



DCM124-2
Ed. 09/2018

DHEA

per analisi di routine

Determinazione immunoenzimatica del DHEA nel siero o plasma umano

IVD



LOT

Vedere etichetta esterna

2°C - 8°C



Σ = 96 tests

REF DKO124

DESTINAZIONE D'USO

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

Il kit DHEA è destinato al solo uso di laboratorio.

1. SIGNIFICATO CLINICO

Il Deidroepiandrosterone è uno steroide a 19 atomi di carbonio prodotto nella cortecca adrenale e in minore quantità nelle gonadi. Il DHEA è un precursore della sintesi del testosterone e vari estrogeni.

Il ruolo fisiologico del DHEA non è completamente chiaro, in quanto sono stati evidenziati molteplici effetti sia in vivo che in vitro; tra questi va ricordato la prevenzione e regressione di tumori al colon, spontanei o indotti, nei roditori. Alcuni studi hanno mostrato una diminuzione della produzione di DHEA in donne con rischio di cancro al seno. Altri ruoli del DHEA dimostrati in modelli animali comprendono l'azione terapeutica nei confronti del diabete, dell'obesità e di malattie cardiovascolari, e ruoli non ben chiariti nelle funzioni immunologiche, nel metabolismo dei lipidi (colesterolo compreso) e all'interno del sistema nervoso.

I livelli sierici di DHEA sono relativamente alti in età fetale e neonatale, si abbassano durante la fanciullezza e hanno un nuovo aumento durante la pubertà e fino ai 30 anni. Durante la gravidanza o il ciclo mestruale non si osservano variazioni del DHEA. I livelli sierici di DHEA sono 100-1000 volte inferiori a quelli del Deidroepiandrosterone-Solfato (DHEA-S).

La misura dei livelli sierici del DHEA è un marker per la sintesi di androgeni adrenali. Possono essere osservati livelli bassi anormali nell'ipoadrenalismo e livelli elevati in varie patologie quali l'adenoma surrenalico, deficienze di 21-idrossilasi e 3β-idrossisteroid deidrogenasi e in alcuni casi di irsutismo femminile.

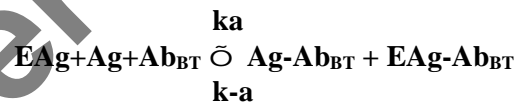
2. PRINCIPIO DEL METODO

I reagenti essenziali richiesti per questo test immunoenzimatico sono un anticorpo anti DHEA biotinilato, l'antigene DHEA coniugato con l'enzima HRP (perossidasi di rafano), l'antigene DHEA nativo presente nel campione ed una micropiastra coattata con Streptavidina (altamente affine per la Biotina). L'antigene nativo è in quantità sconosciuta, mentre

l'anticorpo e l'antigene coniugato ad HRP sono in eccesso.

Nella prima fase del saggio questi tre componenti vengono miscelati insieme; ne risulta una reazione competitiva per l'anticorpo anti DHEA tra l'antigene nativo e l'antigene coniugato con enzima HRP.

L'interazione è illustrata dall'equazione seguente:



EAg = antigene marcato con enzima HRP

Ag = antigene nativo (quantità presente nel campione sconosciuta)

Ab_{BT} = anticorpo anti DHEA biotinilato

Ag-Ab_{BT} = complesso antigene nativo-anticorpo

EAg-Ab_{BT} = complesso antigene marcato HRP - anticorpo

ka = Costante di associazione

k-a = Costante di dissociazione

Contemporaneamente alla loro formazione, i complessi si fissano sui pozzetti della micropiastra tramite la reazione ad alta affinità tra la Streptavidina e l'anticorpo biotinilato.

I reagenti in eccesso che non si sono fissati nei pozzetti vengono eliminati nelle fasi di lavaggio.

Nell'ultima fase del dosaggio, l'enzima HRP legato nel pozzetto catalizza la reazione tra il Substrato (H₂O₂) ed il TMB-Substrate (TMB), sviluppando una colorazione blu che vira al giallo dopo aggiunta della Stop solution (H₂SO₄).

L'intensità del colore sviluppato è inversamente proporzionale alla concentrazione di antigene nativo DHEA presente nel campione.

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

3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

1. Calibrators (6 flaconi, 1 mL ciascuno)

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

2. Enzyme Reagent (2 flaconi, 3 mL ciascuno)

DHEA coniugato con perossidasi di rafano (HRP)

REF DCE002/12402-0

3. Biotin Reagent (2 flaconi, 3 mL ciascuno)

Anticorpo anti DHEA biotinilato

REF DCE019/12419-0

4. Coated Microplate (1 micropiastra breakable)

Micropiastra coattata con Streptavidina

REF DCE002/12403-0

5. TMB Substrate (1 flacone, 12 mL)

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

REF DCE004/12404-0

6. Stop Solution (1 flacone, 8 mL)

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

REF DCE005/12405-0

7. 50X Conc. Wash Solution (1 flacone, 20 mL)

NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L

REF DCE006/12406-0

3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit

Acqua distillata.

3.3. Materiale ausiliario e strumentazione

Dispensatori automatici.

Letto per micropiastre (450 nm, 620-630 nm).

Note

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

Aprire la busta del Reattivo 4 (Coated Microplate) solo dopo averla riportata a temperatura ambiente e chiuderla subito dopo il prelievo delle strip da utilizzare; una volta aperta è stabile fino alla data di scadenza del kit.

4. AVVERTENZE

- Questo test kit è per uso in vitro, da eseguire da parte di personale esperto. Non per uso interno o esterno su esseri Umani o Animali.
- Usare i previsti dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le Buone Pratiche di Laboratorio (GLP) per la manipolazione di prodotti derivati da sangue.
- Tutti i reattivi di origine umana usati nella preparazione dei reagenti sono stati testati e sono risultati negativi per la presenza di anticorpi anti-HIV 1&2, per HbsAg e per anticorpi anti-HCV. Tuttavia nessun test offre la certezza completa dell'assenza di HIV, HBV, HCV o di altri agenti infettivi. Pertanto, i Calibratori devono essere maneggiati come materiali potenzialmente infettivi.

- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di Proclin 300^R come conservante. Evitare il contatto con la pelle e le mucose.
- Il TMB Substrato contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito attraverso la cute. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con la cute e con gli occhi.
- La Stop Solution è costituita da una soluzione di acido solforico diluito. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire possibili ustioni chimiche, evitare il contatto con la cute e con gli occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente TMB/H₂O₂ a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.

5. PRECAUZIONI

- Si prega di attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi indicata in questo protocollo. I risultati presentati qui sono stati ottenuti usando specifici reagenti elencati in queste Istruzioni per l'Uso.
- Tutti i reattivi devono essere conservati a temperatura controllata di 2-8°C nei loro contenitori originali. Eventuali eccezioni sono chiaramente indicate. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza se conservati e trattati seguendo le istruzioni fornite.
- Prima dell'uso lasciare tutti i componenti dei kit e i campioni a temperatura ambiente (22-28°C) e mescolare accuratamente.
- Non scambiare componenti dei kit di lotti diversi. Devono essere osservate le date di scadenza riportate sulle etichette della scatola e di tutte le fiale. Non utilizzare componenti oltre la data di scadenza.
- Qualora si utilizzi strumentazione automatica, è responsabilità dell'utilizzatore assicurarsi che il kit sia stato opportunamente validato.
- Un lavaggio incompleto o non accurato dei pozzetti può causare una scarsa precisione e/o un'elevato background. Per migliorare le prestazioni del kit su strumentazione automatica, si consiglia di aumentare il numero di lavaggi.
- Per la riproducibilità dei risultati, è importante che il tempo di reazione di ogni pozzetto sia lo stesso. Per evitare il time shifting durante la dispensazione degli reagenti, il tempo di dispensazione dei pozzetti non dovrebbe estendersi oltre i 10 minuti. Se si protrae oltre, si raccomanda di seguire lo stesso ordine di dispensazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva di calibrazione in ogni piastra.
- L'aggiunta del TMB Substrato dà inizio ad una reazione cinetica, la quale termina con l'aggiunta della Stop Solution. L'aggiunta del TMB Substrato e della Stop Solution deve avvenire nella stessa sequenza per evitare tempi di reazione differenti.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori clinici testando controlli e/o pool di sieri.
- Osservare la massima precisione nella ricostituzione e dispensazione dei reagenti.

- Non usare campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici o emolizzati.
- I lettori di micropiastre leggono l'assorbanza verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.

6. PROCEDIMENTO

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

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

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
ng/mL	0	0,5	2,0	5,0	10,0	30,0

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

6.2. Preparazione del Campione

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

6.3. Preparazione della Wash Solution

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

6.4. Procedimento

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

Reagente	Calibratore	Campione	Bianco
Calibratore C ₀ -C ₅	25 µL		
Campione		25 µL	
DHEA Enzyme Reagent	50 µL	50 µL	
Agitare delicatamente la micropiastro per 20-30 secondi per miscelare bene la soluzione.			

DHEA Biotin Reagent	50 µL	50 µL	
Agitare delicatamente la micropiastro per 20-30 secondi per miscelare bene la soluzione. Coprire la micropiastro Incubare 1 h a temperatura ambiente (22-28°C). Allontanare la miscela di reazione; lavare i pozzetti 3 volte con 350 µL di wash solution diluita. Nota importante: ad ogni step di lavaggio, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e successivamente rimuovere l'eccesso di soluzione di lavaggio sbattendo delicatamente la micropiastro capovolta su fogli di carta assorbente. Lavaggi automatici: se si utilizza strumentazione automatica effettuare almeno 5 lavaggi.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubare 20 minuti a temperatura ambiente (22÷28°C), al riparo dalla luce.			
Stop Solution	50 µL	50 µL	50 µL
Agitare delicatamente la micropiastro. Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm oppure contro il Bianco entro 5 minuti.			

7. CONTROLLO QUALITA'

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

8. RISULTATI

8.1. Estinzione media

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

8.2. Curva di calibrazione

Tracciare sul grafico delle assorbanze i valori calcolati delle estinzioni medie (Em) di ciascun calibratore (C₀-C₅) in funzione delle concentrazioni. Tracciare la

miglior curva passante per i punti di calibrazione (es: Four Parameter Logistic).

8.3 Calcolo dei risultati

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

9. VALORI DI RIFERIMENTO

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

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

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

10. PARAMETRI CARATTERISTICI

10.1. Precisione

10.1.1. Intra-Assay

La variabilità all'interno dello stesso kit è stata determinata replicando la misura di tre differenti sieri di controllo. La variabilità intra-assay è 9,8%.

10.1.2. Inter-Assay

La variabilità tra kit differenti è stata determinata replicando la misura di tre differenti sieri di controllo con kit appartenenti a lotti diversi. La variabilità inter-assay è 10,7%.

10.2. Sensibilità

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

10.3. Specificità

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

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

Estrone

< 0,001

11. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

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

BIBLIOGRAFIA

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

Ed. 09/2018

DCM124-2

Dia.Metra S.r.l.

Via Pozzuolo 14,
06038 SPELLO (PG) Italy

Tel. +39-0742-24851

Fax +39-0742-316197

E-mail: info@diametra.com



DCM124-2
Ed. 09/2018

DHEA

for routine analysis

Immunoenzymatic determination of DHEA in human serum or plasma

IVD



See external label

LOT

2°C 8°C



Σ = 96 tests

REF DKO124

INTENDED USE

Competitive immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination of Dehydroepiandrosterone (DHEA) concentration in human serum or plasma.

DHEA kit is intended for laboratory use only.

1. CLINICAL SIGNIFICANCE

Dehydroepiandrosterone (DHEA) is a C19 steroid secreted by the adrenal cortex and in smaller quantities by the gonads. DHEA is a precursor in testosterone and various estrogens biosynthesis.

The physiologic role of DHEA is not-well defined, because of a lot of ascertained in vivo and in vitro effects, for example the prevention and regression of colon tumor, spontaneous and induced, in rodents.

Some studies showed a decrease in the DHEA production in women with risk for the breast cancer. In animal models DHEA showed a role in the therapeutic action against diabetes, obesity and cardiovascular pathologies, and unclear roles in immunology, in lipid metabolism (also cholesterol) and in the nervous system.

Serum levels of DHEA are relatively high in fetal and neonatal age, decrease during childhood and increase again during puberty until 30 years. No DHEA variations have been observed during pregnancy or menstrual cycle. Serum levels of DHEA are 100-1000 times lower than the levels of DHEA sulphate (DHEA-S).

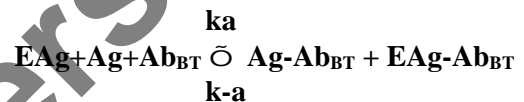
The measurement of serum levels of DHEA is a marker for adrenal androgen synthesis. Abnormal low levels of DHEA can be observed in the hypoadrenalism, while elevated levels can be observed in various pathologies such as the surrenalic adenomas, 21-hydroxylase and 3β-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency and in some cases of female hirsutism.

2. PRINCIPLE OF THE METHOD

The essential reagents required for this immunoenzymatic assay are a biotinylated anti DHEA antibody, the DHEA antigen conjugated with the enzyme HRP (horseradish peroxidase), the DHEA antigen present in the sample, and a microplate coated with Streptavidin (highly specific for Biotin). The quantity of native antigen is unknown, while the antibody and the antigen linked to HRP are in excess.

In the first part of the assay these three components are mixed together; a competitive reaction for the anti DHEA antibody between the native antigen and the antigen linked to HRP develops.

The interaction is illustrated by the following equation:



EAg = antigen linked to HRP enzyme

Ag = native antigen (unknown amount in the sample)

Ab_{BT} = biotinylated anti DHEA antibody

Ag·Ab_{BT} = native antigen-antibody complex

EAg·Ab_{BT} = native antigen linked to HRP - antibody complex

k_a = rate constant of association

k_{-a} = rate constant of dissociation

Simultaneously to their formation, the complexes are fixed to the microplate wells through the interaction between the Streptavidin and the biotinylated antibody.

The reagents in excess that have not react are eliminated in the washing steps.

In the last part of the assay, the enzyme HRP linked in the wells reacts with the Substrate (H₂O₂) and the TMB Substrate and develops a blue color that changes into yellow when the Stop Solution (H₂SO₄) is added.

The colour intensity is inversely proportional to the native antigen DHEA in the sample.

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

3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

3.1. Reagents and materials supplied in the kit

1. Calibrators (6 vials, 1 mL each)

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

2. Enzyme Reagent (2 vials, 3 mL each)

DHEA conjugated with horseradish peroxidase (HRP)
REF DCE002/12402-0

3. Biotin Reagent (2 vials, 3 mL each)

Antibody anti DHEA biotinylated
REF DCE019/12419-0

4. Coated Microplate (1 breakable microplate)

Microplate coated with Streptavidin
REF DCE002/12403-0

5. TMB Substrate (1 vial, 12 mL)

H₂O₂-TMB 0.26 g/L (avoid any skin contact)
REF DCE004/12404-0

6. Stop Solution (1 vial, 8 mL)

Sulphuric acid 0.15 mol/L (avoid any skin contact)
REF DCE005/12405-0

7. 50X Conc. Wash Solution (1 vial, 20 mL)

NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L REF DCE006/12406-0

3.2. Reagents necessary not supplied

Distilled water.

3.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.

Microplates reader (450 nm, 620-630 nm)

Notes

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

Open the bag of reagent 4 (Coated Microplate) only when it is at room temperature and close it immediately after use; once opened, it is stable until expiry date of the kit.

4. WARNINGS

- This kit is intended for in vitro use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
- All human source material used in the preparation of reagents has been tested and found negative for antibody to HIV 1&2, HbsAg, and HCV. No test method however can offer complete assurance that HIV, HBV, HCV or other infectious agents are absent. Therefore, the Calibrators should be handled in the same manner as potentially infectious material.

- Some reagents contain small amounts of Proclin 300^R as preservative. Avoid the contact with skin or mucosa.
- The TMB Substrate contains an irritant, which may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous and corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H₂O₂ to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.

5. PRECAUTIONS

- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol. The performance data represented here were obtained using specific reagents listed in this Instruction For Use.
- All reagents should be stored refrigerated at 2-8°C in their original container. Any exceptions are clearly indicated. The reagents are stable until the expiry date when stored and handled as indicated.
- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22-28°C) and mix well prior to use.
- Do not interchange kit components from different lots. The expiry date printed on box and vials labels must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- If you use automated equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately tested.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background. To improve the performance of the kit on automatic systems is recommended to increase the number of washes.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate
- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

6. PROCEDURE

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

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

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
ng/mL	0	0,5	2,0	5,0	10,0	30,0

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

6.2. Preparation of the Sample

The determination of Dehydroepiandrosterone can be performed in human plasma as well as in serum of patients.

Store the sample at -20°C if the determination is not performed on the same day of the sample connection. Avoid repetitive freezing and thawing of samples.

6.3. Preparation of Wash Solution

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

6.4. PROCEDURE

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

Reagent	Calibrator	Sample	Blank
Calibrator C ₀ -C ₅	25 µL		
Sample		25 µL	
DHEA Enzyme Reagent	50 µL	50 µL	
Shake gently the microplate for 20-30 seconds to mix.			
DHEA Biotin Reagent	50 µL	50 µL	

Shake gently the microplate for 20-30 seconds to mix. Cover the plate.

Incubate 1 h at room temperature (22-28°C).

Remove the contents from each well; wash the wells 3 times with 350 µL of diluted Wash Solution.

Important note: during each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel.

Automatic washer: if you use automated equipment, wash the wells at least 5 times.

TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
------------------	--------	--------	--------

Incubate 20 minutes at room temperature (22÷28°C), in the dark.

Stop Solution	50 µL	50 µL	50 µL
------------------	-------	-------	-------

Shake gently the micoplate.

Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against Blank within 5 minutes.

7. QUALITY CONTROL

Each laboratory should assay controls at normal, high and low levels range of DHEA for monitoring assay performance. These controls should be treated as unknowns and values determined in every test procedure performed. Quality control charts should be maintained to follow the performance of the supplied reagents. Pertinent statistical methods should be employed to ascertain trends. The individual laboratory should set acceptable assay performance limits. Other parameters that should be monitored include the 80, 50 and 20% intercepts of the standard curve for run-to-run reproducibility. In addition, maximum absorbance should be consistent with past experience. Significant deviation from established performance can indicate unnoticed change in experimental conditions or degradation of kit reagents. Fresh reagents should be used to determine the reason for the variations.

8. RESULTS

8.1. Mean Absorbance

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

8.2. Calibration Curve

Plot the values of absorbance (E_m) of the calibrators (C₀-C₅) against concentration.

Draw the best-fit curve through the plotted points (es: Four Parameter Logistic).

8.3. Calculation of Results

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

9. REFERENCE VALUES

The serum or plasma Dehydroepiandrosterone reference values are:

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

Please pay attention to the fact that the determination of a range of expected values for a "normal" population in a given method is dependent on many factors, such as specificity and sensitivity of the method used and type of population under investigation. Therefore each laboratory should consider the range given by the Manufacturer as a general indication and produce their own range of expected values based on the indigenous population where the laboratory works.

10. PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

10.1. Precision

10.1.1. Intra-Assay Variation

Within run variation was determined by replicate the measurement of three different control sera in one assay. The within assay variability is 9,8%.

10.1.2. Inter-Assay Variation

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

10.2. Sensitivity

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

10.3. Specificity

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

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

11. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

BIBLIOGRAPHY

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

Ed. 09/2018

DCM124-2

Dia.Metra S.r.l.

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



DCM124-2
Ed. 09/2018

DHEA

para análisis de rutina

Determinación de DHEA (dehidroepiandrosterona) en suero o plasma humano

IVD



LOT

Ver etiqueta externa



Σ = 96 ensayos

REF DKO124

USO PREVISTO

Método inmunoenzimático colorimétrico para la determinación cuantitativa de la concentración de DHEA (dehidroepiandrosterona) en suero o plasma humano.

El kit DHEA está destinado al uso en laboratorio exclusivamente.

1. APLICACIONES CLÍNICAS

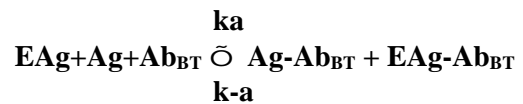
La dehidroepiandrosterona (DHEA) es una hormona esteroide de 19 átomos de carbono, producida por la corteza adrenal y en menor cantidad por las gónadas. La DHEA es precursora de la síntesis de la testosterona y muchos estrógenos. El papel fisiológico de la DHEA no es completamente conocido, se han evidenciados múltiples efectos sea in vivo como en vitro; entre estos sobresale la prevención y regresión del cáncer del colon en los roedores. Algunos estudios asociaron una disminución de la producción de la DHEA en mujeres con riesgo de cáncer de mama. Otros papeles de la DHEA demostrados en modelos animales incluyen: acción terapéutica en la diabetes, obesidad y enfermedades cardiovasculares. Se investiga su participación en la función inmunológica, en el metabolismo de los lípidos y sobre el sistema nervioso. Los niveles séricos de DHEA son relativamente elevados en la edad fetal y neonatal, bajan durante la infancia y aumenta nuevamente durante la pubertad hasta los 30 años. Durante el ciclo menstrual y el embarazo no se observan cambios en la concentración de la DHEA. Los niveles séricos de DHEA son 100-1000 veces inferiores a los de DHEA-S. La medición de los niveles de DHEA es un marcador para la síntesis de andrógenos adrenales, pueden observarse niveles bajo en el hipoadrenalismo y niveles elevados en diferentes patologías, adenoma suprarrenal, deficiencia de 21-hidroxilasa y 3β-hidroxisteride dehidrogenasa y en algunos casos de hirsutismo femenino.

2. PRINCIPIO

Los reactivos provistos en el test son anticuerpos anti-DHEA biotilizados, antígeno DHEA conjugado a HRP (Peroxidasa de rábano), microplaca recubierta con Estreptavidina.

En la primera fase del ensayo la muestra (conteniendo el antígeno nativo de DHEA) mas los anticuerpos anti DHEA biotilizados y el antígeno DHEA conjugado a HRP se añaden al pocillo. Como resultado se provoca una reacción competitiva entre el antígeno DHEA de la muestra y el antígeno DHEA ligado a peroxidasa para los anticuerpos anti DHEA conjugados a la biotina.

La reacción se describe con la siguiente ecuación:



EAg = Antígeno Marcado con HRP

Ag = Antígeno Nativo

Ab_{bt} = Anticuerpo anti DHEA biotilizado

Ag- Ab_{bt} = Complejo Antígeno Nativo-Anticuerpo

EAg- Ab_{bt} = Complejo Antígeno conjugado a HRP-Anticuerpo

Ka = Constante de asociación

K-a = Constante de disociación

Contemporáneamente los complejos formados se fijan al pocillo a través de la unión entre la biotina y la estreptavidina. Los reactivos en exceso se eliminan por lavado. En la última fase de la reacción la enzima HRP cataliza la reacción entre el Substrato H₂O₂ y el TMB, desarrollando una coloración amarilla que es inversamente proporcional a la cantidad de antígeno nativo presente en la muestra. La concentración de la DHEA presente se calcula versus una curva de calibración.

3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

3.1. Reactivos y materiales suministrados en el kit

1. Calibradores (6 frascos, 1 mL cada uno)

CAL0 **REF DCE002/12406-0**

CAL1 **REF DCE002/12407-0**

CAL2 **REF DCE002/12408-0**

CAL3 **REF DCE002/12409-0**

CAL4 **REF DCE002/12410-0**

CAL5 **REF DCE002/12411-0**

2. Enzyme reagent (2 frascos, 3 mL cada uno)

DHEA conjugado con peroxidasa de rábano (HRP)
REF DCE002/12402-0

3. Biotin Reagent (2 frascos, 3 mL cada uno)

Anticuerpo anti DHEA biotinilado
REF DCE019/12419-0

4. Microplaca recubierta (1 microplaca rompible)

Microplaca recubierta con estreptavidina
REF DCE002/12403-0

5. Substrato TMB (1 frasco, 12 mL)

H₂O₂-TMB (0,26 g/L) (*evitar el contacto con la piel*)
REF DCE004/12404-0

6. Solución de parada (1 frasco, 8 mL)

Ácido sulfúrico 0,15 mol/L (*evitar el contacto con la piel*)
REF DCE005/12405-0

7. Solución de lavado conc. 50X (1 frasco, 20 mL)

NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L **REF DCE006/12406-0**

3.2. Reactivos necesarios no incluidos en el kit

Agua destilada

3.3. Material e instrumental auxiliar

Dispensadores automáticos

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

Notas

Conservar todos los reactivos a 2÷8°C, protegidos de la luz.

Abrir la bolsa del reactivo 4 (microplaca recubierta) solo cuando se encuentre a temperatura ambiente y cerrarla inmediatamente después de extraer las tiras que se vayan a utilizar; una vez abierta, permanece estable hasta la fecha de caducidad del kit.

4. ADVERTENCIAS

- Este kit de ensayo está previsto para usarse in vitro y por personal experto. No es para uso interno o externo en humanos o animales.
- Usar los equipos de protección individual previstos al trabajar con los reactivos suministrados.
- Siga las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) en el manejo de las muestras sanguíneas y sus derivados.

- Todos los reactivos de origen humano usados en la preparación de los reactivos se han comprobado y han resultado negativos para la presencia de anticuerpos anti-VIH, para HbsAg y para anticuerpos anti-VHC. Sin embargo, ningún ensayo ofrece seguridad absoluta de la ausencia de VIH, VHB, VHC o de otros agentes infecciosos. Por lo tanto, los Calibradores y los Controles deben manipularse como material potencialmente infeccioso.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Proclin 300^R como conservante. Evite el contacto con la piel y las mucosas.
- El cromógeno TMB contiene un irritante que puede ser dañino si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para prevenir lesiones, evitar la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y con los ojos.
- La Solución de Parada está formada por una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo, y puede ser tóxico si se ingiere. Para prevenir posibles quemaduras químicas, evitar el contacto con la piel y con los ojos.
- Evite la exposición de los reactivos TMB/H₂O₂ a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.

5. PRECAUCIONES

- Respetar rigurosamente la secuencia de los pasos indicados en este protocolo. Los resultados aquí presentados se han obtenido utilizando los reactivos específicos que figuran en estas instrucciones de uso.
- Todos los reactivos deben conservarse a una temperatura controlada de 2-8°C en sus recipientes originales. Todas las excepciones están claramente marcadas. Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad cuando se almacenan y manipulan de acuerdo con las instrucciones proporcionadas.
- Antes del uso, esperar hasta que todos los componentes del kit y las muestras se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) y mezclar cuidadosamente.
- No mezclar componentes de kits de lotes distintos. Se debe observar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja y de todas las ampollas. No usar componentes después de la fecha de caducidad.
- Si utiliza un equipo automático, es responsabilidad del usuario asegurar que la metodología aplicada haya sido debidamente validada.
- Un lavado incompleto o impreciso y la aspiración insuficiente del líquido de los micropozos ELISA pueden causar una precisión pobre y/o un elevado fondo. Para mejorar el rendimiento del kit en los sistemas automatizados, se recomienda aumentar el número de lavados.

- Para la reproducibilidad de los resultados, es importante que el tiempo de reacción sea igual para cada pocillo. El tiempo de dispensación de los pocillos no debe superar los 10 minutos; si se prolongara más allá de los 10 minutos, respétese el orden de dispensación. Si utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva de calibración en cada placa.
- Al añadir el Sustrato TMB se inicia una reacción cinética que termina al agregar la Solución de Parada. Tanto el Sustrato TMB como la Solución de Parada deben agregarse en la misma secuencia para evitar diferentes tiempos de reacción.
- Observar las directrices para la ejecución del control de calidad en los laboratorios clínicos al comprobar controles y/o pool de sueros.
- Observar la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- No use muestras con contaminación microbiana, altamente lipémicas o hemolizadas.
- Los lectores de microplacas leen las DO verticalmente, por tanto no debe tocarse el fondo de los pocillos.

6. PROCEDIMIENTO

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

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

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
ng/mL	0	0.5	2	5	10	30

Una vez abiertos, los Calibradores permanecen estables 6 meses conservados a 2-8 °C.

6.2. Preparación de las muestras

La determinación puede realizarse en suero o plasma humano.

Las muestras pueden conservarse a 2÷8°C durante 1 día; para períodos más largos, conservarlas a -20°C. Se recomienda no congelar y descongelar las muestras repetidamente.

6.3. Preparación de la solución de lavado

Antes del uso, diluir el contenido de cada ampolla de "Solución de lavado conc. 50X" con agua destilada hasta un volumen de 1000 mL. Para preparar volúmenes menores, respetar la relación de dilución de 1:50. La solución de lavado diluida se mantiene estable a 2÷8°C durante al menos 30 días.

6.4. Procedimiento

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

Reactivo	Calibrador	Muestra	Blanco
Calibrador C ₀ -C ₅	25 µL		
Muestra		25 µL	
Enzyme Reagent	50 µL	50 µL	
Agitar suavemente la placa durante 20-30 segundos.			
Biotin Reagent	50 µL	50 µL	
<p>Agitar suavemente la placa durante 20-30 segundos Incubar a temperatura ambiente (22-28°C) durante 60 minutos. Retirar la mezcla de reacción. Lave los pozos 3 veces con 0,350 mL de solución de lavado diluida.</p> <p>Nota importante: agite suavemente la placa durante 5 segundos en cada paso del lavado. Después del último lavado asegúrese haber eliminado completamente la solución de lavado de los pozos, invierta la placa y golpéela repetidas veces contra una servilleta de papel absorbente.</p> <p>Lavados automático: si está utilizando una lavadora automática, lavar los pocillos al menos 5 veces.</p>			
Substrato TMB	100 µL	100 µL	100 µL
Incubar a temperatura ambiente (22-28°C) durante 20 minutos, protegida de la luz.			
Solución de parada	50 µL	50 µL	50 µL
<p>Agitar suavemente la placa. Leer la absorbancia (E) a 450 nm frente una segunda lectura de referencia a 620-630 nm o frente al blanco dentro de los 5 minutos.</p>			

7. CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio deberá comprobar controles con niveles de DHEA para supervisar el rendimiento del kit. Estos controles deben tratarse como desconocidos y sus valores deben determinarse en cada procedimiento de ensayo realizado.

Se deben mantener los gráficos de control de calidad para seguir el rendimiento de los reactivos suministrados. Se deben emplear métodos estadísticos pertinentes para determinar las tendencias. Cada laboratorio debe establecer los límites de aceptabilidad del rendimiento del kit. Entre otros parámetros que se deben controlar, se incluyen las intersecciones de 80, 50 y 20% de la curva de calibración para la reproducibilidad interensayo.

Además, la absorbancia máxima debe respetar los valores de las sesiones anteriores. Desviaciones significativas del rendimiento establecido pueden indicar un cambio inadvertido en las condiciones experimentales o la degradación de los reactivos del kit. Se deben usar reactivos frescos para determinar la causa de las variaciones.

8. RESULTADOS

8.1. Absorbancia media

Calcular la absorbancia media (E_m) de cada punto de la curva de calibración (C_0 - C_5) y de cada muestra.

8.2. Curva de calibración

Trazar en el gráfico de las absorbancias los valores calculados de las absorbancias medias (E_m) de cada Calibrador (C_0 - C_5) en función de las concentraciones. Trazar la curva de ajuste óptimo para los puntos Calibrador (p. ej. Logística de cuatro parámetros).

8.3. Cálculo de los resultados

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

9. VALORES NORMALES

Los intervalos de referencia se indican del siguiente modo:

	Mujeres	Hombres
Rango (ng/mL)	1.3 - 9.8	1.8 - 12.5

Es importante señalar que la determinación de un rango de valores esperados en un método dado para una población "normal" depende de muchos factores, tales como la especificidad y sensibilidad del método en uso, y la población en estudio. Por lo tanto, cada laboratorio debe considerar el intervalo especificado por el fabricante como una guía general y producir su propio rango de valores calculados en base al estadístico obtenido por el laboratorio, donde reside la población local.

10. PARÁMETROS CARACTERÍSTICOS

10.1. Precisión

10.1.1. Intraensayo

La variabilidad dentro del mismo kit se ha determinado replicando la medición de tres sueros de control distintos. La variabilidad intraensayo es 9.8%.

10.1.2. Interensayo

La variabilidad entre distintos kits se ha determinado replicando la medición de tres sueros de control distintos con kits pertenecientes a lotes distintos. La variabilidad interensayo es 10.7%.

10.2. Sensibilidad

La concentración mínima de DHEA medible que puede distinguirse del Calibrador 0 es 0.10 ng/mL con un límite de confianza del 95%.

10.3. Especificidad

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

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

11. DISPOSICIONES PARA LA ELIMINACIÓN

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con las leyes locales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Dorfman RI, Shipley, RA, *Adrogens*, John Wiley and Sons, New York, 1956, pp. 116-128.
2. Pang S, Riddick L, Hirsutism, IN Lifshitz (ed), *Pediatric Endocrinology, A Clinical Guide, second edition*, Marcel Dekker Inc., New York 1990, pp 259-291
3. De Peretti E, Forest MG, Pattern of plasma dehydroepiandrosterone sulfate levels in humans from birth to adulthood: evidence for testicular production, *J Clin Endocrinol Metab*, 47, 572-577 (1978)

4. Lashansky G, Saenger P, Fishman K, Gautier T, Mayes D, Berg G, Di Martino-Nardi J, Reiter E, Normative data for adrenal steroidogenesis in a healthy pediatric population: age and sex-related changes after adrenocorticotropin stimulation, *J Clin Endocrinol Metab*, 73, 674-686 (1991)
5. Zurnoff B, Roenfeld RS, Stain GW, Levin J, Fukushima DK, Sex differences in twenty-four hour mean plasma concentration of dehydroepian-drosterone (DHEA) and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) and the DHEA to DHEAS ratio in normal adults, *J Clin Endocrinol Metab* 51, 330-333 (1980)
6. Pang S, Lerner A, Stoner E, Oberfield S, Engle I, New M, Late-onset adrenal steroid 3'-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency: a cause of hirsutism in pubertal and postpubertal women, *J Clin Endocrinol Metab* 60, 428-439 (1985)
7. Lee PDK, Winter RJ, and Gree OC, Virilizing adrenocortical tumors in childhood: eight cases and a review of the literature, *Pediatrics*, 76, 437-444 (1985)
8. Tietz NW, *Textbook of clinical chemistry*, 2nd ed. Philadelphia WB Saunders, 1994

Ed. 09/2018

DCM124-2

Dia.Metra S.r.l.

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

Example Version

DiaMetra	Packaging Information Sheet	Mod. PIS000-1
-----------------	------------------------------------	----------------------

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

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

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

Reazione troppo blanda (OD troppo basse)

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

Reazione troppo intensa (OD troppo alte)

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

Valori inspiegabilmente fuori scala

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

CV% intrasaggio elevato

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

CV% intersaggio elevato

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

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

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

Too low reaction (too low ODs)

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

Too high reaction (too high ODs)

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

Unexplainable outliers

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

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

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

Reacción escasa (DO demasiado bajas)

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

Reacción demasiado intensa (DO demasiado altas)

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

Valores inexplicablemente fuera de escala

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

CV% intraensayo elevado

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

CV% interensayo elevado

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

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

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

Réaction trop faible (DO trop basse)

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

Réaction trop intense (DO trop élevée)

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

Valeurs inexplicablement hors plage

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

CV% intra-essai élevé

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

CV% inter-essai élevé

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