

**Instructions for use / Gebrauchsanweisung****DHEA-S Saliva ELISA Free**

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

**REF****SA E-6500**

96

**IVD****CE**

**1. INTENDED USE**

Competitive immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination of DHEA-S concentration in saliva.

DHEA-S Saliva ELISA Free is intended for laboratory use only.

**1.1 Clinical Significance**

Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S) is an endogenous natural steroid hormone with 19 carbon atoms. It is the principal steroid hormone produced by the secretion of the adrenal glands, but it is also produced in the gonads and brain. DHEA-S is the most abundant circulating steroid in human beings.

DHEA-S is a natural steroid hormone found primarily in the kidneys and it is derived from the enzymatic conversion of DHEA in the adrenal and extra-adrenal tissues. It is the most abundant hormone in the human body and is a precursor of all sex steroids. As most DHEA-S is produced by the zona reticularis of the adrenal, it is argued that there is a role in the immune and stress response. DHEA-S may have more biologic roles: for example its production in the brain suggests a role as neurosteroid.

The majority of DHEA-S in saliva is non-protein bound and enters the saliva via intracellular mechanisms. Salivary DHEA-S levels are unaffected by salivary flow rate or salivary enzymes.

Measurement of serum DHEA-S is a useful marker of adrenal androgen synthesis. Abnormally low levels may occur in have been reported in hypoadrenalism, while elevated levels occur in several conditions, e.g. virilizing adrenal adenoma and carcinoma, 21-hydroxylase and 3β-hydroxysteroid dehydrogenase deficiencies and in some cases of female hirsutism. Women with polycystic ovary syndrome tend to have normal or mildly elevated levels of DHEAS.

**2. PRINCIPLE**

The DHEA-S (antigen) in the sample competes with the antigenic DHEA-S conjugated with horseradish peroxidase (HRP) for binding to the limited number of antibodies anti-DHEA-S coated on the microplate (solid phase).

After incubation, the bound/free separation is performed by a simple solid-phase washing.

Then, the enzyme HRP in the bound-fraction reacts with the Substrate (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and the TMB-Substrate and develops a blue colour that changes into yellow when the Stop Solution (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) is added.

The colour intensity is inversely proportional to the DHEA-S concentration of in the sample.

DHEA-S concentration in the sample is calculated through a standard curve.

**3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION**

**3.1 Reagents and materials supplied in the kit**

**Standards and Controls**

Cat. no.	Component	Standard	Volume/Vial
SA E-6501	STANDARD A	Standard A	1 ml
SA E-6502	STANDARD B	Standard B	1 ml
SA E-6503	STANDARD C	Standard C	1 ml
SA E-6504	STANDARD D	Standard D	1 ml
SA E-6505	STANDARD E	Standard E	1 ml
SA E-6551	CONTROL 1	Control 1	1 ml
SA E-6552	CONTROL 2	Control 2	1 ml

Content: ProClin > 0.0015% and BSA 0.1%

**SA E-6513 INC-BUFF Incubation Buffer**

Content: Phosphate buffer pH 7.5, BSA 1 g/l; ProClin > 0.0015%

Volume: 1 x 30 ml

**SA E-6540 CONJUGATE-CONC Enzyme Conjugate**

Content: DHEA-S conjugated with horseradish peroxidase (HRP); ProClin > 0.0015% and BSA 0.1%

Volume: 1 x 1 ml

**SA E-6531 96 Microtiterwells**

Content: Anti DHEA-S antibody adsorbed on microplate

Volume: 1 microplate breakable

**MS E-0055**      **SUBSTRATE**                      **TMB Substrate**  
 Content:            H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-TMB 0.26 g/l (avoid any skin contact); ProClin < 0.0015%  
 Volume:            1 x 15 ml

**MS E-0080**      **STOP-SOLN**                      **Stop Solution**  
 Content:            Sulphuric acid 0.15 mol/l (avoid any skin contact)  
 Volume:            1 x 15 ml

**SA E-0030**      **WASH-CONC 50x**                      **Wash Solution 50X**  
 Content:            NaCl 45 g/l, Tween 20, 55 g/l; ProClin > 0.0015%  
 Volume:            1 x 20 ml

### 3.2 Reagents necessary not supplied

Distilled water.

### 3.3 Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.

Microplates reader (450 nm, 620 – 630 nm).

Saliva Collection Device or Salivette Sarstedt **REF** 51.1534.500


### Note

Store all reagents at 2 °C – 8 °C in the dark.

Open the bag of the Coated Microplate only when it is at room temperature and close it immediately after use; once opened the microplate is stable until the 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.
- Some reagents (Standards, Controls, Incubation Buffer, Conjugate and Wash Solution) contain small amounts of ProClin™ 300 (> 0.0015%, < 0.06%) as preservative. Avoid the contact with skin or mucosa.
- Classification according to Regulation (EC) No. 1272/2008 [CLP]

Skin sensitivity, Category 1	
	Contains: ProClin 300
Warning	
<u>Hazard statements:</u>	
H317 – May cause an allergic skin reaction.	
<u>Precautionary statements:</u>	
P261 – Avoid breathing dust/fume/gas/mist/vapours/spray.	
P280 – Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection/hearing protection.	
P321 – Specific treatment (see supplemental first aid instruction on this label).	
P333+P313 – If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention.	
P362+P364 – Take off contaminated clothing and wash it before reuse.	

- 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/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.
- This method allows the determination of DHEA-S from 0.2 ng/ml to 12 ng/ml.
- The clinical significance of the determination DHEA-S can be invalidated if the patient was treated with cortisone or natural or synthetic steroids.

### 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 °C – 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 °C – 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 saliva samples.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of reagents.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

## 6. PROCEDURE

### 6.1 Preparation of the Standards (STD A – E)

Before use, mix for 5 minutes with a rotating mixer.

The Standards are ready to use and have the following concentrations of DHEA-S:

	STD A	STD B	STD C	STD D	STD E
ng/ml	0	0.2	1.0	3.0	12.0

Samples with concentration greater than 12.0 ng/ml have to be diluted 1:2 with Standard A.

Once opened, the Standards are stable at 2 °C – 8 °C for 6 months.

For SI UNITS: ng/ml × 2.71 = nmol/l

### 6.2 Preparation of Diluted Conjugate

Prepare immediately before use.

Add 10 µl of Conjugate to 1.0 ml of Incubation Buffer. Mix gently.

Stable 3 hours at room temperature (22 °C – 28 °C).

### 6.3 Preparation of Wash Solution

Dilute the content of each vial of "Wash Solution 50X" 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 °C – 8 °C.

### 6.4 Preparation of the Sample

The determination of DHEA-S with this kit should be performed in saliva.

It is recommended to collect saliva samples with a centrifuge glass tube and a plastic straw, with the Saliva Collection Device or with the "Salivette" (Sarstedt, Ref. 51.1534.500).

Other commercially available sample collector devices have not been tested.

#### 6.4.1 Method and Limitations

Collect saliva samples at the times indicated.

If no specific instructions have been given, saliva samples may be collected at any time, paying attention to the following indications:

- If saliva collection is carried out in the morning ensure that this is carried out prior to brushing teeth.
- During the day allow 1 hour after a meal, oral intake of pharmaceutical drugs or tooth cleaning.
- It is very important that a good clear sample is received – i.e. no contamination with food, lipstick, blood (bleeding gums) or other extraneous materials.

#### 6.4.2 Saliva Processing Instructions with glass tubes

Let the saliva flow down through the straw into the centrifuge glass tube.

1. Centrifuge the sample for 15 minutes at 3000 rpm
2. Store at -20 °C for at least 1 hour
3. Centrifuge again for 15 minutes at 3000 rpm
4. The saliva sample is now ready to be tested.
5. Store the sample at 2 °C – 8 °C for one week or at -20 °C for longer time.

### 6.4.3 Saliva Processing Instructions with *Salivette Sardstedt*

1. Remove the swab from the suspended insert of the Salivette
2. Gently chewing the swab for 1 minute produces a sufficient quantity of saliva.
3. Replace the swab into the Salivette and firmly close the tube using the stopper.
4. Centrifuge the Salivette for 2 minutes at 1000g (rcf) for saliva generation.
5. Remove the insert complete with the swab from the centrifuge vessel and discard. The clear saliva is now ready for analysis (at least 1 ml of saliva should be recovered with this method).

### 6.5 Procedure

- **Allow all reagents to reach room temperature (22 °C – 28 °C).** At the end of the assay, store immediately the reagents at 2 °C – 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 °C – 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 standard curve (STD A – E), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Standard	Sample/ Controls	Blank
Sample/ Controls		50 µl	
Standards A – E	50 µl		
Diluted conjugate	150 µl	150 µl	
Incubate at 37 °C for 15 minutes. Remove the contents from each well; wash the wells 3 times with 0.3 ml of diluted wash solution. <b>Important note:</b> 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. <b>Automatic washer:</b> if you use automated equipment, wash the wells at least 5 times.			
TMB Substrate	100 µl	100 µl	100 µl
Incubate at room temperature (22 °C – 28 °C) for 15 minutes in the dark.			
Stop Solution	100 µl	100 µl	100 µl
Shake the microplate gently. 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-S 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 absorbance (Em) for each point of the standard curve (STD A – E) and of each sample.

### 8.2 Standard Curve

Plot the mean value of absorbance (Em) of the Standards (STD A – E) 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 standard curve to obtain the corresponding values of the concentrations expressed in ng/ml.

### 9. REFERENCE VALUES

As the values of salivary DHEA-S have a circadian pattern we suggest to collect the samples at the same hour (8 A.M.).

The following values can be used as preliminary guideline until each laboratory established its own normal range.

	ng/ml
WOMEN	0.2 – 2.5
MEN	0.2 – 2.7

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 measurements (14x) of two different control sera in one assay. The within assay variability is  $\leq 7.8\%$ .

##### 10.1.2 Inter Assay Variation

Between run variation was determined by replicate measurements (9x) of three different control sera with different lots of kit. The between assay variability is  $\leq 14.9\%$ .

#### 10.2 Accuracy

The recovery of 0.5 – 1.5 – 6.0 ng/ml of DHEA-S added to sample gave an average value ( $\pm$ SD) of  $108.86\% \pm 3.27\%$  with reference to the original concentrations.

#### 10.3 Sensitivity

The lowest detectable concentration of DHEA-S that can be distinguished from the Standard A is 0.05 ng/ml at the 95% confidence limit.

#### 10.4 Specificity

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

DHEA-S	90%
DHEA	100%
Androsterone-S-Na	48%
Androstendione	20%
Etiocolanone-S-Na	0.2%
5-Androstendione	0.01%
Testosterone	0.01%
Progesterone	0.01%
17 OH Progesterone	0.01%
Estrone	0.01%
Cortisol	0.001%
Cholesterolo	0.001%

#### 10.5 Correlation

The DHEA-S Saliva ELISA<sup>Free</sup> was compared to an analogous commercially available kit. 31 saliva samples were analysed according in both test systems.

The linear regression curve was calculated:

$$y = 0.37x + 1.10$$

$$r^2 = 0.826$$

(y = DHEA-S Saliva ELISA<sup>Free</sup>, x = DHEA-S Saliva Salimetrics Kit)

## 11. WASTE MANAGEMENT














Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

## 12. BIBLIOGRAPHY

1. Joshi, U. M., et al. Steroids 34 (1) 35 (1979)
2. Turkes, A., et al. J Endocrinol. 81 (2) P165 (1979)
3. Ismail A.A, et al. J.Clin.Endocr.Metab. 34,177-184 (1972)
4. Rajkowski,K.M, et al. Steroids 29 no 5 (1977)
5. Widsdom G.B. Clin. Chem. 22/8, 1243 - 1255 (1976)
6. Abraham G.E, et al. Obstet.Gynecol.,47(4),395 (1976)
7. Abraham G.E, et al. Obstet. Gynecol.,53(1),111 (1979)
8. Hopper B.R, et al. J.Clin.Endoc.Metab.40(3),458 (1975)
9. Winter J.S.D,et al. Clin.Obste.and Gynec.,21(1),67 (1978)
10. D. Riad et al. Endocr. Reviews, 3 (4) 304 367 (1978)

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

### Symbols:

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

**1. VERWENDUNGSZWECK**

Kompetitives immunenzymatisches kolorimetrisches Verfahren zur quantitativen Bestimmung der DHEA-S-Konzentration im Speichel.  
 Der DHEA-S Saliva ELISA <sup>Free</sup> ist nur für Laborzwecke bestimmt.

**1.1 Klinische Relevanz**

Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEA-S) ist ein endogenes, natürlich vorkommendes Steroidhormon mit 19 C-Atomen. Dieses Steroidhormon wird hauptsächlich in der Nebenniere gebildet, jedoch zusätzlich auch in den Keimdrüsen und im Hirn. DHEA-S ist das am häufigsten vorkommende Steroidhormon beim Menschen. DHEA-S ist ein natürliches Steroidhormon, das primär in der Niere vorkommt. Es entsteht durch eine enzymatische Umwandlung von DHEA in der Nebenniere und im umliegenden Gewebe. Es ist das häufigste Hormon im menschlichen Körper und eine Vorstufe der Sexualsteroiden. Da das meiste DHEA-S in der Zona reticularis (Nebennierenrinde) produziert wird, wird darüber diskutiert, dass es eine Rolle bei der Immun- und Stressreaktion spielt. DHEA-S kann eine weitere biologische Rolle spielen, denn beispielsweise deutet die Produktion im Hirn auf eine Funktion als Neurosteroid hin. Die Mehrheit des DHEA-S in Speichel ist nicht proteingebunden und erreicht den Speichel durch einen intrazellulären Mechanismus. Das DHEA-S-Level im Speichel wird weder von der Durchflussmenge noch von den Speichelenzymen beeinflusst. Die Messung von DHEA-S im Serum ist ein nützlicher Marker für die adrenale Androgensynthese. Abnormal niedrige Level könnten ein Zeichen für Hypoadrenalismus sein. Erhöhte Level dagegen können verschiedene Ursachen haben, wie z.B. Virilisierung (Vermännlichung), Nebennierentumore (Adenom oder Karzinom), 21-Hydroxylase- und 3β-Hydroxysteroid-Dehydrogenasemangel und in manchen Fällen auch Hirsutismus. Frauen mit Polyzystischem Ovarial-Syndrom tendieren dazu, ein normales bis leicht erhöhtes DHEA-S-Level zu haben.

**2. TESTPRINZIP**

Das DHEA-S (Antigen) in der Probe konkurriert mit an Meerrettich-Peroxidase (HRP) gebundenem DHEA-S-Antigen um die Anlagerung an eine begrenzte Anzahl von Anti-DHEA-S-Antikörpern auf der Mikrotiterplatte (feste Phase). Nach der Inkubation werden gebundenes und freies Antigen durch einfach durchzuführendes Waschen der festen Phase getrennt. Dann reagiert das Enzym HRP in der gebundenen Fraktion mit dem Substrat (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) und dem TMB-Substrat und entwickelt eine blaue Färbung, die sich nach gelb verändert, wenn die Stopplösung (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) hinzugefügt wird. Die Intensität der Färbung ist umgekehrt proportional zur DHEA-S-Konzentration in der Probe. Die DHEA-S-Konzentration in der Probe wird mit einer Standardkurve berechnet.

**3. REAGENZIIEN, MATERIALIEN UND GERÄTEAUSSTATTUNG**

**3.1 Im Testkit enthaltene Reagenzien und Materialien**

**Standards und Kontrollen**

Artikelnr.	Komponente	Standard	Volumen/Fläschchen
SA E-6501	STANDARD A	Standard A	1 ml
SA E-6502	STANDARD B	Standard B	1 ml
SA E-6503	STANDARD C	Standard C	1 ml
SA E-6504	STANDARD D	Standard D	1 ml
SA E-6505	STANDARD E	Standard E	1 ml
SA E-6551	CONTROL 1	Kontrolle 1	1 ml
SA E-6552	CONTROL 2	Kontrolle 2	1 ml

Inhalt: ProClin > 0,0015% und BSA 0,1%

**SA E-6513 INC-BUFF Incubation Buffer (Inkubationspuffer)**


Inhalt: Phosphatpuffer pH 7,5, BSA 1 g/l; ProClin > 0,0015%

Volumen: 1 x 30 ml

**SA E-6540 CONJUGATE-CONC Enzyme Conjugate (Enzymkonjugat)**

Inhalt: DHEA-S konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase (HRP); ProClin > 0,0015% und BSA 0,1%

Volumen: 1 x 1 ml

<b>SA E-6531</b>		<b>Microtiterwells</b>
Inhalt:	Anti-DHEA-S-Antikörper an die Mikrotiterplatte gebunden	
Volumen:	1 Mikrotiterplatte zum Auseinanderbrechen	
<b>MS E-0055</b>	<b>SUBSTRATE</b>	<b>TMB Substrate (Substratlösung)</b>
Inhalt:	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -TMB 0,26 g/l (Hautkontakt vermeiden); ProClin < 0,0015%	
Volumen:	1 x 15 ml	
<b>MS E-0080</b>	<b>STOP-SOLN</b>	<b>Stop Solution (Stopplösung)</b>
Inhalt:	Schwefelsäure 0,15 M (Hautkontakt vermeiden)	
Volumen:	1 x 15 ml	
<b>SA E-0030</b>	<b>WASH-CONC</b> <b>50x</b>	<b>Wash Solution 50X (Waschlösung)</b> – 50-fach konzentriert
Inhalt:	NaCl 45 g/l, Tween 20, 55 g/l; ProClin > 0,0015%	
Volumen:	1 x 20 ml	

### 3.2 Nicht im Testkit enthaltene erforderliche Reagenzien

Destilliertes Wasser

### 3.3 Erforderliche Hilfsmittel und Geräteausstattung

Pipetten

Mikrotiterplatten-Lesegerät (450 nm, 620 – 630 nm)

Sammelgefäß für Speichelproben oder Salivette Sarstedt **REF** 51.1534.500

### Wichtige Hinweise


Alle Testkit-Reagenzien bei 2 °C – 8 °C im Dunkeln lagern.

Den Beutel mit der Beschichteten Mikrotiterplatte erst öffnen, wenn er Raumtemperatur angenommen hat und sofort nach Gebrauch wieder verschließen.

Geöffnet ist die Mikrotiterplatte bis zum Ablauf des Verfalldatums des Testkits haltbar.

### 4. WARNHINWEISE

- Dieses Testkit ist nur für In-vitro-Diagnostik zur Anwendung durch Fachpersonal bestimmt. Nicht zur inneren oder äußeren Anwendung bei Mensch oder Tier geeignet.
- Beim Arbeiten mit den enthaltenen Reagenzien geeignete persönliche Schutzausrüstung verwenden.
- Beim Arbeiten mit Blutprodukten die GLP- („Good laboratory practice“) Richtlinien befolgen.
- Manche Reagenzien (Standards, Kontrollen, Inkubationspuffer, Konjugat und Waschlösung) enthalten kleine Mengen an Proclin 300 (> 0,0015% – < 0,06%) als Konservierungsmittel. Kontakt mit der Haut oder Schleimhaut vermeiden.

Skin sens 1	
	Enthält: ProClin 300
Achtung	
<u>Gefahrenhinweise:</u>	
H317 – Kann allergische Hautreaktionen verursachen.	
<u>Sicherheitshinweise:</u>	
P261 – Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden.	
P280 – Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.	
P321 – Besondere Behandlung (siehe Erste Hilfe Anweisungen auf diesem Kennzeichnungsetikett).	
P333+P313 – Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.	
P362+P364 – Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.	

- Das TMB-Substrat enthält eine reizende Substanz, die beim Einatmen, Verschlucken oder der Aufnahme über die Haut gesundheitsschädlich sein kann. Um eine Schädigung zu verhindern, Einatmen, Verschlucken oder Kontakt mit der Haut oder den Augen vermeiden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure. Schwefelsäure ist giftig und ätzend und kann bei Einnahme toxisch sein. Um Verätzungen zu verhindern, Kontakt mit der Haut oder den Augen vermeiden.
- Reagenz TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> keinem direkten Sonnenlicht, Metallen oder Oxidationsmitteln aussetzen. Die Lösung nicht einfrieren.
- Mit diesem Verfahren können DHEA-S-Konzentrationen von 0,2 ng/ml bis 12 ng/ml bestimmt werden.
- Die DHEA-S-Bestimmung hat möglicherweise keine klinische Aussagekraft, wenn der Patient mit Cortison oder natürlichen bzw. synthetischen Steroiden behandelt wurde.

## 5. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Die Reihenfolge der Pipettierschritte muss genau wie in dieser Anleitung angegeben eingehalten werden. Die hier dargestellten Daten zur Performance wurden unter Verwendung der in dieser Gebrauchsanweisung genannten spezifischen Reagenzien ermittelt.
- Alle Reagenzien im Originalbehälter kühl bei 2 °C – 8 °C lagern. Ausnahmen werden deutlich gekennzeichnet. Bei sachgemäßer Lagerung und Verwendung sind die Reagenzien bis zum Verfalldatum haltbar.
- Vor der Verwendung müssen alle Testkit-Komponenten und Proben Raumtemperatur (22 °C – 28 °C) annehmen und gut gemischt werden.
- Die Testkit-Komponenten zwischen unterschiedlichen Chargen nicht austauschen. Das auf dem Karton und den Fläschchen aufgedruckte Verfalldatum muss eingehalten werden. Die Testkit-Komponenten nach Ablauf ihres Verfalldatums nicht mehr verwenden.
- Wenn Sie automatische Geräte verwenden, unterliegt es Ihrer Verantwortung zu überprüfen, ob die Tests mit dem Kit ordnungsgemäß durchgeführt wurden.
- Unvollständige oder ungenaue Entfernung der Flüssigkeit aus den Vertiefungen kann die Testpräzision beeinträchtigen und/oder den Hintergrund verstärken. Bei Verwendung von automatischen Systemen wird empfohlen die Anzahl der Waschschriffe zu erhöhen, um die Test-Performance zu verbessern.
- Die Reaktionszeit muss für alle Vertiefungen konstant gehalten werden, damit die Ergebnisse reproduzierbar sind. Das Pipettieren der Proben sollte nicht länger als 10 Minuten dauern, um Testabweichungen zu vermeiden. Falls mehr als 10 Minuten benötigt werden, muss die Reihenfolge des Pipettierens eingehalten werden. Bei Verwendung von mehreren Platten wird empfohlen, die Dosis-Wirkungs-Kurve für jede Platte zu wiederholen.
- Durch die Zugabe der TMB-Substratlösung wird eine kinetische Reaktion gestartet, die durch das Hinzufügen der Stopplösung beendet wird. Deshalb müssen die TMB-Substrat- und die Stopplösung jeweils in derselben Reihenfolge pipettiert werden, um Zeitabweichungen während der Reaktion zu vermeiden.
- Die Richtlinien zur Qualitätskontrolle im medizinischen Labor müssen befolgt werden, indem Kontrollen und/oder gepoolte Speichelproben mit untersucht werden.
- Beim Lösen und Pipettieren der Reagenzien ist größte Genauigkeit erforderlich.
- Mikrotiterplatten-Lesegeräte lesen vertikal ab. Nicht die Unterseite der Vertiefungen berühren.

## 6. TESTDURCHFÜHRUNG

### 6.1 Vorbereitung der Standards (STD A – E)

Vor der Verwendung 5 min mit einem rotierenden Schüttelgerät mischen.

Die Kalibratoren sind gebrauchsfertig und haben die folgenden DHEA-S-Konzentrationen:

	STD A	STD B	STD C	STD D	STD E
ng/ml	0	0,2	1,0	3,0	12,0

Proben mit Konzentrationen größer als 12,0 ng/ml müssen 1:2 mit Standard A verdünnt werden.

Nach dem Öffnen sind die Standards 6 Monate bei 2 °C – 8 °C haltbar.

Umrechnung in SI-Einheiten:  $\text{ng/ml} \times 2,71 = \text{nmol/l}$

### 6.2 Herstellung des verdünnten Konjugats

Erst direkt vor der Verwendung herstellen.

10 µl Konjugat zu 1,0 ml Inkubationspuffer hinzufügen. Vorsichtig mischen.

3 Stunden bei Raumtemperatur (22 °C – 28 °C) haltbar.

### 6.3 Vorbereitung der Waschlösung

Der Inhalt jeder Flasche der gepufferten konzentrierten Waschlösung (50x) muss vor der Verwendung mit destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 1000 ml aufgefüllt werden.

Bei kleineren Volumina entsprechend im Verhältnis 1:50 verdünnen.

Die verdünnte Waschlösung ist 30 Tage bei 2 °C – 8 °C haltbar.

### 6.4 Sammlung von Speichelproben

Mit diesem Testkit wird die DHEA-S-Konzentration in Speichelproben bestimmt.

Es wird empfohlen, Speichelproben mit einem Zentrifugenröhrchen aus Glas und einem Kunststoff-Trinkhalm, mit einem Speichelsammelgefäß oder mit der "Salivette" (Sarstedt, Ref. 51.1534.500) zu sammeln.

Andere kommerziell erhältliche Probensammelgefäße wurden nicht getestet.

#### 6.4.1 Verfahren und Bedingungen für die Probensammlung

Speichelproben zu den angegebenen Zeiten sammeln.

Wenn keine besonderen Anweisungen gegeben sind, können die Speichelproben jederzeit gesammelt werden; dabei bitte Folgendes beachten:

- a) Wenn der Speichel morgens gesammelt wird, soll dies vor dem Zähneputzen durchgeführt werden.

- b) Tagsüber vor dem Sammeln von Speichelproben 1 Stunde lang nichts essen oder trinken, keine Medikamente einnehmen und nicht Zähne putzen.
- c) Es ist sehr wichtig, eine gute klare Probe zu erhalten, d.h. sie darf nicht mit Essen, Lippenstift, Blut (Zahnfleischbluten) oder anderen fremden Materialien verunreinigt sein.

#### 6.4.2 Vorbereitung der Speichelproben in Glasröhrchen

Den Speichel durch den Halm in das Zentrifugenröhrchen aus Glas fließen lassen.

1. Die Probe 15 Minuten bei 3000 rpm zentrifugieren.
2. Mindestens 1 Stunde bei -20 °C einfrieren.
3. Die Probe nochmals 15 Minuten bei 3000 rpm zentrifugieren.
4. Die Speichelprobe ist nun testbereit.
5. Die Probe kann eine Woche lang bei 2 °C – 8 °C oder bei -20 °C für längere Zeit gelagert werden.

#### 6.4.3 Vorbereitung der Speichelproben in der Sarstedt Salivette

1. Die Watterolle aus dem Einhängengefäß im Inneren der Salivette herausnehmen.
2. Auf der Watterolle ca. 1 Minute lang leicht herumkauen, damit sie sich genügend mit Speichel vollsaugt.
3. Die Watterolle wieder in der Salivette platzieren und das Röhrchen mit dem Stopfen fest verschließen.
4. Die Salivette zur Speichelgewinnung 2 Minuten bei 1000 g zentrifugieren.
5. Den inneren Teil einschließlich der Watterolle aus dem Zentrifugenröhrchen entfernen und entsorgen. Der nun vorliegende wasserklare Speichel ist für die Analyse bereit (mit dieser Methode sollte mindestens 1 ml Speichel gewonnen werden).

#### 6.5 Test-Verfahrensweise

- **Alle Reagenzien müssen vor Gebrauch Raumtemperatur annehmen (22 °C – 28 °C).** Am Ende der Testdurchführung die Reagenzien sofort wieder bei 2 °C – 8 °C lagern, längere Zeiten bei Raumtemperatur möglichst vermeiden.
- Nicht verwendete beschichtete Mikrotiter-Streifen müssen wieder zusammen mit dem beigegefügteten Trockenmittel in den Folienbeutel zurückgelegt werden, der Beutel muss fest verschlossen und bei 2 °C – 8 °C gelagert werden.
- Damit keine mikrobielle oder chemische Kontamination auftreten kann, nicht verwendete Chemikalien nicht wieder in das Originalfläschchen zurückfüllen.
- Da der Test zur Erhöhung der Genauigkeit der Testergebnisse als Doppelbestimmung durchgeführt wird, für jeden Punkt der Standardkurve (STD A – E) zwei Vertiefungen, für jede Kontrolle und jede Probe ebenfalls zwei Vertiefungen und für den Nullwert eine Vertiefung vorbereiten.

Reagenz	Standard	Probe/Kontrolle	Nullwert
Probe/Kontrolle		50 µl	
Standards A – E	50 µl		
Verdünntes Konjugat	150 µl	150 µl	
15 Minuten bei 37 °C inkubieren. Inhalt der Vertiefungen entfernen; die Vertiefungen 3-mal mit 300 µl verdünnter Waschlösung waschen. <b>Wichtiger Hinweis:</b> Bei jedem Waschschrift die Platte 5 Sekunden vorsichtig schütteln. Überschüssige Flüssigkeit durch Aufschlagen der umgedrehten Platte auf saugfähigem Papier entfernen. <b>Waschautomat:</b> Bei Verwendung eines Waschautomaten die Vertiefungen mindestens 5-mal waschen.			
TMB-Substrat	100 µl	100 µl	100 µl
15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur (22 °C – 28 °C) inkubieren.			
Stopplösung	100 µl	100 µl	100 µl
Die Mikrotiterplatte vorsichtig schütteln. Die Extinktion (E) innerhalb von 5 min bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge von 620 – 630 nm oder gegen den Nullwert messen.			

#### 7. QUALITÄTSKONTROLLE

Jedes Labor sollte zur Überprüfung der Test-Performance Kontrollen mit normalen, hohen und niedrigen DHEA-S-Spiegeln testen. Diese Kontrollen sollten wie unbekannte Proben behandelt und die Werte in jedem durchgeführten Testlauf bestimmt werden. Die Aufzeichnungen der Qualitätskontrolle sollten aufbewahrt werden, um die Performance der Testkit-Reagenzien verfolgen zu können. Angemessene statistische Methoden sollten zur Ermittlung von Trends angewendet werden. Jedes Labor sollte Grenzwerte für eine ausreichende Test-Performance festlegen. Die Achsenabschnitte der Standardkurve bei 80%, 50% und 20% sollten zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit zwischen den verschiedenen Durchläufen als weitere Parameter ebenfalls

überwacht werden. Außerdem sollte die maximale Extinktion mit den bisher gesammelten Werten übereinstimmen. Treten deutliche Abweichungen gegenüber der bisherigen Performance auf, so kann das auf unbemerkte Änderungen der Testbedingungen oder verdorbene Testkit-Reagenzien hinweisen. Um die Ursache der Abweichungen zu ermitteln, sollten frische Reagenzien verwendet werden.

## 8. ERGEBNISSE

### 8.1 Mittlere Extinktion

Für jeden Punkt auf der Standardkurve (STD A – E) und für jede Probe jeweils die mittlere Extinktion ( $E_m$ ) berechnen.

### 8.2 Standardkurve

Die mittlere Extinktion ( $E_m$ ) der Standards (STD A – E) gegen die Konzentration auftragen. Dann eine Ausgleichskurve durch die aufgetragenen Punkte zeichnen (z.B. Vier-Parameter-Funktion).

### 8.3 Ermittlung der Ergebnisse

Mit den Werten für die Proben die entsprechenden Werte für die Konzentration in ng/ml aus der Standardkurve ablesen.

## 9. REFERENZWERTE

Da sich die Konzentrationen von DHEA-S im Speichel im Tagesverlauf verändern (circadiane Schwankungen), wird empfohlen, die Proben immer zur selben Uhrzeit zu sammeln (8 Uhr morgens): Die folgenden Werte sollten als vorläufige Richtlinie verwendet werden, bis das Labor jeweils seinen eigenen Wertebereich etabliert hat.

	ng/ml
Frauen	0,2 – 2,5
Männer	0,2 – 2,7

Bitte beachten, dass die Ermittlung des zu erwartenden Wertebereichs für eine „normale“ Population mit einer bestimmten Methode von vielen Faktoren, wie der Spezifität und Sensitivität der verwendeten Methode und der Zusammensetzung der untersuchten Population, abhängt. Deshalb sollten die Labors den vom Hersteller etablierten Wertebereich nur als allgemeine Orientierung verwenden und jeweils einen eigenen zu erwartenden Wertebereich mit der Bevölkerung im Einzugsbereich des Labors erstellen.

## 10. TESTCHARAKTERISTIKA

### 10.1 Präzision

#### 10.1.1 Intra-Assay-Variation

Die Abweichung innerhalb eines Testlaufs wurde durch die wiederholte Bestimmung (14x) von zwei verschiedenen Kontroll-Speichelproben in einem Testdurchlauf ermittelt. Die Intra-Assay-Variabilität beträgt  $\leq 7.8\%$ .

#### 10.1.2 Inter-Assay-Variation

Die Abweichung zwischen verschiedenen Testläufen wurde durch die wiederholte Bestimmung (9x) von drei verschiedenen Kontroll-Speichelproben mit verschiedenen Testkit-Chargen ermittelt. Die Inter-Assay-Variabilität beträgt  $\leq 14.9\%$ .

### 10.2 Richtigkeit

Proben wurde DHEA-S in Konzentrationen von 0,5 – 1,5 – 6,0 ng/ml zugefügt. Die Untersuchung der Wiederfindung ergab einen Durchschnittswert ( $\pm$ SD) von  $108,86\% \pm 3.27\%$  bezogen auf die ursprüngliche Konzentration.

### 10.3 Sensitivität

Die niedrigste nachweisbare DHEA-S-Konzentration, die sich von Standard A signifikant unterscheidet, ist 0.05 ng/ml (Konfidenzintervall 95%).

### 10.4 Spezifität

Die folgende Tabelle zeigt die nach Abraham mit 50% berechnete Kreuzreaktion des Antikörpers:

DHEA-S	90%
DHEA	100%
Androsteron-S-Na	48%
Androstendion	20%
Etiocolanon-S-Na	0,2%
5-Androstendion	0,01%
Testosteron	0,01%
Progesteron	0,01%
17 OH-Progesteron	0,01%
Estron	0,01%
Cortisol	0,001%
Cholesterol	0,001%

### 10.5 Korrelation

Der DHEA-S Saliva ELISA <sup>Free</sup> wurde mit einem anderen kommerziell erhältlichen Speicheltest verglichen. In beiden Testsystemen wurden entsprechend 31 Speichelproben analysiert. Die lineare Regressionskurve wurde berechnet:

$$y = 0,37x + 1,10$$

$$r^2 = 0,826$$

$$(y = \text{DHEA-S Saliva ELISA } ^{\text{Free}}, x = \text{DHEA-S Saliva Salimetrics Kit})$$

### 11. ENTSORGUNG

Bei der Entsorgung der Reagenzien sind die örtlichen Vorschriften zu beachten.

### 12. LITERATUR

1. Joshi, U. M., et al. Steroids 34 (1) 35 (1979)
2. Turkes, A., et al. J Endocrinol. 81 (2) P165 (1979)
3. Ismail A.A, et al. J.Clin.Endocr.Metab. 34,177-184 (1972)
4. Rajkowski,K.M, et al. Steroids 29 no 5 (1977)
5. Widsdom G.B. Clin. Chem. 22/8, 1243 - 1255 (1976)
6. Abraham G.E, et al. Obstet.Gynecol.,47(4),395 (1976)
7. Abraham G.E, et al. Obstet. Gynecol.,53(1),111 (1979)
8. Hopper B.R, et al. J.Clin.Endoc.Metab.40(3),458 (1975)
9. Winter J.S.D,et al. Clin.Obste.and Gynec.,21(1),67 (1978)
10. D. Riad et al. Endocr. Reviews, 9 (4) 304 367 (1978)

### Symbole:

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