



# **DHEA Elisa**

***KAPDB490***





# History

## Summary of change :

Previous Version :	Current Version :																																																																
200224/1	200904																																																																
<table border="1"> <tr> <td>AG</td> <td>HRP</td> <td>CONC</td> </tr> </table>	AG	HRP	CONC	<table border="1"> <tr> <td>Ag</td> <td>HRP</td> <td>Ready to use</td> </tr> </table>	Ag	HRP	Ready to use																																																										
AG	HRP	CONC																																																															
Ag	HRP	Ready to use																																																															
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Calibrator</th> <th>Concentration</th> <th>Volume/Vial</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>Calibrator 0</td><td>0 ng/mL</td><td>2.0 mL</td></tr> <tr><td>Calibrator 1</td><td>0.2 ng/mL</td><td>0.6 mL</td></tr> <tr><td>Calibrator 2</td><td>0.5 ng/mL</td><td>0.6 mL</td></tr> <tr><td>Calibrator 3</td><td>4 ng/mL</td><td>0.6 mL</td></tr> <tr><td>Calibrator 4</td><td>10 ng/mL</td><td>0.6 mL</td></tr> <tr><td>Calibrator 5</td><td>40 ng/mL</td><td>0.6 mL</td></tr> </tbody> </table>	Calibrator	Concentration	Volume/Vial	Calibrator 0	0 ng/mL	2.0 mL	Calibrator 1	0.2 ng/mL	0.6 mL	Calibrator 2	0.5 ng/mL	0.6 mL	Calibrator 3	4 ng/mL	0.6 mL	Calibrator 4	10 ng/mL	0.6 mL	Calibrator 5	40 ng/mL	0.6 mL	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Calibrator</th> <th>Concentration</th> <th>Volume/Vial</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>Calibrator 0</td><td>0 ng/mL</td><td>0.6 mL</td></tr> <tr><td>Calibrator 1</td><td>0.2 ng/mL</td><td>0.6 mL</td></tr> <tr><td>Calibrator 2</td><td>1 ng/mL</td><td>0.6 mL</td></tr> <tr><td>Calibrator 3</td><td>5 ng/mL</td><td>0.6 mL</td></tr> <tr><td>Calibrator 4</td><td>15 ng/mL</td><td>0.6 mL</td></tr> <tr><td>Calibrator 5</td><td>40 ng/mL</td><td>0.6 mL</td></tr> </tbody> </table>	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																						
Calibrator	Concentration	Volume/Vial																																																															
Calibrator 0	0 ng/mL	2.0 mL																																																															
Calibrator 1	0.2 ng/mL	0.6 mL																																																															
Calibrator 2	0.5 ng/mL	0.6 mL																																																															
Calibrator 3	4 ng/mL	0.6 mL																																																															
Calibrator 4	10 ng/mL	0.6 mL																																																															
Calibrator 5	40 ng/mL	0.6 mL																																																															
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																																																															
<table border="1"> <tr> <td><b>CONTROL</b></td> <td>One vial containing DHEA in a protein-based buffer with a non-mercury preservative. Prepared by spiking buffer with a defined quantity of DHEA. Refer to vial label for expected value and acceptable range.</td> </tr> </table>	<b>CONTROL</b>	One vial containing DHEA in a protein-based buffer with a non-mercury preservative. Prepared by spiking buffer with a defined quantity of DHEA. Refer to vial label for expected value and acceptable range.	<table border="1"> <tr> <td><b>CONTROL</b></td> <td><b>N</b> 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.</td> </tr> </table>	<b>CONTROL</b>	<b>N</b> 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.																																																												
<b>CONTROL</b>	One vial containing DHEA in a protein-based buffer with a non-mercury preservative. Prepared by spiking buffer with a defined quantity of DHEA. Refer to vial label for expected value and acceptable range.																																																																
<b>CONTROL</b>	<b>N</b> 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.																																																																
<table border="1"> <tr> <td><b>ASS</b></td> <td><b>BUF</b></td> </tr> </table>	<b>ASS</b>	<b>BUF</b>	No Assay Buffer																																																														
<b>ASS</b>	<b>BUF</b>																																																																
Old assay procedure	New assay procedure																																																																
<p style="text-align: center;"><b>TYPICAL TABULATED DATA</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Calibrator</th> <th>OD 1</th> <th>OD 2</th> <th>Mean OD</th> <th>Value (ng/mL)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>2.193</td><td>2.189</td><td>2.191</td><td>0</td></tr> <tr><td>1</td><td>1.984</td><td>2.001</td><td>1.993</td><td>0.2</td></tr> <tr><td>2</td><td>1.806</td><td>1.814</td><td>1.810</td><td>0.5</td></tr> <tr><td>3</td><td>0.864</td><td>0.911</td><td>0.888</td><td>4</td></tr> <tr><td>4</td><td>0.543</td><td>0.526</td><td>0.535</td><td>10</td></tr> <tr><td>5</td><td>0.273</td><td>0.245</td><td>0.259</td><td>40</td></tr> <tr><td>Unknown</td><td>0.398</td><td>0.368</td><td>0.383</td><td>20</td></tr> </tbody> </table>	Calibrator	OD 1	OD 2	Mean OD	Value (ng/mL)	0	2.193	2.189	2.191	0	1	1.984	2.001	1.993	0.2	2	1.806	1.814	1.810	0.5	3	0.864	0.911	0.888	4	4	0.543	0.526	0.535	10	5	0.273	0.245	0.259	40	Unknown	0.398	0.368	0.383	20	<p style="text-align: center;"><b>TYPICAL TABULATED DATA</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Calibrator</th> <th>Mean OD (450 nm)</th> <th>Value (ng/ml)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>Calibrator 0</td><td>2.450</td><td>0</td></tr> <tr><td>Calibrator 1</td><td>2.103</td><td>0.2</td></tr> <tr><td>Calibrator 2</td><td>1.450</td><td>1</td></tr> <tr><td>Calibrator 3</td><td>0.693</td><td>5</td></tr> <tr><td>Calibrator 4</td><td>0.340</td><td>15</td></tr> <tr><td>Calibrator 5</td><td>0.146</td><td>40</td></tr> <tr><td>Unknown</td><td>1.032</td><td>2.3</td></tr> </tbody> </table>	Calibrator	Mean OD (450 nm)	Value (ng/ml)	Calibrator 0	2.450	0	Calibrator 1	2.103	0.2	Calibrator 2	1.450	1	Calibrator 3	0.693	5	Calibrator 4	0.340	15	Calibrator 5	0.146	40	Unknown	1.032	2.3
Calibrator	OD 1	OD 2	Mean OD	Value (ng/mL)																																																													
0	2.193	2.189	2.191	0																																																													
1	1.984	2.001	1.993	0.2																																																													
2	1.806	1.814	1.810	0.5																																																													
3	0.864	0.911	0.888	4																																																													
4	0.543	0.526	0.535	10																																																													
5	0.273	0.245	0.259	40																																																													
Unknown	0.398	0.368	0.383	20																																																													
Calibrator	Mean OD (450 nm)	Value (ng/ml)																																																															
Calibrator 0	2.450	0																																																															
Calibrator 1	2.103	0.2																																																															
Calibrator 2	1.450	1																																																															
Calibrator 3	0.693	5																																																															
Calibrator 4	0.340	15																																																															
Calibrator 5	0.146	40																																																															
Unknown	1.032	2.3																																																															
Old performance characteristics	New performance characteristics																																																																
<p><b>EXPECTED NORMAL VALUES</b></p> <p>As for all clinical assays each laboratory should collect data and establish their own range of expected normal values.</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Group</th> <th>Range (ng/mL)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>Females</td><td>1-12</td></tr> <tr><td>Males</td><td>3-11</td></tr> </tbody> </table>	Group	Range (ng/mL)	Females	1-12	Males	3-11	<p><b>EXPECTED NORMAL VALUES</b></p> <p>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.</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Group</th> <th>95% Confidence Range (ng/mL)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>Females</td><td>1.2 – 6.3</td></tr> <tr><td>Males</td><td>1.7 – 6.1</td></tr> </tbody> </table>	Group	95% Confidence Range (ng/mL)	Females	1.2 – 6.3	Males	1.7 – 6.1																																																				
Group	Range (ng/mL)																																																																
Females	1-12																																																																
Males	3-11																																																																
Group	95% Confidence Range (ng/mL)																																																																
Females	1.2 – 6.3																																																																
Males	1.7 – 6.1																																																																



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 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 in the sample. A set of standards is used to plot a standard 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 hypo- adrenalism, and elevated levels may occur in several conditions including virilizing adrenal adenoma and carcinoma, 21-hydroxylase and 3 $\beta$ -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 control 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 50, 100, 150 and 300  $\mu$ 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 (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** **HRP** **DHEA-Horseradish Peroxidase (HRP) Conjugate** - Ready To Use.

Contents: DHEA-HRP conjugate in a protein-based buffer with a non-mercury preservative.  
 Volume: 14 mL/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.

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 control 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 vial 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

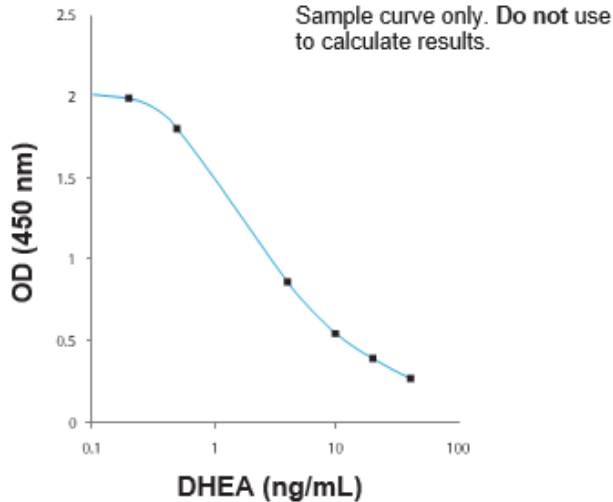
1. Calculate the mean optical density of each calibrator duplicate.
2. Draw a calibration curve on semi-log paper with the mean optical densities on the Y-axis and the calibrator concentrations on the X-axis. If immunoassay software is being used, a 4-parameter or a 5-parameter curve is recommended.
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 (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 (450 nm)	Value (ng/ml)
Calibrator 0	2.450	0
Calibrator 1	2.103	0.2
Calibrator 2	1.450	1
Calibrator 3	0.693	5
Calibrator 4	0.340	15
Calibrator 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  $\sigma B$  and  $\sigma S$  are the standard deviation of the blank and low value sample and  $\mu B$  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 Direct 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 ten 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 calibrator 0. 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	6.3	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? J Clin Endocrinol Metab. 1996; 81(9):3147–51.
- Chasalow FI, Blethen SL. Dehydroepiandrosterone (DHEA) Measurements in Cord Blood. Steroids. 1985; 45(2):187–93.

Revision date : 2020-09-04

Other translations of this Instructions for Use can be downloaded from our website: <https://www.diasource-diagnostics.com/>



Para la determinación cuantitativa directa de la dehidroepiandrosterona (DHEA) en suero humano mediante 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

### INDICACIONES

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

### PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El principio del siguiente inmunoensayo enzimático sigue la típica situación de unión competitiva. Se produce competición entre un antígeno no marcado (presente en los estándares, controles y muestras del paciente) y un antígeno marcado con una enzima (conjugado) por un número limitado de lugares de unión de anticuerpos de la microplaca. Los procedimientos de lavado y decantación eliminan los materiales no unidos. El sustrato enzimático se añade después del paso de lavado. La reacción enzimática se detiene añadiendo solución de parada. Se mide la absorbancia con un lector de placas de microvaloración. La intensidad del color formado es inversamente proporcional a la concentración de DHEA de la muestra. Se utiliza un conjunto de estándares para trazar una curva estándar en la que poder leer directamente la cantidad de DHEA de las muestras del paciente y los controles.

### APLICACIONES CLÍNICAS

La dehidroepiandrosterona (DHEA) es un esteroide C19 que se produce en la corteza suprarrenal y, en menor medida, en las gónadas. La DHEA actúa como precursor en la síntesis de la testosterona y los estrógenos. Debido a la presencia de un grupo 17-oxo, la actividad androgénica de la DHEA es relativamente débil; se ha estimado que es un ~10% de la de la testosterona. No obstante, en neonatos, niños prepúberes y mujeres adultas, los niveles de DHEA en circulación pueden ser varias veces superiores a las concentraciones de testosterona, lo que puede dar lugar a una rápida conversión del tejido periférico en potentes andrógenos (androstendiona y testosterona) y estrógenos. Además, la DHEA tiene una afinidad relativamente baja con la globulina fijadora de hormonas sexuales. Estos factores pueden aumentar la biopotencia fisiológica de la DHEA.

El papel fisiológico de la DHEA no se ha definido concluyentemente. Se han demostrado diversos efectos *in vivo* e *in vitro*, incluidos efectos antitumorales, provocando la prevención y/o la regresión de cánceres de piel y colon espontáneos o inducidos químicamente en roedores. Algunos informes sugieren que en las mujeres con riesgo de padecer cáncer de mama la producción de DHEA es baja. Se ha notificado actividad terapéutica de la DHEA en animales con diabetes de origen genético, obesidad y enfermedad cardiovascular. La DHEA también tiene efecto en la función inmune, el metabolismo de lípidos, el colesterol, el sistema nervioso, el envejecimiento y la protección contra el desarrollo de virus.

Los niveles de DHEA en suero de fetos y neonatos son relativamente altos, bajos durante la infancia y aumentan durante la pubertad y hasta la tercera década de vida. No aparecen cambios constantes en los niveles de DHEA en suero durante el ciclo menstrual ni el embarazo. La DHEA tiene una tasa de eliminación metabólica rápida en comparación con su conjugado sulfatado, la DHEA-S. Debido a esto, los niveles de DHEA en suero son entre 100 y 1000 veces menores que los niveles de DHEA-S. Además, los niveles de DHEA en suero muestran una significativa variación diaria, lo que depende de la corticotropina (ACTH). La determinación de la DHEA en suero es un marcador útil para la síntesis de este andrógeno suprarrenal. En el hipoadrenalismo pueden aparecer niveles anormalmente bajos, y los niveles elevados pueden ocurrir en presencia de enfermedades graves como el adenoma y el carcinoma suprarrenal virilizante, la deficiencia de 21-hidroxilasa y 3 $\beta$ -hidroxisteroide deshidrogenasa y en algunos casos de hirsutismo femenino.

### PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS SOBRE EL PROCEDIMIENTO

1. Los usuarios deben tener un completo conocimiento de este protocolo para que la utilización de este kit sea eficaz. Se obtendrá una eficacia diagnóstica fiable únicamente observando estricta y cuidadosamente las instrucciones proporcionadas.
2. Los materiales de control o las mezclas de sueros deberían incluirse en cada análisis a un nivel alto y bajo para evaluar la fiabilidad de los resultados.
3. Cuando se especifique utilizar agua para la dilución o reconstitución, use agua desionizada o destilada.
4. Para reducir la exposición a sustancias potencialmente nocivas, se deberán llevar guantes al manipular los reactivos del kit y las muestras humanas.

5. Todos los reactivos del kit y las muestras deberán estar a temperatura ambiente y mezclarse suavemente pero completamente antes de utilizar. Evite congelar y descongelar los reactivos y las muestras repetidamente.

6. Debe establecerse una curva de calibración para cada análisis.

7. Los controles deben incluirse en cada análisis y encontrarse dentro de los límites de confianza establecidos.

8. Cuando los valores del control no se encuentren dentro de los márgenes establecidos pueden indicar unas técnicas inadecuadas del procedimiento, un pipeteo impreciso, un lavado incompleto, así como una conservación inadecuada del reactivo.

9. Al leer la microplaca, la presencia de burbujas en los micropocillos afectará a las densidades ópticas (DO). Elimine con cuidado las burbujas antes de realizar el paso de lectura.

10. La solución de sustrato (TMB) es fotosensible, debiendo permanecer incolora si se conserva correctamente. La aparición de un color azul podría indicar inestabilidad o contaminación, en cuyo caso no debería utilizarse.

11. Al dispensar el sustrato y la solución de parada, no deben emplearse pipetas en las que estos líquidos entren en contacto con partes metálicas.

12. Con objeto de prevenir la contaminación de los reactivos, utilice una punta de pipeta desechable nueva para la dispensación de cada reactivo, muestra, calibrador y control.

13. No mezcle varios números de lote de componentes del kit en una misma prueba y no utilice ningún componente si se ha pasado la fecha de caducidad impresa en la etiqueta.

14. Los reactivos del kit deben considerarse residuos peligrosos y desecharse de conformidad con la normativa nacional.

### LIMITACIONES

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

2. No utilice suero muy hemolizado, muy lipémico, icterico o almacenado inadecuadamente.

3. Las muestras o sueros de control que contengan azida o tiomersal no son compatibles con este kit, ya que pueden producir resultados falsos.

4. Solo puede utilizarse el diluyente de la muestra de DHEA para diluir las muestras séricas altas. El uso de cualquier otro reactivo puede producir resultados falsos.

5. Los resultados obtenidos con este kit no deben utilizarse nunca como la única base para realizar un diagnóstico clínico. Por ejemplo, la aparición de anticuerpos heterofílicos en pacientes expuestos regularmente a animales o a productos para animales puede causar interferencias en las pruebas inmunológicas. Por consiguiente, el diagnóstico clínico debería incluir todos los aspectos de la historia de un paciente, incluyendo la frecuencia de la exposición a animales o sus productos si se sospecha de resultados falsos.

### PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS DE SEGURIDAD MATERIAL DE POTENCIAL RIESGO BIOLÓGICO

Se ha analizado el suero humano que puede utilizarse en la preparación de los calibradores y controles, y ha resultado no ser reactivo para el antígeno de superficie de la hepatitis B; también se ha analizado para detectar la presencia de anticuerpos frente al VHC y al Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) y se ha determinado que es negativo. Sin embargo, ningún método de análisis puede ofrecer una garantía total de la ausencia de VIH, VHC y de virus de la hepatitis B ni de un microorganismo infeccioso. Los reactivos deben considerarse potencialmente biopeligrosos y deben manipularse con las mismas precauciones que se aplicarían a cualquier muestra sanguínea.

### RIESGOS QUÍMICOS

Evite el contacto con reactivos que contengan TMB, peróxido de hidrógeno y ácido sulfúrico. Si se produce el contacto con alguno de estos reactivos, lávese con abundante agua. La TMB es potencialmente carcinógena.

### RECOGIDA Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

Se requieren aproximadamente 0,2 ml de suero por cada determinación por duplicado. Recoja 4-5 ml de sangre en un tubo adecuadamente etiquetado y deje que coagule. Centrifugue y retire con cuidado la capa de suero. Conserve a 4 °C

durante un máximo de 24 horas o a -10 °C o inferior si los análisis se van a realizar en una fecha posterior. Considere todas las muestras humanas como materiales de posible riesgo biológico y tome las precauciones adecuadas cuando las manipule.

### PRETRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Este ensayo es un sistema directo y no requiere ningún pretratamiento de las muestras.

### REACTIVOS Y EQUIPO NECESARIO NO SUMINISTRADOS

1. Pipetas de precisión para dispensar 50, 100, 150 y 300 µl
2. Puntas de pipeta desechables
3. Agua destilada o desionizada
4. Agitador de microplacas
5. Lector de microplacas con un filtro ajustado a 450 nm y un límite de DO superior de 3,0 o mayor\* (véase el paso 10 del procedimiento del ensayo).
6. Diluyente de muestra de DHEA: si la lectura de alguna concentración de muestra es superior a 40 ng/ml, diluya la muestra con el diluyente de la muestra de DHEA a una dilución que no sea mayor de 1:4. El diluyente de la muestra de DHEA (KAPDB490-11) debe solicitarse por separado, para cualquier cantidad

### REACTIVOS PROPORCIONADOS

**LIU** **Microplaca de pocillos separables recubiertos con anticuerpos anti-DHEA de conejo** - Lista para usar.  
 Contenido: una microplaca de 96 pocillos (12 x 8) recubierta con anticuerpos policlonales en una bolsa resellable con desecante.  
 Conservación: Refrigerar a 2-8 °C  
 Estabilidad: 12 meses o según indique la etiqueta.

**Ag** **HRP** **Conjugado de DHEA-peroxidasa de rábano picante (HRP)** - Lista para usar.

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

**CAL** **N** **Calibradores de dehidroepiandrosterona** - Listos para usar. N = 0 a 5

Contenido: seis viales que contienen DHEA en un tampón de base proteica con un conservante sin mercurio. Preparados añadiendo matriz con una cantidad definida de DHEA.

\* A continuación se indican concentraciones aproximadas, consulte en las etiquetas de los viales 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

Almacenamiento: Refrigerar a 2-8 °C  
 Estabilidad: 12 meses sin abrir o según indique la etiqueta. Una vez abiertos, conserve los calibradores a 2-8 °C durante 14 días como máximo. Para periodos más largos, es aconsejable conservar partes alícuotas congeladas hasta la fecha de caducidad de la etiqueta. Evitar ciclos reiterados de congelación y descongelación.

**CONTROL** **N** **Controles** - Listos para usar.

Contenido: dos viales que contienen DHEA en un tampón de base proteica con un conservante sin mercurio. Preparados añadiendo suero con cantidades definidas de DHEA. Consulte en las etiquetas el intervalo aceptable.  
 Volumen: 0,6 ml/vial  
 Almacenamiento: Refrigerar a 2-8 °C  
 Estabilidad: 12 meses sin abrir o según indique la etiqueta. Una vez abierto, el control debe utilizarse antes de 14 días o conservarse congelado en partes alícuotas. Evitar ciclos reiterados de congelación y descongelación.

**WASH** **SOLN** **CONC** **Tampón de lavado concentrado**  X10

Contenido: un frasco que contiene tampón con un detergente no iónico y un conservante sin mercurio.  
 Volumen: 50 ml/frasco  
 Almacenamiento: Refrigerar a 2-8 °C  
 Estabilidad: 12 meses o según indique la etiqueta.

Preparación: diluir 1:10 en agua destilada o desionizada antes de usar. Si se va a utilizar la placa completa, diluir 50 ml del tampón de lavado concentrado en 450 ml de agua.

**CHROM** **TMB** **Sustrato de TMB** - Listo para usar.

Contenido: un frasco que contiene tetrametilbencidina y peróxido de hidrógeno en un tampón que no contenga DMF ni DMSO.  
 Volumen: 16 ml/frasco  
 Almacenamiento: Refrigerar a 2-8 °C  
 Estabilidad: 12 meses o según indique la etiqueta.

**STOP** **SOLN** **Solución de parada** - Lista para usar

Contenido: un vial con ácido sulfúrico 1 M.  
 Volumen: 6 ml/frasco  
 Almacenamiento: Refrigerar a 2-8 °C  
 Estabilidad: 12 meses o según indique la etiqueta.

### PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

**Pretratamiento de las muestras:**  
 Ninguno.

Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente antes de utilizar. Los calibradores, los controles y las muestras humanas deben analizarse por duplicado. Una vez que se haya iniciado al procedimiento, deben completarse todos los pasos sin interrupción.

1. Prepare la solución de trabajo del tampón de lavado.
2. Retire el número necesario de tiras de micropocillos. Vuelva a sellar la bolsa y a guardar las tiras no utilizadas en el frigorífico.
3. Pipetee 25 µl de cada calibrador, control y muestra en los pocillos marcados respectivamente por duplicado.
4. Pipetee 100 µl del conjugado de DHEA HRP en cada pocillo (recomendamos usar una pipeta multicanal).
5. Incube en un agitador de microplacas (aproximadamente a 200 rpm) durante 1 hora a temperatura ambiente.
6. Lave los pocillos 3 veces con 300 µl de tampón de lavado diluido por pocillo y dé unos golpecitos con la placa firmemente contra papel absorbente para asegurarse de que esté seca (se recomienda usar un lavador).
7. Pipetee 150 µl de sustrato de TMB en cada pocillo a intervalos regulares.
8. Incube en un agitador de microplacas durante 10-15 minutos a temperatura ambiente (o hasta que el calibrador 0 alcance el color azul oscuro de la DO deseada).
9. Pipetee 50 µl de solución de parada en cada pocillo a los mismos intervalos regulares que en el paso 7.
10. Lea la placa en un lector de microplacas a 450 nm antes de transcurridos 20 minutos después de la adición de la solución de parada.

\* Si la DO sobrepasa el límite superior de detección o si no se dispone de un filtro de 450 nm, puede sustituirse por un filtro de 415 nm. Las densidades ópticas serán inferiores, sin embargo, esto no afectará a los resultados de las muestras del paciente/control.

### CÁLCULOS

1. Calcule la densidad óptica media de cada duplicado del calibrador.
2. Trace una curva de calibración en papel semilogarítmico con las densidades ópticas medias en el eje de ordenadas (Y) y las concentraciones del calibrador en el eje de abscisas (X). Si se va a utilizar un software para inmunoensayos, se recomienda una curva de 4 o de 5 parámetros.
3. Calcule la densidad óptica media de cada duplicado desconocido.
4. Lea los valores de los desconocidos directamente de la curva de calibración.
5. Si la lectura de alguna muestra es superior a 40 ng/ml, dilúyala con el diluyente de la muestra de DHEA (KAPDB490-11) a una dilución que no sea mayor de 1:4. El resultado obtenido deberá multiplicarse por el factor de dilución.

### DATOS TÍPICOS TABULADOS

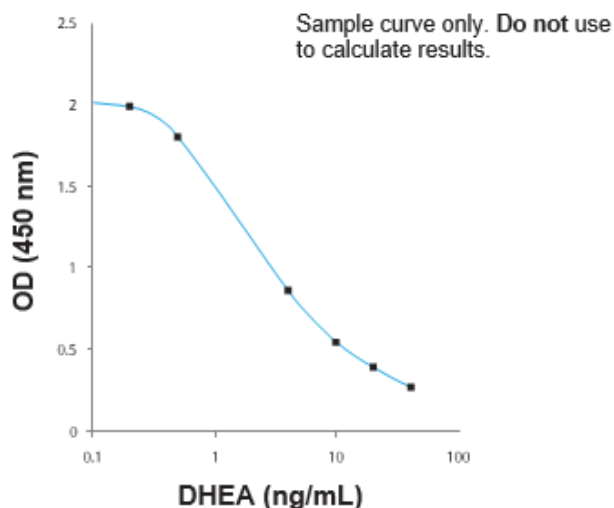
Calibrador	DO medio (450 nm)	Valor (ng/ml)
Calibrador 0	2,450	0
Calibrador 1	2,103	0,2



Calibrador 2	1,450	1
Calibrador 3	0,693	5
Calibrador 4	0,340	15
Calibrador 5	0,146	40
Desconocido	1,032	2,3

### CURVA TÍPICA DE CALIBRACIÓN

Solo curva de la muestra. **No** usar para calcular resultados.



### LINEALIDAD

Se diluyeron tres muestras de suero del paciente con calibrador 0. Los resultados (en ng/ml) se tabulan a continuación:

Muestra	Resultado obs.	Resultado esp.	% 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	6,3	113

### VALORES NORMALES ESPERADOS

Se analizaron 120 muestras de individuos presuntamente normales de entre 20 y 39 años de edad, y el rango de referencia se determinó mediante un método no paramétrico. Como en todos los análisis clínicos, cada laboratorio debería recoger datos y establecer su propio intervalo de valores normales esperados.

Grupo	Rango de confianza 95% (ng/ml)
Mujeres	1,2 – 6,3
Hombres	1,7 – 6,1

### EFICACIA DIAGNÓSTICA

#### SENSIBILIDAD

El límite de detección (LoD) se determinó a partir del análisis de 60 muestras del blanco y una muestra de valor bajo, y se calculó como sigue:

$LoD = \mu B + 1,645 \sigma B + 1,645 \sigma S$ , donde  $\sigma B$  y  $\sigma S$  son la desviación estándar del blanco y la muestra de valor bajo, y  $\mu B$  es el valor medio del blanco.

Se determinó que el límite de detección (LoD) era de 0,15 ng/ml.

#### ESPECIFICIDAD (REACTIVIDAD CRUZADA)

Se evaluó la reactividad cruzada de los siguientes compuestos con el kit Direct DHEA ELISA, siendo la reactividad cruzada de la DHEA del 100 %.

Esteroides	% Reactividad cruzada
DHEA	100
Adrenosterona	0,282
Androstendiona	0,610
Androsterona	0,248
Colesterol	0,152
Corticosterona	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

Fecha de revisión: 04/09/2020

### REFERENCIAS

- Baulieu, E.M., Dehydroepiandrosterone (DHEA): A fountain of youth? J Clin Endocrinol Metab. 1996; 81(9):3147-51.
- Chasalow FI, Blethen SL. Dehydroepiandrosterone (DHEA) Measurements in Cord Blood. Steroids. 1985; 45(2):187-93.

### PRECISIÓN INTRAENSAYO

Se analizaron tres muestras diez veces cada una con la misma curva de calibración. Los resultados (en ng/ml) se tabulan a continuación:

Muestra	Media	<> ± DE	%CV
1	1,36	0,148	10,9
2	4,28	0,280	6,5
3	12,10	0,500	4,1

### PRECISIÓN INTERENSAYO

Se analizaron tres muestras 20 veces cada una, 2 veces al día, con la misma curva de calibración. Los resultados (en ng/ml) se tabulan a continuación:

Muestra	Media	<> ± DE	%CV
1	1,30	0,173	13,3
2	3,90	0,385	9,9
3	10,70	0,900	8,4