



DHEA Elisa

KAPDB490



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

KAPDB490

IN VITRO DIAGNOSTIC

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

INTENDED USE

For the direct quantitative determination of dehydroepiandrosterone (DHEA) in human serum by an enzyme immunoassay. For *in vitro* use only.

PRINCIPLE OF THE TEST

The principle of the following enzyme immunoassay test follows the typical competitive binding scenario. Competition occurs between an unlabeled antigen (present in calibrators, controls and patient samples) and an enzyme-labelled antigen (conjugate) for a limited number of antibody binding sites on the microwell plate. The washing and decanting procedures remove unbound materials. After the washing step, the enzyme substrate is added. The enzymatic reaction is terminated by addition of the stopping solution. The absorbance is measured on a microtiter plate reader. The intensity of the colour formed is inversely proportional to the concentration of DHEA in the sample. A set of calibrators is used to plot a calibration curve from which the amount of DHEA in patient samples and controls can be directly read.

CLINICAL APPLICATIONS

Dehydroepiandrosterone (DHEA) is a C₁₉ steroid produced in the adrenal cortex and to a lesser extent in the gonads. DHEA serves as precursor in testosterone and estrogen synthesis. Due to the presence of a 17-oxo-group, DHEA has relatively weak androgenic activity, which has been estimated at ~10% that of testosterone. However in neonates, peripubertal children and in adult women, circulating DHEA levels may be several fold higher than testosterone concentrations, and rapid peripheral tissue conversion to more potent androgen (androstenedione and testosterone) and estrogen 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 vivo* and *in vitro* effects have been demonstrated, including antitumoral effects by provoking prevention and/or regression in spontaneous or chemically induced skin and colon cancers in rodents. A few reports have suggested low production of DHEA(S) in women at risk of or having breast cancer. Therapeutic activity of DHEA has been reported for animals with diabetes of genetic origin, obesity and cardiovascular disease. There are also effects of DHEA in immune function, lipid metabolism, cholesterol, the nervous system, aging and in protection against virus development.

Serum DHEA levels are relatively high in the fetus and neonates, low during childhood, and increase during puberty until the third decade of life. No consistent change in serum DHEA levels occur during the menstrual cycle or pregnancy. DHEA has a rapid metabolic clearance rate as compared to its sulfated conjugate, DHEA-S. Because of this, serum DHEA levels are 100-1000 fold lower than DHEA-S levels. In addition serum DHEA levels show significant diurnal variation which is dependent on adrenocorticotrophic hormone (ACTH). Measurement of serum DHEA is a useful marker of adrenal androgen synthesis. Abnormally low levels may occur in hypoadrenalism, and elevated levels may occur in several conditions including virilizing adrenal adenoma and carcinoma, 21-hydroxylase and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase deficiencies and in some case of female hirsutism.

PROCEDURAL CAUTIONS AND WARNINGS

1. Users should have a thorough understanding of this protocol for the successful use of this kit. Reliable performance will only be attained by strict and careful adherence to the instructions provided.
2. Control materials or serum pools should be included in every run at a high and low level for assessing the reliability of results.
3. When the use of water is specified for dilution or reconstitution, use deionized or distilled water.
4. In order to reduce exposure to potentially harmful substances, gloves should be worn when handling kit reagents and human specimens.
5. All kit reagents and specimens should be brought to room temperature and mixed gently but thoroughly before use. Avoid repeated freezing and thawing of reagents and specimens.
6. A calibration curve must be established for every run.
7. The controls should be included in every run and fall within established confidence limits.
8. Improper procedural techniques, imprecise pipetting, incomplete washing as well as improper reagent storage may be indicated when assay values for the controls do not reflect established ranges.

9. When reading the microplate, the presence of bubbles in the microwells will affect the optical densities (ODs). Carefully remove any bubbles before performing the reading step.

10. The substrate solution (TMB) is sensitive to light and should remain colourless if properly stored. Instability or contamination may be indicated by the development of a blue colour, in which case it should not be used.

11. When dispensing the substrate and stopping solution, do not use pipettes in which these liquids will come into contact with any metal parts.

12. To prevent contamination of reagents, use a new disposable pipette tip for dispensing each reagent, sample, calibrator and control.

13. Do not mix various lot numbers of kit components within a test and do not use any component beyond the expiration date printed on the label.

14. Kit reagents must be regarded as hazardous waste and disposed of according to national regulations.

LIMITATIONS

1. All the reagents within the kit are calibrated for the direct determination of DHEA in human serum. The kit is not calibrated for the determination of DHEA in saliva, plasma or other specimens of human or animal origin.

2. Do not use grossly hemolyzed, grossly lipemic, icteric or improperly stored serum.

3. Any samples or control sera containing azide or thimerosal are not compatible with this kit, as they may lead to false results.

4. Only the DHEA sample diluent may be used to dilute any high serum samples.

The use of any other reagent may lead to false results.

5. The results obtained with this kit should never be used as the sole basis for a clinical diagnosis. For example, the occurrence of heterophilic antibodies in patients regularly exposed to animals or animal products has the potential of causing interferences in immunological tests. Consequently, the clinical diagnosis should include all aspects of a patient's background including the frequency of exposure to animals/products if false results are suspected.

SAFETY CAUTIONS AND WARNINGS

POTENTIAL BIOHAZARDOUS MATERIAL

Human serum that may be used in the preparation of the calibrators and controls has been tested and found to be non-reactive for Hepatitis B surface antigen and has also been tested for the presence of antibodies to HCV and Human Immunodeficiency Virus (HIV) and found to be negative. However no test method can offer complete assurance that HIV, HCV and Hepatitis B virus or any infectious agents are absent. The reagents should be considered a potential biohazard and handled with the same precautions as applied to any blood specimen.

CHEMICAL HAZARDS

Avoid contact with reagents containing TMB, hydrogen peroxide and sulfuric acid. If contacted with any of these reagents, wash with plenty of water. TMB is a suspected carcinogen.

SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

Approximately 0.2 mL of serum is required per duplicate determination. Collect 4-5 mL of blood into an appropriately labelled tube and allow it to clot. Centrifuge and carefully remove the serum layer. Store at 4°C for up to 24 hours or at -10°C or lower if the analyses are to be done at a later date. Consider all human specimens as possible biohazardous materials and take appropriate precautions when handling.

SPECIMEN PRETREATMENT

This assay is a direct system; no specimen pretreatment is necessary.

REAGENTS AND EQUIPMENT NEEDED BUT NOT PROVIDED

1. Precision pipettes to dispense 25, 50, 100, 150 and 300 μ L
2. Disposable pipette tips
3. Distilled or deionized water
4. Plate shaker
5. Microwell plate reader with a filter set at 450nm and an upper OD limit of 3.0 or greater* (see assay procedure step 10).

6. DHEA Sample Diluent – If a sample concentration reads more than 40 ng/mL, then dilute the sample with the DHEA sample diluent at a dilution of no more than 1:4.
DHEA sample diluent (Cat. No.: KAPDB490-11) must be ordered separately in any quantity.

REAGENTS PROVIDED

UR **Rabbit Anti-DHEA Antibody Coated Microwell Plate-Break Apart Wells** - Ready To Use.
Contents: One 96 well (12x8) polyclonal antibody-coated microwell plate in a resealable pouch with desiccant.
Storage: Refrigerate at 2-8°C
Stability: 12 months or as indicated on label.

Ag **DHEA-Horseradish Peroxidase (HRP) Conjugate** – Ready for use

Contents: DHEA-HRP conjugate in a protein-based buffer with a non-mercury preservative.
Volume: 14ml/vial
Storage: Refrigerate at 2-8°C
Stability: 12 months or as indicated on label.

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

Contents: Six vials containing DHEA in a protein-based buffer with a non-mercury preservative. Prepared by spiking matrix with a defined quantity of DHEA.

*Listed below are approximate concentrations, please refer to vial labels for exact concentrations.

Calibrator	Concentration	Volume/Vial
Calibrator 0	0 ng/mL	0.6 mL
Calibrator 1	0.2 ng/mL	0.6 mL
Calibrator 2	1 ng/mL	0.6 mL
Calibrator 3	5 ng/mL	0.6 mL
Calibrator 4	15 ng/mL	0.6 mL
Calibrator 5	40 ng/mL	0.6 mL

Storage: Refrigerate at 2-8°C
Stability: 12 months in unopened vials or as indicated on label. Once opened, the calibrators should be stored at 2-8°C for up to 14 days. For longer period it is advisable to aliquot them and store frozen until the expiration date on the label. Avoid multiple freezing and thawing cycles.

CONTROL **N** **Controls** - Ready To Use.
N=2

Contents: Two vials containing DHEA in a protein-based buffer with a non-mercury preservative. Prepared by spiking serum with defined quantities of DHEA. Refer to vial labels for the acceptable range.
Volume: 0.6 mL/vial
Storage: Refrigerate at 2-8°C
Stability: 12 months in unopened vial or as indicated on label. Once opened, the controls should be used within 14 days or aliquoted and stored frozen. Avoid multiple freezing and thawing cycles.

WASH **SOLN** **CONC** **Wash Buffer Concentrate** – **X10**

Contents: One bottle containing buffer with a non-ionic detergent and a non-mercury preservative.
Volume: 50 ml/bottle
Storage: Refrigerate at 2-8°C
Stability: 12 months or as indicated on label.
Preparation: Dilute 1:10 in distilled or deionized water before use. If the whole plate is to be used dilute 50 mL of the wash buffer concentrate in 450 mL of water.

CHROM **TMB** **TMB Substrate** - Ready To Use.

Contents: One bottle containing tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide in a non-DMF or DMSO containing buffer.
Volume: 16 mL/bottle
Storage: Refrigerate at 2-8°C
Stability: 12 months or as indicated on label.

STOP **SOLN** **Stopping Solution** - Ready To Use.

Contents: One bottle containing 1M sulfuric acid.

Volume: 6 mL/bottle
Storage: Refrigerate at 2-8°C
Stability: 12 months or as indicated on label.

ASSAY PROCEDURE

Specimen Pretreatment:
None.

All reagents must reach room temperature before use. Calibrators, controls and specimen samples should be assayed in duplicate. Once the procedure has been started, all steps should be completed without interruption.

1. Prepare working solution of the wash buffer.
2. Remove the required number of microwell strips. Reseal the bag and return any unused strips to the refrigerator.
3. Pipette 25 µl of each calibrator, control and specimen sample into correspondingly labelled wells in duplicate.
4. Pipette 100 µl of the DHEA-HRP conjugate into each well (We recommend using a multichannel pipette).
5. Incubate on a plate shaker (approximately 200 rpm) for 1 hour at room temperature.
6. Wash the wells 3 times with 300 µl of diluted wash buffer per well and tap the plate firmly against absorbent paper to ensure that it is dry (The use of a washer is recommended).
7. Pipette 150 µl of TMB substrate into each well at timed intervals.
8. Incubate on a plate shaker for 10-15 minutes at room temperature (or until calibrator 0 attains dark blue colour for desired OD).
9. Pipette 50 µl of stopping solution into each well at the same timed intervals as in step 7.
10. Read the plate on a microwell plate reader at 450 nm within 20 minutes after addition of the stopping solution.

* If the OD exceeds the upper limit of detection or if a 450 nm filter is unavailable, a 415 nm filter may be substituted. The optical densities will be lower, however, this will not affect the results of patient/control samples.

CALCULATIONS

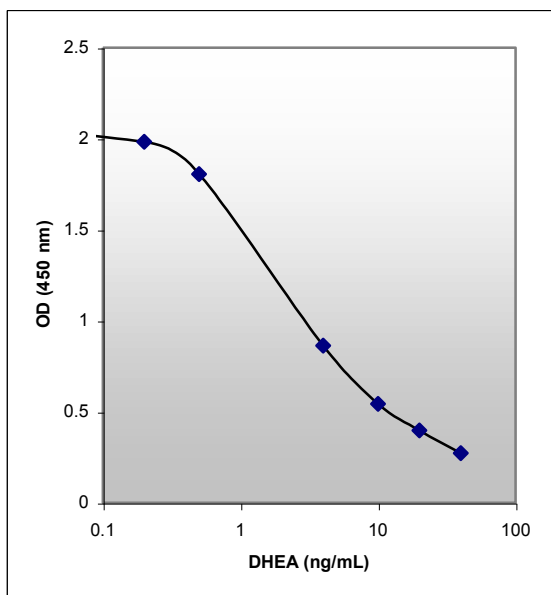
1. Calculate the mean optical density of each calibrator duplicate.
2. Draw a calibration curve on semi-log paper with the mean optical densities on the Y-axis and the calibrator concentrations on the X-axis. If immunoassay software is being used, a 4-parameter or 5-parameter curve is recommended.
3. Calculate the mean optical density of each unknown duplicate.
4. Read the values of the unknowns directly off the calibration curve.
5. If a sample reads more than 40 ng/mL then dilute it with the DHEA sample diluent (cat. no.: KAPDB490-11) at a dilution of no more than 1:4. The result obtained should be multiplied by the dilution factor.

TYPICAL TABULATED DATA

Calibrator	Mean OD	Value (ng/mL)
0	2.450	0
1	2.103	0.2
2	1.450	1
3	0.693	5
4	0.340	15
5	0.146	40
Unknown	1.032	2.3

TYPICAL CALIBRATION CURVE

Sample curve only. **Do not** use to calculate results.



PERFORMANCE CHARACTERISTICS

SENSITIVITY

The limit of detection (LoD) was determined from the analysis of 60 samples of the blank and a low value sample and it was calculated as follows:

$LoD = \mu B + 1.645\sigma B + 1.645\sigma S$, where σB and σS are the standard deviation of the blank and low value sample and μB is the mean value of the blank.

The Limit of Detection (LoD) was determined to be 0.15 ng/mL.

SPECIFICITY (CROSS REACTIVITY)

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

Steroid	%Cross-Reactivity
DHEA	100
Andrenosterone	0.282
Androstenedione	0.610
Androsterone	0.248
Cholesterol	0.152
Corticosterone	0.139
Cortisol	0.124
DHEAS	0.050
DHT	0.471
Epiandrosterone	4.555
Estradiol	0.196
Estrone	0.173
Progesterone	0.419
Progesterone, 17-OH	0.306
Testosterone	0.496

INTRA-ASSAY PRECISION

Three samples were assayed twenty four times each on the same calibration curve. The results (in ng/mL) are tabulated below:

Sample	Mean	SD	CV%
1	1.36	0.148	10.9
2	4.28	0.280	6.5
3	12.10	0.500	4.1

INTER-ASSAY PRECISION

Three samples were assayed 20 times, 2 runs a day on the same calibration curve. The results (in ng/mL) are tabulated below:

Sample	Mean	SD	CV%
1	1.30	0.173	13.3
2	3.90	0.385	9.9
3	10.70	0.900	8.4

LINEARITY

Three patient serum samples were diluted with the DHEA sample diluent. The results (in ng/mL) are tabulated below:

Sample	Obs.Result	Exp.Result	Recovery%
1	3.58	-	-
1:2	1.85	1.79	103
1:4	0.92	0.90	102
2	5.55	-	-
1:2	2.77	2.77	100
1:4	1.42	1.39	102
3	25.19	-	-
1:2	13.75	12.59	109
1:4	7.13	6.30	113

EXPECTED NORMAL VALUES

120 samples from putatively normal individuals between 20 and 39 years of age were analysed and the reference range was determined using a non-parametric method. As for all clinical assays each laboratory should collect data and establish their own range of expected normal values.

Group	95% Confidence Range (ng/mL)
Females	1.2-6.3
Males	1.7-6.1

REFERENCES

- Baulieu, E.M., Dehydroepiandrosterone (DHEA): A fountain of youth? .Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 18: 3147, 1996.
- BlethenS.L., et al., Dehydroepiandrosterone (DHEA) measurements in cord blood.Steroids, 45:187, 1985.

Revision date : 2016-06-03



DHEA Elisa

es

Para la determinación cuantitativa directa de la Dehidroepiandrosterona (DHEA) en suero humano por inmunoensayo enzimático

KAPDB490

DIAGNÓSTICO IN VITRO

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

USO PREVISTO

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

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El principio de este inmunoensayo enzimático sigue el formato típico de unión competitiva. La competencia ocurre entre un antígeno no etiquetado (presente en los calibradores, controles y muestras de los pacientes) y un antígeno etiquetado con una enzima (conjugado) para un número limitado de sitios de unión del anticuerpo en el pocillo de la microplaca. Los procedimientos de lavado y decantado eliminan el material que no se ha unido. Después del paso de lavado, se añade el sustrato enzimático. La reacción enzimática se detiene añadiendo la solución de parada. Se mide la absorbancia en un lector de microplacas. La intensidad del color es inversamente proporcional a la concentración de DHEA en la muestra. Se utiliza un grupo de calibradores para trazar una curva de calibración desde donde se puede leer directamente la cantidad de DHEA en las muestras de los pacientes y los controles.

APLICACIONES CLÍNICAS

Dehidroepiandrosterona (DHEA) es un esteroide C_{19} producido en la corteza suprarrenal y en menor medida en las gónadas. DHEA es un precursor en la síntesis de la testosterona y el estrógeno. Debido a la presencia de un grupo 17-oxo, DHEA tiene una actividad androgénica relativamente débil, la que ha sido estimada en un ~10% de la testosterona. Sin embargo, en recién nacidos, niños peripubertales y mujeres adultas, los niveles de DHEA circulante pueden ser varias veces más altos que la concentración de la testosterona y puede ocurrir la conversión rápida en el tejido periférico a un andrógeno más potente (androstenediona y testosterona) y estrógeno. Además DHEA tiene una afinidad relativamente débil por la globulina fijadora de la hormona sexual. Estos factores pueden aumentar la biopotencia fisiológica de DHEA.

El papel fisiológico de DHEA no ha sido definido de manera concluyente. Se han demostrado una cantidad de efectos *in vivo* e *in vitro* incluyendo efectos antitumorales, provocando la prevención y/o regresión de cánceres de la piel y de colon, espontáneos o químicamente inducidos en roedores. Algunos informes han sugerido una baja producción de DHEA(S) en mujeres con riesgo de hacer cáncer de mama. La actividad terapéutica del DHEA ha sido notificada en animales con diabetes de origen genético, obesidad y enfermedad cardiovascular. También hay efectos de DHEA en la función inmune, metabolismo de los lípidos, colesterol, el sistema nervioso, envejecimiento y protección contra el desarrollo de virus.

El nivel de DHEA sérico es relativamente alto en el feto y los recién nacidos, bajo durante la infancia y aumentan durante la pubertad hasta la tercera década de vida. No ocurren cambios consistentes en los niveles de DHEA sérico durante el ciclo menstrual o el embarazo. DHEA tiene una tasa de depuración metabólica rápida comparado con su conjugado sulfatado DHEA-S. En consecuencia, los niveles de DHEA sérico son 100-1000 veces más bajos que los niveles de DHEA-S. Además los niveles de DHEA séricos muestran una variación diurna significativa que depende de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH). La medición del DHEA sérico es un marcador útil para la síntesis de andrógeno suprarrenal. En situaciones anómalas, pueden ocurrir niveles bajos en hipoadrenalismo y niveles altos en varios trastornos incluyendo adenoma suprarrenal virilizante y carcinoma, deficiencias de 21-hidroxilasa y 3 β -hidroxiesteroide y en algunos casos de hirsutismo femenino.

PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS DEL PROCEDIMIENTO

1. Los usuarios deben conocer en profundidad este protocolo para el uso correcto de este kit. Un rendimiento confiable solo se logrará mediante el cumplimiento estricto y cuidadoso de las instrucciones suministradas.
2. Los materiales de control y las combinaciones de sueros deben incluirse cada vez que se realice un ensayo a nivel alto y bajo para evaluar la confiabilidad de los resultados.
3. Cuando se especifique el uso de agua para dilución o reconstitución, utilizar agua desionizada o destilada.
4. Con el fin de reducir la exposición a sustancias potencialmente nocivas, se deben usar guantes al manipular los reactivos del kit y muestras humanas.
5. Todos los reactivos del kit y las muestras deben estar a temperatura ambiente y se deben mezclar suavemente pero a fondo antes de utilizar. Evitar la congelación y descongelación repetida de los reactivos y muestras.
6. En cada ensayo se debe incluir una curva de calibración.

7. El control se debe incluir en cada ensayo y debe caer entre los límites de confianza establecidos.

8. Es posible que técnicas con procedimientos inadecuados, pipeteo impreciso, lavado incompleto así como la conservación incorrecta de reactivos estén implicados cuando los valores del ensayo para el control no reflejen los rangos establecidos.

9. Al leer la microplaca, la presencia de burbujas en los pocillos afectará las densidades ópticas (DO). Retirar cuidadosamente todas las burbujas antes de realizar el paso de lectura.

10. La solución de sustrato (TMB) es sensible a la luz y debe permanecer incolora si se conserva adecuadamente. El desarrollo de un color azul puede indicar inestabilidad o contaminación en cuyo caso no se debe utilizar.

11. Al dispensar el sustrato y la solución de parada, no utilizar pipetas en las que el líquido tome contacto con partes metálicas.

12. Para evitar la contaminación de reactivos, utilizar una punta de pipeta nueva desechable para cada reactivo, muestra, calibrador y control.

13. No mezclar diferentes números de lote de componentes del kit, dentro de un ensayo y no utilizar ningún componente después de la fecha de caducidad impresa en la etiqueta.

14. Los reactivos del kit deben considerarse como desecho peligroso y deben eliminarse según las normativas nacionales.

LIMITACIONES

1. Todos los reactivos del kit están calibrados para la determinación directa de DHEA en suero humano. El kit no está calibrado para la determinación de DHEA en saliva, plasma u otros especímenes de origen humano o animal.

2. No utilizar suero que esté extremadamente hemolizado, lipémico, icterico o haya sido almacenado de forma inadecuada.

3. Todas las muestras o sueros de control que contengan azida o timerosal no son compatibles con este kit, ya que pueden conducir a resultados falsos.

4. Solo el diluyente de muestra DHEA debe ser utilizado para diluir cualquier muestra de suero alta. Si se utiliza otro reactivo puede conducir a resultados falsos.

5. Nunca se deben utilizar los resultados obtenidos con este kit como única base para un diagnóstico clínico. Por ejemplo, la ocurrencia de anticuerpos heterofílicos en pacientes que regularmente están expuestos a animales o productos animales, potencialmente puede causar interferencias en pruebas inmunológicas. Por lo tanto, el diagnóstico clínico debe incluir todos los aspectos de los antecedentes de un paciente, incluyendo la frecuencia de la exposición a animales/productos si se sospecha un resultado falso.

PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS DE SEGURIDAD

MATERIAL QUE PUEDE PRESENTAR UN PELIGRO BIOLÓGICO

El análisis del suero humano que se utilizó en la preparación de los calibradores y los controles resultó negativo para el antígeno de superficie de la hepatitis B y también resultó negativo para los anticuerpos anti VHC y el virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Sin embargo, ningún método puede garantizar la seguridad total de la ausencia de VIH, VHC y el virus de la hepatitis B o de cualquier otro agente infeccioso. Los reactivos deben considerarse como un peligro biológico potencial y se deben manipular con las mismas precauciones que se aplican a cualquier muestra de sangre.

RIESGO QUÍMICO

Evitar el contacto con reactivos que contienen TMB, peróxido de hidrógeno y ácido sulfúrico. Si entra en contacto con cualquiera de estos reactivos, lavar con abundante agua. Se sospecha que TMB es cancerígeno.

TOMA DE MUESTRA Y CONSERVACIÓN

Se necesitan aproximadamente 0,2 ml de suero para una determinación en duplicado. Tomar 4-5 ml de sangre en un tubo correctamente etiquetado y dejarlo coagular. Centrifugar y separar cuidadosamente la capa de suero. Almacenar a 4°C hasta 24 horas o a -10°C o menos si el análisis se realizará más tarde. Considerar todas las muestras humanas como material potencialmente biopeligrosos y tomar las precauciones adecuadas al manipularlas.

TRATAMIENTO PREVIO DE LA MUESTRA

Este ensayo es un sistema directo; no es necesario el tratamiento previo.

REACTIVOS Y EQUIPO NECESARIO PERO NO SUMINISTRADO

- 1. Pipetas de precisión que dispensen 25, 50, 100, 150 y 300 µl
- 2. Puntas de pipetas desechables
- 3. Agua destilada o desionizada
- 4. Agitador de microplacas
- 5. Lector de microplacas con filtro a 450nm y un límite superior de DO de 3,0 o más alto* (consultar el paso 10 del procedimiento del ensayo).
- 6. Diluyente de muestra DHEA - Si la lectura de la concentración de la muestra es superior a 40ng/mL, entonces la muestra debe diluirse con el diluyente de muestra DHEA a una dilución no superior a 1:4. Diluyente de muestra DHEA (Cat. No.: KAPDB490-11) debe pedirse por separado en cualquier cantidad

REACTIVOS SUMINISTRADOS

Pocillos desprendibles de microplaca recubiertos con anticuerpo de conejo anti DHEA - Listo para usar.

Contenido: Una microplaca con 96 pocillos (12x8) recubiertos con anticuerpo policlonal en una bolsa re sellable con desecante.
Conservación: Refrigerar a 2-8°C
Estabilidad: 12 meses o según lo que se indique en la etiqueta.

Ag	HRP
----	-----

Conjugado de peroxidasa de rábano picante (HRP) – DHEA – Listos para usar

Contenido: Conjugado DHEA-HRP en un tampón de base proteica con un conservante sin mercurio.
Volumen: 14ml/vial
Conservación: Refrigerar a 2-8°C
Estabilidad: 12 meses o según lo indicado en la etiqueta.

CAL	N
-----	---

Calibradores Dehidroepiandrosterona - Listos para usar. N = 0 a 5

Contenido: Seis viales de DHEA en un tampón de base proteica con un conservante sin mercurio. Preparado añadiendo cantidades definidas de DHEA a una matriz.

*Las concentraciones aproximadas están en la siguiente tabla, consultar la etiqueta de los viales para obtener las concentraciones exactas.

Calibrador	Concentración	Volumen/vial
Calibrador 0	0 ng/ml	0,6 ml
Calibrador 1	0,2 ng/ml	0,6 ml
Calibrador 2	1 ng/ml	0,6 ml
Calibrador 3	5 ng/ml	0,6 ml
Calibrador 4	15 ng/ml	0,6 ml
Calibrador 5	40 ng/ml	0,6 ml

Conservación: Refrigerar a 2-8°C
Estabilidad: 12 meses en viales sellados o según lo indicado en la etiqueta. Una vez abiertos los calibradores deben conservar a 2-8°C hasta por 14 días. Para periodos más largos se recomienda alicuotar y conservar congelados hasta la fecha de caducidad en la etiqueta. Evitar múltiples ciclos de congelación y descongelación.

CONTROL	N
---------	---

Controles - Listo para usar.
N=2

Contenido: Dos viales de DHEA en un tampón en base proteica con un conservante sin mercurio. Preparado agregando el suero unas cantidades de DHEA precisas de testosterona. Refiérase a las etiquetas del vial para el rango aceptable.

Volumen: 0,6 ml/vial
Conservación: Refrigerar a 2-8°C
Estabilidad: 12 meses en viales sellados o según lo indicado en la etiqueta. Una vez abierto se debe utilizar dentro de 14 días o alicuotar y conservar congelado. Evitar múltiples ciclos de congelación y descongelación.

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

Tampón de lavado concentrado – 10X

Contenido: Una botella de tampón con un detergente no iónico y un conservante sin mercurio.
Volumen: 50 ml/botella
Conservación: Refrigerar a 2-8°C
Estabilidad: 12 meses o según lo indicado en la etiqueta.
Preparación: Diluir 1:10 en agua destilada o desionizada antes de utilizar. Si utiliza toda la placa diluir 50 ml del tampón de lavado concentrado en 450 ml de agua.

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

Sustrato TMB - Listo para usar.

Contenido: Una botella de tetrametilbenzidina y peróxido de hidrogeno en un tampón sin DMF ni DMSO.
Volumen: 16 ml/botella
Conservación: Refrigerar a 2-8°C
Estabilidad: 12 meses o según lo indicado en la etiqueta.

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

Solución de parada - Lista para usar.

Contenido: Un botella de ácido sulfúrico 1M.
Volumen: 6 ml/botella
Conservación: Refrigerar a 2-8°C
Estabilidad: 12 meses o según lo indicado en la etiqueta.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Tratamiento previo de la muestra:

Ninguno

Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente antes de utilizarlos. Los calibradores, controles y muestras deben analizarse en duplicado. Una vez que el procedimiento se ha iniciado, todos los pasos se deben completar sin interrupción.

1. Preparar la solución de trabajo del tampón de lavado.
2. Sacar el número necesario de tiras de microplaca. Volver a sellar la bolsa y devolver las tiras no utilizadas al frigorífico.
3. Pipetear 25 µl de cada calibrador, control y muestra en los pocillos correspondientes etiquetados en duplicado.
4. Pipetear 100 µl de la DHEA-HRP conjugado en cada pocillo (Recomendamos utilizar una pipeta multicanal).
5. Incubar en un agitador de microplacas (aproximadamente 200 rpm) durante 1 hora a temperatura ambiente.
6. Lavar los pocillos 3 veces con 300 µl de tampón de lavado diluido por pocillo y golpear la placa firmemente sobre un papel absorbente para asegurar que esté seca. (Se recomienda utilizar un lavador automático).
7. Pipetear 150 µl de sustrato TMB en cada pocillo a intervalos medidos.
8. Incubar en un agitador de microplacas durante 10-15 minutos a temperatura ambiente (o hasta que el calibrador F adquiera un color azul oscuro para la DO deseada).
9. Pipetear 50 µl de solución de parada en cada pocillo a los mismos intervalos medidos del paso 7.
10. Leer la placa en un lector de microplacas a 450 nm dentro de 20 minutos después de añadir la solución de parada.

* Si la DO sobrepasa el límite superior de detección o si el filtro de 450 nm no está disponible, se puede sustituir por un filtro de 415 nm. Las densidades ópticas serán menores, sin embargo, esto no afectará los resultados de las muestras de control/pacientes.

CÁLCULOS

1. Calcular la densidad óptica promedio de cada calibrador en duplicado.
2. Trazar una curva de calibración en papel de gráfico semi logarítmico con las densidades ópticas promedio en el eje Y y las concentraciones del calibrador en el eje X. Si está utilizando software de inmunoensayo, se recomienda utilizar una curva de calibración de 4 parámetros o 5 parámetros.
3. Calcular la densidad óptica promedio de cada muestra desconocida en duplicado.
4. Leer los valores de las muestras desconocidas directamente de la curva de calibración
5. Si una muestra lee más de 40 ng/ml diluir con el Diluyente de muestra DHEA (Cat. No.: KAPDB490-11) a una dilución no mayor de 1:4. El resultado obtenido debe multiplicarse por el factor de dilución

TABLA DE DATOS TÍPICOS

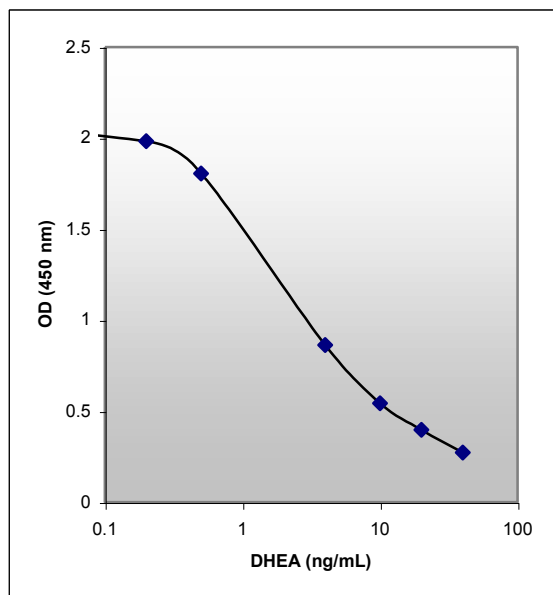
Calibrador	DO promedio	Valor (ng/ml)
0	2.450	0
1	2.103	0.2
2	1.450	1
3	0.693	5
4	0.340	15
5	0.146	40

Desconocido	1.032	2.3
-------------	-------	-----

Muestra	Promedio	DE	CV%
1	1.30	0.173	13.3
2	3.90	0.385	9.9
3	10.70	0.900	8.4

CURVA DE CALIBRACIÓN TÍPICA

Curva de ejemplo solamente. **No** utilizar para calcular resultados.



CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

SENSIBILIDAD

El límite de detección (LoD) fue determinado a partir del análisis de 60 muestras del blanco y de muestras con valores bajos del analito y fue calculado de la siguiente manera:

$LoD = \mu B + 1.645\sigma B + 1.645\sigma S$, donde σB y σS son la desviación estándar del blanco y de las muestras con valores bajos y μB es la media del valor del blanco. El límite de detección (LoD) determinado fue de 0.15 ng/mL.

ESPECIFICIDAD (REACTIVIDAD CRUZADA)

Los siguientes compuestos se analizaron para reacción cruzada con el kit DHEA ELISA con DHEA con reacción cruzada de 100%.

Esteroides	%Reactividad cruzada
DHEA	100
Andrenosterona	0,282
Androstenediona	0,610
Androsterona	0,248
Colesterol	0,152
Corticoesterona	0,139
Cortisol	0,124
DHEAS	0,050
DHT	0,471
Epiandrosterona	4,555
Estradiol	0,196
Estrona	0,173
Progesterona	0,419
Progesterona, 17-OH	0,306
Testosterona	0,496

PRECISIÓN INTRA ENSAYO

Tres muestras se analizaron veinticuatro veces cada una en la misma curva de calibración. Los resultados (en ng/ml) se muestran en la siguiente tabla:

Muestra	Promedio	DE	CV%
1	1.36	0.148	10.9
2	4.28	0.280	6.5
3	12.10	0.500	4.1

PRECISIÓN ENTRE ENSAYOS

Tres muestras se analizaron 20 veces, dos ensayos diarios con la misma curva de calibración. Los resultados (en ng/ml) se muestran en la siguiente tabla:

LINEALIDAD

Tres muestras de suero de paciente fueron diluidas con el Diluyente de muestra DHEA. Los resultados (en ng/mL) están tabulados a continuación:

Muestra	Resultado observado	Resultado esperado	Recuperación%
1	3.58	-	-
1:2	1.85	1.79	103
1:4	0.92	0.90	102
2	5.55	-	-
1:2	2.77	2.77	100
1:4	1.42	1.39	102
3	25.19	-	-
1:2	13.75	12.59	109
1:4	7.13	6.30	113

VALORES NORMALES ESPERADOS

120 muestras de supuestos individuos normales entre 20 y 39 años fueron analizados y el rango de referencia fue determinado usando un método no parametrizado.

Como en todos los ensayos clínicos, cada laboratorio debe recolectar sus datos y establecer su propio rango de valores normales esperados.

Grupo	95% rango de confianza (ng/ml)
Mujeres	1.2-6.3
Hombres	1.7-6.1

REFERENCIAS

- Baulieu, E.M., Dehydroepiandrosterone (DHEA): A fountain of youth? .Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 18: 3147, 1996.
- Blethen S.L., et al., Dehydroepiandrosterone (DHEA) measurements in cord blood. Steroids, 45:187, 198

Fecha de revisión : 2016-06-03