIAS / BIBLIOGRAFÍA

Consultar el manual de usuario en inglés.

## SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Français	Español	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Ussage Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di Cat.
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Temperature de conservation	Temperatura de conservacion	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenu	Contenido	Contenuto
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Numéro	Volumen/Número	Volume/Quantità
<i>Microtiterwells</i>	Microtiterwells	Mikrotiterwells	Plaques de micro-titration	Placas multipocillo	Micropozzetti
<i>Antiserum</i>	Antiserum	Antiserum	Antisérum	Antisero	Antisiero
<i>Enzyme Conjugate</i>	Enzyme Conjugate	Enzymkonjugat	Conjugué enzymatique	Conjugado enzimático	Tracciante enzimatico
<i>Enzyme Complex</i>	Enzyme Complex	Enzymkomplex	Complexe enzymatique	Complex enzimático	Complesso enzimatico
<i>Substrate Solution</i>	Substrate Solution	Substratlösung	Solution substrat	Solución de sustrato	Soluzione di substrato
<i>Stop Solution</i>	Stop Solution	Stopplösung	Solution d'arrêt	Solución de parada	Soluzione d' arresto
<i>Zero Standard</i>	Zero Standard	Nullstandard	Standard 0	Estándar 0	Standard zero
<i>Standard</i>	Standard	Standard	Standard	Estándar	Standard
<i>Control</i>	Control	Kontrolle	Contrôle	Control	Controllo
<i>Assay Buffer</i>	Assay Buffer	Assaypuffer	Tampon d'essai	Tampón de ensayo	Tampone del test
<i>Wash Solution</i>	Wash Solution	Waschlösung	Solution de lavage	Solución de lavado	Soluzione di lavaggio
<i>1N NaOH</i>	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH (idrossido di sodio 1N)
<i>1 N HCl</i>	1 N HCl	1 N HCl	1N HCl	1 N HCl	
<i>Sample Diluent</i>	Sample Diluent	Probenverdünnungsmedium	Solution pour dilution de l'échantillon	Solución para dilución de la muestra	Diluyente dei campioni
<i>Conjugate Diluent</i>	Conjugate Diluent	Konjugatverdünnungsmedium	Solution pour dilution du conjugué	Solución para dilución del conjugado	Diluyente del tracciante

Symbol	Portugues	Dansk	Svenska	Ελληνικά
	Conformidade com as normas europeias	Europaeisk overensstemmelse	Europeisk överensstämmelse	Ευρωπαϊκή Συμμόρφωση
	Consulte as instruções de utilização	Se brugsanvisning	Se bruksanvisningen	Εγχειρίδιο χρήστη
	Diagnóstico in vitro	In vitro diagnostik	Diagnostik in vitro	in vitro διαγνωστικό
	Catálogo n.º	Katalognummer	Katalog nummer	Αριθμός καταλόγου
				
	No do lote	Lot nummer	Batch-nummer	Αριθμός Παρτίδος
		Indeholder tilstrækkeligt til "n" test	Innehåller tillräckligt till "n" tester	Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις
	Temperatura de conservação	Opbevaringstemperatur	Förvaringstemperatur	Θερμοκρασία αποθήκευσης
	Prazo de validade	Udløbsdato	Bäst före datum	Ημερομηνία λήξης
	Fabricante	Producent	Tillverkare	Κατασκευαστής
<i>Distributed by</i>				
<i>Content</i>	Conteúdo	Indhold	Innehåll	Περιεχόμενο
<i>Volume/No.</i>	Volume/Número	Volumen/antal	Volym/antal	Όγκος/αριθ..
<i>Microtiterwells</i>	Alvéolos de microtitulação	Mikrotiterbrønde	Brunnar i Mikrotiterplatta	Πηγάδια Μικροτιλοδοτήσεως
<i>Antiserum</i>	Anti-soro	Antiserum	Antiserum	Αντιορός
<i>Enzyme Conjugate</i>	Conjugado enzimático	Enzymkonjugat	Enzymkonjugat	Συζευγμένο ενζυμο
<i>Enzyme Complex</i>	Complexo enzimático	Enzymkompleks	Enzymkomplex	Σύμπλοκο ενζύμου
<i>Substrate Solution</i>	Solução de substrato	Substratopløsning	Substratlösning	Διάλυμα υποστρώματος
<i>Stop Solution</i>	Solução de paragem	Stopopløsning	Stopp lösning	Διάλυμα τερματισμού
<i>Zero Standard</i>	Padrão zero	Standard 0	Standard 0	Πρότυπο Μηδέν
<i>Standard</i>	Calibrador	Standard	Standard	Πρότυπα
<i>Control</i>	Controlo	Kontrol	Kontroll	Έλεγχος
<i>Assay Buffer</i>	Tampão de teste	Assay buffer	Assay Buffer	Ρυθμιστικό Διάλυμα Εξέτασης
<i>Wash Solution</i>	Solução de lavagem	Vaskebuffer	Tvätt lösning	Διάλυμα πλύσεως
<i>1N NaOH</i>	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH
<i>1 N HCl</i>	1 N HCl	1 N HCl	1 N HCl	1 N HCl
<i>Sample Diluent</i>				
<i>Conjugate Diluent</i>				