

Instructions for use **DHEA-S ELISA**

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit

INTENDED USE

For the direct quantitative determination of DHEA-S by an enzyme immunoassay in human serum.

PRINCIPLE OF THE TEST

The principle of the following enzyme immunoassay test follows the typical competitive binding scenario. Competition occurs between an unlabelled antigen (present in standards, controls and patient samples) and an enzyme-labelled antigen (conjugate) for a limited number of antibody binding sites on the microplate. 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-S in the sample. A set of standards is used to plot a standard curve from which the amount of DHEA-S in patient samples and controls can be directly read.

CLINICAL APPLICATIONS

Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S) is produced by the adrenals and gonads. As a result, the determination of the level of DHEA-S in serum is important in the evaluation of the functional state of these glands. DHEA-S is a precursor of testosterone and estrone. Besides the adrenals in females, the ovaries have been shown to be an important source of DHEA-S. It has been reported that there is a fluctuation day by day of DHEA-S in women during the ovulatory cycle.

The principle production of testosterone in females is from conversion of other related androgens, especially DHEA-S. An abnormal testosterone level in women should be accompanied by the estimation of serum DHEA-S. The use of serum testosterone determination in conjunction with Elisa of DHEA-S can be used to determine if the source of excess androgen production is ovarian or adrenal.

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 standard 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 wells 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, standard 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-S in human serum. The kit is not calibrated for the determination of DHEA-S 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 Standard A 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 standards 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. No test method however, 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 0.1 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, 150, 200 and 300 µl
2. Disposable pipette tips
3. Distilled or deionized water
4. Plate shaker
5. Microplate reader with a filter set at 450 nm and an upper OD limit of 3.0 or greater* (see assay procedure step 10)

REAGENTS PROVIDED

1. AA E-0030 **WASH-CONC 10x** **Wash Buffer Concentrate** – requires preparation **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.

2. AA E-0055 **SUBSTRATE** **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.

3. AA E-0080 **STOP-SOLN** **Stopping Solution** – Ready To Use.

Contents: One vial containing 1M sulfuric acid.
Volume: 6 ml/vial
Storage: Refrigerate at 2 – 8 °C
Stability: 12 months or as indicated on label.

Hazards
identification:



H290 May be corrosive to metals.
H314 Causes severe skin burns and eye damage.

4. Standards and Controls – Ready To Use.

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

Cat. no.	Symbol	Standard	Concentration	Volume/Vial
AA E-1101	STANDARD A	Standard A	0 µg/ml	2.0 ml
AA E-1102	STANDARD B	Standard B	0.005 µg/ml	0.5 ml
AA E-1103	STANDARD C	Standard C	0.02 µg/ml	0.5 ml
AA E-1104	STANDARD D	Standard D	0.1 µg/ml	0.5 ml
AA E-1105	STANDARD E	Standard E	0.5 µg/ml	0.5 ml
AA E-1106	STANDARD F	Standard F	2.5 µg/ml	0.5 ml
AA E-1107	STANDARD G	Standard G	10 µg/ml	0.5 ml
AA E-1151	CONTROL 1	Control 1	Refer to vial labels for expected value and acceptable range!	0.5 ml
AA E-1152	CONTROL 2	Control 2		0.5 ml

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

Storage: Refrigerate at 2 – 8 °C

Stability: 12 months in unopened vials or as indicated on label. Once opened the standards and controls should be used within 14 days or aliquoted and stored frozen. Avoid multiple freezing and thawing cycles.

5. AA E-1113 ASSAY-BUFF Assay Buffer – Ready To Use.

Contents: One vial containing a protein-based buffer with a non-mercury preservative.

Volume: 30 ml/vial

Storage: Refrigerate at 2 – 8 °C

Stability: 12 months or as indicated on label.

6. AA E-1131 96 Rabbit Anti-DHEA-S Antibody-Coated Break-Apart Well Microplate – Ready To Use.

Contents: One 96-well (12x8) polyclonal antibody-coated microplate in a resealable pouch with desiccant.

Storage: Refrigerate at 2 – 8 °C

Stability: 12 months or as indicated on label.

7. AA E-1140 CONJUGATE-CONC 50x DHEA-S-Horseradish Peroxidase (HRP) Conjugate Concentrate – requires preparation X50

Contents: DHEA-S-HRP conjugate in a protein-based buffer with a non-mercury preservative.

Volume: 0.8 ml/vial

Storage: Refrigerate at 2 – 8 °C

Stability: 12 months or as indicated on label.

Preparation: Dilute 1:50 in assay buffer before use (e.g. 40 µl of HRP in 2 ml of assay buffer). If the whole plate is to be used dilute 0.5 ml of HRP in 25 ml of assay buffer. Discard any that is left over.

ASSAY PROCEDURE

Specimen Pretreatment: **None.**

All reagents must reach room temperature before use. Standards, 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 solutions of the **DHEA-S-HRP conjugate** and **wash buffer**.
2. Remove the required number of well strips. Reseal the bag and return any unused strips to the refrigerator.
3. **Pipette 25 µl** of each **standard, control and specimen sample** into correspondingly labeled wells in duplicate.
4. **Pipette 200 µl** of the **conjugate working solution** into each well.
(We recommend using a multichannel pipette.)
5. **Incubate** on a plate shaker (approximately 200 rpm) for **45 minutes 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 **15 – 20 minutes** at room temperature
(or until Standard A 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 microplate 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 405 or 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 standard duplicate.
2. Draw a standard curve on semi-log paper with the mean optical densities on the Y-axis and the standard 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 standard curve.
5. If a sample reads more than 10 µg/ml then dilute it with Standard A at a dilution of no more than 1:8. The result obtained should be multiplied by the dilution factor.

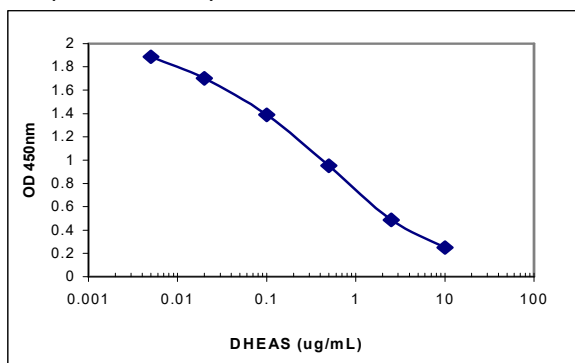
TYPICAL TABULATED DATA

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

Standard	OD 1	OD 2	Mean OD	Value (µg/ml)
A	2.106	2.060	2.083	0
B	1.910	1.863	1.887	0.005
C	1.636	1.769	1.703	0.02
D	1.398	1.382	1.390	0.1
E	0.966	0.938	0.952	0.5
F	0.496	0.479	0.488	2.5
G	0.250	0.252	0.251	10
Unknown	0.690	0.688	0.689	1.20

TYPICAL STANDARD CURVE

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



PERFORMANCE CHARACTERISTICS

SENSITIVITY

The lower detection limit is calculated from the standard curve by determining the resulting concentration of the mean OD of Standard A (based on 10 replicate analyses) minus 2 SD. Therefore, the sensitivity of the DHEA-S ELISA kit is **0.005 µg/ml**.

SPECIFICITY (CROSS REACTIVITY)

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

Steroid	% Cross Reactivity
DHEA-S	100
Androsterone	16.0
Androstenedione	1.7
Testosterone	0.9
Progesterone	0.6
DHT	0.6
Cortisol	0.5

The following steroids were tested but cross-reacted at less than 0.001%: 17β-Estradiol, Estrone, Estrone-Sulfate and Pregnenolone.

INTRA-ASSAY PRECISION

Three samples were assayed ten times each on the same standard curve. The results (in µg/ml) are tabulated below:

Sample	Mean	SD	CV%
1	0.24	0.02	7.5
2	2.02	0.18	8.9
3	9.54	0.11	11.5

INTER-ASSAY PRECISION

Three samples were assayed ten times over a period of four weeks. The results (in µg/ml) are tabulated below:

Sample	Mean	SD	CV%
1	0.13	0.02	15.3
2	1.11	0.09	8.1
3	6.38	0.27	4.2

RECOVERY

Spiked samples were prepared by adding defined amounts of DHEA-S to three patient serum samples. The results (in µg/ml) are tabulated below:

Sample	Obs. Result	Exp. Result	Recovery %
1 Unspiked	0.67	–	–
+ 0.1	0.84	0.77	109.1
+ 1.0	1.97	1.67	118.0
+ 5.0	5.80	5.67	102.3
2 Unspiked	1.21	–	–
+ 0.1	1.41	1.31	107.6
+ 1.0	2.01	2.21	91.0
+ 5.0	4.95	6.21	79.7
3 Unspiked	1.72	–	–
+ 0.1	1.93	1.82	106.0
+ 1.0	2.65	2.72	97.4
+ 5.0	5.45	6.72	81.1

LINEARITY

Three patient serum samples were diluted with Standard A. The results (in µg/ml) are tabulated below:

Sample	Obs. Result	Exp. Result	Recovery %
1	2.88	–	–
1:2	1.74	1.44	120.8
1:4	0.88	0.72	122.2
1:8	0.43	0.36	119.4
2	6.32	–	–
1:2	3.17	3.16	100.3
1:4	1.63	1.58	103.2
1:8	0.78	0.79	98.7
3	7.12	–	–
1:2	3.09	3.56	86.8
1:4	1.54	1.78	86.5
1:8	0.80	0.89	89.9

EXPECTED NORMAL VALUES

As for all clinical assays each laboratory should collect data and establish their own range of expected normal values.

Group	Range (µg/ml)
Males	0.39 – 4.63
Females	0.46 – 2.75
Postmenopausal Females	0.48 – 2.08

REFERENCES

1. Chasalow FI, Blethen SL, Bradlow HL. Dehydroepiandrosterone Sulfate (DHEAS) and DHEAS-like Compounds in Fibrocystic Disease of the Breast. *Steroids*. 1988; 52(3):205–15.
2. Chasalow FI, et al. Serum Levels of Dehydroepiandrosterone Sulfate as Determined by Commercial Kits and Reagents. *Steroids*. 1989;54(4):373–81.
3. de Peretti E, Forest MG. Pattern of Plasma Dehydroepiandrosterone Sulfate Levels in Humans from Birth to Adulthood: Evidence for Testicular Production. *J Clin Endocrinol Metab*. 1978; 47(3):572–77.
4. Holtzclaw WD, Gordon GB. Measurement of Serum Levels of Dehydroepiandrosterone Sulfate: A Comparison of Radioimmunoassay and Enzymatic Analysis. *Steroids*. 1989; 54(4): 355–71.
5. Koritnik DR, et al. A Radioimmunoassay for Dehydroepiandrosterone Sulfate in the Circulation of Rhesus Monkeys. *Steroids*. 1983; 42(6):653–67.
6. Orentreich N, et al. Age Changes and Sex Differences in Serum Dehydroepiandrosterone Sulfate Concentrations Throughout Adulthood. *J Clin Endocrinol Metab*. 1984; 59(3):551–55.
7. Smith MR, et al. A Radioimmunoassay for the Estimation of Serum Dehydroepiandrosterone Sulfate in Normal and Pathological Sera. *Clin Chim Acta*. 1975; 65(1): 5–13.
8. Check JH, et al. Falsely Elevated Steroidal Assay Levels Related to Heterophile Antibodies Against Various Animal Species. *Gynecol Obstet Invest*. 1995; 40(2):139–40.

Symbols:

	Storage temperature		Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Use-by date		Batch code		For in-vitro diagnostic use only!
	Consult instructions for use		Content		CE marking of conformity
	Caution		Catalogue number		Distributor
	Date of manufacture				

VERWENDUNGSZWECK

Zur direkten quantitativen Bestimmung von DHEA-S durch einen Enzymimmunoassay in Humanserum.

TESTPRINZIP

Das Prinzip des folgenden Enzym-Immunoassay-Tests beruht auf dem typischen Szenario der kompetitiven Bindung. Ein unmarkiertes Antigen (das in Standards, Kontrollen und Patientenproben vorhanden ist) und ein enzymmarkiertes Antigen (Konjugat) konkurrieren um eine begrenzte Anzahl von Antikörperbindungsstellen auf der Mikrotiterplatte. Durch das Waschen und Dekantieren wird ungebundenes Material entfernt. Nach dem Waschschrift wird das Enzymsubstrat zugegeben. Die enzymatische Reaktion wird durch Zugabe der Stopplösung beendet. Die Absorption wird mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät gemessen. Die Intensität der gebildeten Farbe ist umgekehrt proportional zur Konzentration von DHEA-S in der Probe. Anhand einer Reihe von Standards wird eine Standardkurve erstellt, an der die DHEA-S-Menge in Patientenproben und Kontrollen direkt abgelesen werden kann.

KLINISCHE ANWENDUNGEN

Dehydroepiandrosteron-Sulfat (DHEA-S) wird von der Nebennierenrinde und den Gonaden produziert. Daher ist die Bestimmung des DHEA-S-Spiegels im Serum wichtig für die Beurteilung des Funktionszustands dieser Drüsen. DHEA-S ist ein Vorläufer von Testosteron und Estron. Neben der Nebennierenrinde haben sich bei Frauen auch die Eierstöcke als wichtige Quelle für DHEA-S erwiesen. Es wurde berichtet, dass die DHEA-S-Konzentration bei Frauen während des Ovulationszyklus von Tag zu Tag schwankt. Testosteron wird bei Frauen hauptsächlich durch die Umwandlung anderer verwandter Androgene, insbesondere von DHEA-S, gebildet. Ein abnormaler Testosteronspiegel bei Frauen sollte durch die Bestimmung des DHEA-S-Serums begleitet werden. Durch die Bestimmung von Serumtestosteron in Verbindung mit dem Elisa-Test von DHEA-S kann festgestellt werden, ob die Quelle der überschüssigen Androgenproduktion die Eierstöcke oder die Nebennierenrinde sind.

VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

1. Für die erfolgreiche Verwendung dieses Kits sollten die Benutzer dieses Protokoll genau verstehen. Zuverlässige Ergebnisse werden nur bei strikter und sorgfältiger Befolgung der Anweisungen erzielt.
2. Bei jedem Lauf sollten Kontrollmaterialien oder Serumpools in hoher und niedriger Konzentration mitgeführt werden, um die Zuverlässigkeit der Ergebnisse zu beurteilen.
3. Wenn die Verwendung von Wasser zur Verdünnung oder Rekonstitution vorgeschrieben ist, ist deionisiertes oder destilliertes Wasser zu verwenden.
4. Um die Exposition gegenüber potenziell schädlichen Substanzen zu verringern, sollten beim Umgang mit Kit-Reagenzien und menschlichen Proben Handschuhe getragen werden.
5. Alle Reagenzien und Proben sollten vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig, aber gründlich durchmischt werden. Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Reagenzien und Proben.
6. Für jeden Lauf muss eine Standardkurve erstellt werden.
7. Die Kontrollen sollten in jeden Lauf einbezogen werden und innerhalb der festgelegten Vertrauensgrenzen liegen.
8. Unsachgemäße Verfahrenstechniken, unpräzises Pipettieren, unvollständiges Waschen und unsachgemäße Lagerung der Reagenzien können in Frage kommen, wenn die Messwerte für die Kontrollen nicht in den etablierten Bereichen liegen.
9. Beim Ablesen der Mikrotiterplatte beeinträchtigt das Vorhandensein von Blasen in den Wells die optischen Dichten (ODs). Entfernen Sie vor dem Ablesen vorsichtig alle Blasen.
10. Die Substratlösung (TMB) ist lichtempfindlich und sollte bei richtiger Lagerung farblos bleiben. Instabilität und Verunreinigung können an der Entstehung einer blauen Farbe erkannt werden, in welchem Fall die Lösung nicht verwendet werden sollte.
11. Beim Dosieren von Substrat und Stopplösung verwenden Sie keine Pipetten, in denen diese Flüssigkeiten in Kontakt mit Metallteilen kommen.
12. Um Kontamination der Reagenzien zu vermeiden, verwenden Sie zur Entnahme aller Reagenzien, Proben, Standards und Kontrollen jeweils eine neue Einweg-Pipettenspitze.
13. Verschiedene Chargen von Kit-Komponenten sind innerhalb eines Tests nicht zu mischen, und keine Komponente darf nach dem Verfalldatum auf dem Etikett verwendet werden.
14. Die Reagenzien des Kits sind als Sondermüll zu betrachten und entsprechend den nationalen Vorschriften zu entsorgen.

EINSCHRÄNKUNGEN

1. Alle Reagenzien des Kits sind für die direkte Bestimmung von DHEA-S in Humanserum kalibriert. Das Kit ist nicht für die Bestimmung von DHEA-S in Speichel, Plasma oder anderen Proben menschlichen oder tierischen Ursprungs kalibriert.
2. Verwenden Sie kein stark hämolysiertes, stark lipämisches, ikterisches oder unsachgemäß gelagertes Serum.

3. Proben oder Kontrollseren, die Azid oder Thimerosal enthalten, sind mit diesem Kit nicht kompatibel, da sie zu falschen Ergebnissen führen können.
4. Zur Verdünnung von Proben mit hohem Serumgehalt darf nur Standard A verwendet werden. Die Verwendung eines anderen Reagenzes kann zu falschen Ergebnissen führen.
5. Die mit diesem Kit erzielten Ergebnisse sollten niemals als alleinige Grundlage für eine klinische Diagnose verwendet werden. So kann z. B. das Auftreten heterophiler Antikörper bei Patienten, die regelmäßig mit Tieren oder tierischen Produkten in Berührung kommen, zu Interferenzen bei immunologischen Tests führen. Daher sollte die klinische Diagnose alle Aspekte des Hintergrunds eines Patienten umfassen, einschließlich der Häufigkeit der Exposition gegenüber Tieren/Produkten, wenn falsche Ergebnisse vermutet werden.

VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE **POTENZIELL INFEKTIÖSES MATERIAL**

Humanserum, das zur Herstellung der Standards und Kontrollen verwendet werden kann, wurde auf das Hepatitis-B-Oberflächenantigen getestet und als nicht reaktiv befunden. Es wurde auch auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen HCV und den Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) getestet und als negativ befunden. Keine Testmethode kann jedoch die vollständige Sicherheit bieten, dass HIV, HCV und Hepatitis-B-Viren oder andere Infektionserreger nicht vorhanden sind. Die Reagenzien sind als potenzielles biologisches Risiko zu betrachten und mit denselben Vorsichtsmaßnahmen zu behandeln, die für jede Blutprobe gelten.

CHEMISCHE GEFAHREN

Vermeiden Sie den Kontakt mit Reagenzien, die TMB, Wasserstoffperoxid und Schwefelsäure enthalten. Bei Kontakt mit einem dieser Reagenzien mit reichlich Wasser waschen. TMB steht im Verdacht, krebserregend zu sein.

PROBENNAHME UND -LAGERUNG

Für eine Doppelbestimmung werden ca. 0,1 ml Serum benötigt. 4 – 5 ml Blut in ein entsprechend beschriftetes Röhrchen geben und gerinnen lassen. Zentrifugieren Sie und entfernen Sie vorsichtig die Serumschicht. Bis zu 24 Stunden bei 4 °C lagern oder bei -10 °C oder niedriger, wenn die Analysen zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt werden sollen. Betrachten Sie alle menschlichen Proben als mögliches biologisch gefährliches Material und treffen Sie entsprechende Vorsichtsmaßnahmen bei der Handhabung.

PROBENVORBEREITUNG

Bei diesem Test handelt es sich um ein direktes System; eine Vorbehandlung der Proben ist nicht erforderlich.

BENÖTIGTE, ABER NICHT MITGELIEFERT REAGENZIEN UND INSTRUMENTE

1. Präzisionspipetten zur Abgabe von 25, 50, 150, 200 und 300 µl
2. Einweg-Pipettenspitzen
3. Destilliertes oder deionisiertes Wasser
4. Plattenschüttler
5. Mikroplatten-Lesegerät mit einem Filter bei 450 nm und einer oberen OD-Grenze von 3,0 oder mehr* (siehe Assay-Verfahren Schritt 10)

MITGELIEFERT REAGENZIEN

1. AA E-0030 **WASH-CONC 10x** **Waschpufferkonzentrat** – erfordert eine Vorbereitung **X10**

Inhalt: Eine Flasche Puffer mit nichtionischem Detergens und quecksilberfreiem Konservierungsmittel.

Volumen: 50 ml/Fläschchen

Lagerung: Gekühlt bei 2 – 8 °C

Stabilität: 12 Monate oder wie auf dem Etikett angegeben.

Vorbereitung: Vor der Verwendung 1:10 in destilliertem oder demineralisiertem Wasser verdünnen. Wenn die gesamte Platte verwendet werden soll, 50 ml Waschpufferkonzentrat mit 450 ml Wasser verdünnen.

2. AA E-0055 **SUBSTRATE** **TMB Substrat** – Gebrauchsfertig.

Inhalt: Eine Flasche mit Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid in einem nicht DMF- oder DMSO-haltigen Puffer.

Volumen: 16 ml/Fläschchen

Lagerung: Gekühlt bei 2 – 8 °C

Stabilität: 12 Monate oder wie auf dem Etikett angegeben.

3. AA E-0080 **STOP-SOLN** **Stopplösung** – Gebrauchsfertig.

Inhalt: Ein Fläschchen 1M Schwefelsäure.
Volumen: 6 ml/Fläschchen
Lagerung: Gekühlt bei 2 – 8 °C
Stabilität: 12 Monate oder wie auf dem Etikett angegeben.
Mögliche Gefahren: 

H290 Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.
H314 Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.

4. Standards und Kontrollen – Gebrauchsfertig.

Die folgenden Angaben sind ungefähre Konzentrationen, die genauen Konzentrationen finden Sie auf den Etiketten der Fläschchen:

Katalognr.	Symbol	Standard	Konzentration	Volumen/ Fläschchen
AA E-1101	STANDARD A	Standard A	0 µg/ml	2,0 ml
AA E-1102	STANDARD B	Standard B	0,005 µg/ml	0,5 ml
AA E-1103	STANDARD C	Standard C	0,02 µg/ml	0,5 ml
AA E-1104	STANDARD D	Standard D	0,1 µg/ml	0,5 ml
AA E-1105	STANDARD E	Standard E	0,5 µg/ml	0,5 ml
AA E-1106	STANDARD F	Standard F	2,5 µg/ml	0,5 ml
AA E-1107	STANDARD G	Standard G	10 µg/ml	0,5 ml
AA E-1151	CONTROL 1	Control 1	Kontrollwerte und -bereiche entnehmen Sie bitte dem Fläschchenetikett!	0,5 ml
AA E-1152	CONTROL 2	Control 2		0,5 ml

Inhalt: DHEA-S in einem Puffer auf Proteinbasis mit einem quecksilberfreien Konservierungsmittel. Hergestellt durch Aufstockung des Puffers mit einer bestimmten Menge DHEA-S.
Lagerung: Gekühlt bei 2 – 8 °C
Stabilität: 12 Monate in ungeöffneten Fläschchen oder wie auf dem Etikett angegeben. Nach dem Öffnen sollten die Standards und Kontrollen innerhalb von 14 Tagen verwendet oder aliquotiert und eingefroren aufbewahrt werden. Mehrfache Einfrier- und Auftauzyklen sind zu vermeiden.

5. AA E-1113 **ASSAY-BUFF** **Assaypuffer** – Gebrauchsfertig.

Inhalt: Ein Fläschchen mit einem Puffer auf Proteinbasis und einem quecksilberfreien Konservierungsmittel.
Volumen: 30 ml/Fläschchen
Lagerung: Gekühlt bei 2 – 8 °C
Stabilität: 12 Monate oder wie auf dem Etikett angegeben.

6. AA E-1131 **96** **Mikrotiterplatte mit herausbrechbaren Wells und Kaninchen Anti-DHEA-S Antikörper beschichtet** – Gebrauchsfertig.

Inhalt: Eine mit polyklonalen Antikörpern beschichtete Mikrotiterplatte mit 96 Wells (12x8) in einem wiederverschließbaren Beutel mit Trockenmittel.
Lagerung: Gekühlt bei 2 – 8 °C
Stabilität: 12 Monate oder wie auf dem Etikett angegeben.

7. AA E-1140

CONJUGATE-CONC 50x

DHEA-S-Horseradish Peroxidase (HRP) Konjugatkonzentrat –
erfordert Vorbereitung **X50**

- Inhalt: DHEA-S-HRP-Konjugat in einem Puffer auf Proteinbasis mit einem quecksilberfreien Konservierungsmittel.
- Volumen: 0,8 ml/Fläschchen
- Lagerung: Gekühlt bei 2 – 8 °C
- Stabilität: 12 Monate oder wie auf dem Etikett angegeben.
- Vorbereitung: Vor der Verwendung 1:50 in Assaypuffer verdünnen (z.B. 40 µl HRP in 2 ml Assaypuffer). Wenn die gesamte Platte verwendet werden soll, 0,5 ml HRP in 25 ml Assaypuffer verdünnen. Verwerfen Sie alle Reste.

TESTVERFAHRENVorbehandlung der Probe: **Keine.**

Alle Reagenzien müssen vor der Verwendung Raumtemperatur erreichen. Standardlösungen, Kontrollen und Proben sollten in doppelter Ausführung getestet werden. Sobald das Verfahren begonnen wurde, sollten alle Schritte ohne Unterbrechung durchgeführt werden.

1.	Bereiten Sie Arbeitslösungen des DHEA-S-HRP-Konjugats und des Waschpuffers vor.
2.	Entnehmen Sie die benötigte Anzahl von Mikrotiterstreifen. Verschließen Sie den Beutel und legen alle nicht verwendeten Streifen wieder zurück in den Kühlschrank.
3.	Pipettieren Sie jeweils 25 µl der Standards, Kontrollen und Proben zweifach in entsprechend markierte Wells.
4.	Pipettieren Sie 200 µl der Konjugat-Arbeitslösung in jedes Well. (Wir empfehlen die Verwendung einer Mehrkanalpipette.)
5.	Auf einem Plattenschüttler (ca. 200 U/min) 45 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubieren.
6.	Waschen Sie die Wells dreimal mit 300 µl verdünntem Waschpuffer pro Well und klopfen Sie die Platte fest gegen saugfähiges Papier aus, um sicherzustellen, dass sie trocken ist. (Die Verwendung eines Waschautomaten wird empfohlen.)
7.	Pipettieren Sie in definierten Zeitintervallen 150 µl TMB-Substrat in jedes Well.
8.	15 – 20 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Plattenschüttler inkubieren (oder bis Standard A bei der gewünschten OD eine dunkelblaue Farbe annimmt).
9.	Zu den gleichen Zeitintervallen wie in Schritt 7 je 50 µl der Stopplösung in die Wells pipettieren.
10.	Messen der Platte auf einem Mikrotiterplattenlesegerät bei 450 nm innerhalb von 20 Minuten nach der Zugabe der Stopplösung.
	Wenn die OD die obere Nachweisgrenze überschreitet oder ein 450-nm-Filter nicht verfügbar ist, kann ein 405- oder 415-nm-Filter verwendet werden. Die optischen Dichten sind dann niedriger; dies hat jedoch keinen Einfluss auf die Ergebnisse der Patienten-/Kontrollproben.

BERECHNUNGEN

- Berechnen Sie die mittlere optische Dichte jedes Standardduplikats.
- Zeichnen Sie eine Standardkurve auf semi-logarithmischem Papier mit den mittleren optischen Dichten auf der Y-Achse und den Standardkonzentrationen auf der X-Achse. Wenn eine Immunoassay-Software verwendet wird, wird eine 4- oder 5-Parameter-Kurve empfohlen.
- Berechnen Sie die mittlere optische Dichte jedes unbekannten Duplikats.
- Lesen Sie die Werte der unbekannten Proben direkt von der Standardkurve ab.
- Wenn eine Probe einen Wert von mehr als 10 µg/ml aufweist, ist sie mit Standard A im Verhältnis von höchstens 1:8 zu verdünnen. Das erhaltene Ergebnis sollte mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert werden.

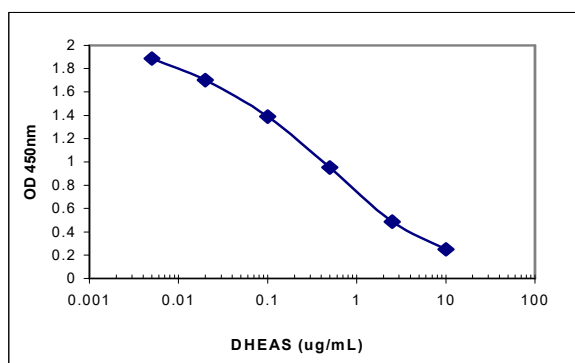
TYPISCHE TABELLARISCHE DATEN

Nur Beispieldaten. **Nicht** zur Berechnung von Ergebnissen verwenden.

Standard	OD 1	OD 2	Mittelwert OD	Wert (µg/ml)
A	2,106	2,060	2,083	0
B	1,910	1,863	1,887	0,005
C	1,636	1,769	1,703	0,02
D	1,398	1,382	1,390	0,1
E	0,966	0,938	0,952	0,5
F	0,496	0,479	0,488	2,5
G	0,250	0,252	0,251	10
Unbekannt	0,690	0,688	0,689	1,20

TYPISCHE STANDARDKURVE

Nur Beispielkurve. **Nicht** zur Berechnung der Ergebnisse verwenden.



LEISTUNGSMERKMALE

EMPFINDLICHKEIT

Die untere Nachweisgrenze wird aus der Standardkurve berechnet, indem die sich ergebende Konzentration der mittleren OD von Standard A (basierend auf 10 Wiederholungsanalysen) minus 2 SD bestimmt wird. Die Empfindlichkeit des DHEA-S-ELISA-Kits beträgt daher **0,005 µg/ml**.

SPEZIFITÄT (KREUZREAKTIVITÄT)

Die folgenden Verbindungen wurden auf Kreuzreaktivität mit dem DHEA-S-ELISA-Kit getestet, wobei DHEA-S zu 100% kreuzreagierte.

Steroid	% Kreuzreaktivität
DHEA-S	100
Androsteron	16,0
Androstendion	1,7
Testosteron	0,9
Progesteron	0,6
DHT	0,6
Kortisol	0,5

Die folgenden Steroide wurden getestet, zeigten aber Kreuzreaktionen von weniger als 0,001%: 17β-Estradiol, Estron, Estron-Sulfat und Pregnenolon.

INTRA-ASSAY PRÄZISION

Drei Proben wurden jeweils zehnmal mit der gleichen Standardkurve untersucht. Die Ergebnisse (in µg/ml) sind nachstehend tabellarisch aufgeführt:

Probe	Mittelwert	SD	CV%
1	0,24	0,02	7,5
2	2,02	0,18	8,9
3	9,54	0,11	11,5

INTER-ASSAY PRÄZISION

Drei Proben wurden über einen Zeitraum von vier Wochen zehnmal untersucht. Die Ergebnisse (in µg/ml) sind nachstehend tabellarisch aufgeführt:

Probe	Mittelwert	SD	CV%
1	0,13	0,02	15,3
2	1,11	0,09	8,1
3	6,38	0,27	4,2

WIEDERFINDUNG

Aufgestockte Proben wurden durch Zugabe bestimmter Mengen DHEA-S zu drei Patientenserumproben hergestellt. Die Ergebnisse (in µg/ml) sind im Folgenden tabellarisch dargestellt:

Probe	Beob. Ergebnis	Erw. Ergebnis	Wiederfindung %
1 Nicht aufgestockt	0,67	–	–
+ 0,1	0,84	0,77	109,1
+ 1,0	1,97	1,67	118,0
+ 5,0	5,80	5,67	102,3
2 Nicht aufgestockt	1,21	–	–
+ 0,1	1,41	1,31	107,6
+ 1,0	2,01	2,21	91,0
+ 5,0	4,95	6,21	79,7
3 Nicht aufgestockt	1,72	–	–
+ 0,1	1,93	1,82	106,0
+ 1,0	2,65	2,72	97,4
+ 5,0	5,45	6,72	81,1

LINEARITÄT

Drei Patientenserumproben wurden mit Standard A verdünnt. Die Ergebnisse (in µg/ml) sind in der folgenden Tabelle aufgeführt:

Probe	Beob. Ergebnis	Erw. Ergebnis	Wiederfindung %
1	2,88	–	–
1:2	1,74	1,44	120,8
1:4	0,88	0,72	122,2
1:8	0,43	0,36	119,4
2	6,32	–	–
1:2	3,17	3,26	100,3
1:4	1,63	1,58	103,2
1:8	0,78	0,79	98,7
3	7,12	–	–
1:2	3,09	3,56	86,8
1:4	1,54	1,78	86,5
1:8	0,80	0,89	89,9

ERWARTETE NORMALWERTE

Wie bei allen klinischen Tests sollte jedes Labor Daten sammeln und seinen eigenen Bereich von erwarteten Normalwerten festlegen.

Gruppe	Bereich (µg/ml)
Männer	0,39 – 4,63
Frauen	0,46 – 2,75
Postmenopausale Frauen	0,48 – 2,08

LITERATUR

1. Chasalow FI, Blethen SL, Bradlow HL. Dehydroepiandrosterone Sulfate (DHEAS) and DHEAS-like Compounds in Fibrocystic Disease of the Breast. *Steroids*. 1988; 52(3):205–15.
2. Chasalow FI, et al. Serum Levels of Dehydroepiandrosterone Sulfate as Determined by Commercial Kits and Reagents. *Steroids*. 1989;54(4):373–81.
3. de Peretti E, Forest MG. Pattern of Plasma Dehydroepiandrosterone Sulfate Levels in Humans from Birth to Adulthood: Evidence for Testicular Production. *J Clin Endocrinol Metab*. 1978; 47(3):572–77.
4. Holtzclaw WD, Gordon GB. Measurement of Serum Levels of Dehydroepiandrosterone Sulfate: A Comparison of Radioimmunoassay and Enzymatic Analysis. *Steroids*. 1989; 54(4): 355–71.
5. Koritnik DR, et al. A Radioimmunoassay for Dehydroepiandrosterone Sulfate in the Circulation of Rhesus Monkeys. *Steroids*. 1983; 42(6):653–67.
6. Orentreich N, et al. Age Changes and Sex Differences in Serum Dehydroepiandrosterone Sulfate Concentrations Throughout Adulthood. *J Clin Endocrinol Metab*. 1984; 59(3):551–55.
7. Smith MR, et al. A Radioimmunoassay for the Estimation of Serum Dehydroepiandrosterone Sulfate in Normal and Pathological Sera. *Clin Chim Acta*. 1975; 65(1): 5–13.
8. Check JH, et al. Falsely Elevated Steroidal Assay Levels Related to Heterophile Antibodies Against Various Animal Species. *Gynecol Obstet Invest*. 1995; 40(2):139–40.

Symbole:

	Lagertemperatur		Hersteller		Enthält Testmaterial für <n> Tests
	Verwendbar bis		Chargennummer		In vitro Diagnostikum
	Gebrauchsanweisung beachten		Inhalt		CE-Kennzeichnung
	Achtung		Katalognummer		Vertriebspartner
	Herstellungsdatum				