

# Product information

Information about other products is available at: [www.demeditec.com](http://www.demeditec.com)



User's Manual

# DHEA free in Saliva ELISA

*Enzyme immunoassay for the quantitative determination of DHEA in human saliva*



**DES6666**



**96 Wells**

**CONTENTS / INHALTSVERZEICHNIS**

1	INTRODUCTION .....	3
2	PRINCIPLE .....	3
3	WARNINGS AND PRECAUTIONS .....	4
4	REAGENTS .....	5
5	SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION .....	6
6	ASSAY PROCEDURE .....	7
7	EXPECTED NORMAL VALUES .....	8
8	QUALITY CONTROL .....	9
9	PERFORMANCE CHARACTERISTICS .....	9
10	LIMITATIONS OF PROCEDURE .....	11
11	LEGAL ASPECTS .....	12
12	REFERENCES .....	13
1	EINLEITUNG .....	14
2	TESTPRINZIP .....	14
3	VORSICHTSMAßNAHMEN .....	15
4	BESTANDTEILE DES KITS .....	16
5	PROBENVORBEREITUNG .....	17
6	TESTDURCHFÜHRUNG .....	18
7	ERWARTETE WERTE .....	19
8	QUALITÄTSKONTROLLE .....	20
9	TEST CHARACTERISTIKA .....	20
10	GRENZEN DES TESTS .....	20
11	RECHTLICHE GRUNDLAGEN .....	21
12	REFERENZEN .....	21
	SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ELISAS .....	24

## 1 INTRODUCTION

### 1.1 Intended Use

An enzyme immunoassay for the quantitative in vitro diagnostic measurement of active free DHEA in saliva.

### 1.2 Summary and explanation

Dehydroepiandrosterone (DHEA; androstenedione; 3 $\beta$ -hydroxy-5-androsten-17-one) is a C<sub>19</sub> steroid produced in the adrenal cortex and, to a lesser extent, in the gonads. DHEA serves as a precursor in testosterone and estrogen synthesis. Due to the presence of a 17-oxo (rather than hydroxyl) 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 androgens (androstenedione and testosterone) and estrogens 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 vitro effects, including antiproliferative effects in different cell lines and effects on enzyme-mediated cell metabolism, have been reported. In vivo studies suggest that DHEA may affect cholesterol and lipid metabolism, insulin sensitivity and secretion and immune function. Abnormal DHEA levels have been reported in schizophrenia and obesity.

## 2 PRINCIPLE

The **DEMEDIATEC DHEA free in Saliva ELISA** Kit is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), based on the principle of competitive binding. The microtiter wells are coated with an antibody directed against the DHEA molecule. Endogenous DHEA of a patient sample competes with a DHEA-horseradish peroxidase conjugate for binding to the coated antibody. After incubation the unbound conjugate is washed off.

The amount of bound peroxidase conjugate is inversely proportional to the concentration of DHEA in the sample. After addition of the substrate solution, the intensity of color developed is inversely proportional to the concentration of DHEA in the patient sample.

---

### 3 WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. This kit is for in vitro diagnostic use only. For professional use only.
2. Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of the package insert provided with the kit. Be sure that everything is understood.
3. The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 °C to 8 °C in the sealed foil pouch and used in the frame provided.
4. Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step.
5. Use reservoirs only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing a substrate solution that had previously been used for the conjugate solution may turn solution colored. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur.
6. Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells.
7. Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.
8. Allow the reagents to reach room temperature (21-26°C) before starting the test. Temperature will affect the absorbance readings of the assay. However, values for the patient samples will not be affected.
9. Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and specimens with skin and mucous membranes.
10. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.
11. Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents or specimens may give false results.
12. Handling should be done in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.
13. Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
14. All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiterplate readers.
15. Do not mix or use components from kits with different lot numbers. It is advised not to exchange wells of different plates even of the same lot. The kits may have been shipped or stored under different conditions and the binding characteristics of the plates may result slightly different.
16. Avoid contact with Stop Solution. It may cause skin irritation and burns.
17. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guideline or regulation.
18. For information please refer to Material Safety Data Sheets. Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from Demeditec Diagnostics GmbH.

## 4 REAGENTS

### 4.1 Reagents provided

1. **SORB MT Microtiterwells**, 12x8 (break apart) strips, 96 wells.  
Wells coated with an anti-DHEA antiserum (polyclonal).
2. **CAL 0 Calibrator 0**, 1 vial, 3.0 ml, ready to use.
3. **CAL 1-5 Calibrator (Calibrator 1-5)**, 5 vials, 1.0 ml each, ready to use.  
Concentrations: 10 - 40 - 160 – 640 – 2560 pg/ml
4. **CONTROL 1-2 Control 1 (low) / Control 2 (high)**, 2 vials, 1.0 ml each, ready to use.  
For control values and ranges please refer to QC-Datasheet.
5. **ENZ CONJ Enzyme Conjugate**, 1 vial, 11 ml, ready to use.  
DHEA conjugated to horseradish peroxidase.
6. **SUB TMB Substrate Solution**, 1 vial, 22 ml, ready to use.  
Tetramethylbenzidine (TMB).
7. **STOP SOLN Stop Solution**, 1 vial, 7 ml, ready to use.  
contains 2 N hydrochlorid acid solution.  
Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.
8. **WASH SOLN 10x Wash Solution**, 1 vial, 50 ml (10X concentrated).  
see „Preparation of Reagents“.

All reagents contain azide-free and mercury-free preservatives.

**Note:** Additional *Calibrator 0* for sample dilution is available upon request.

### 4.2 Material required but not provided

- Microcentrifuge
- A microtiter plate reader capable for endpoint measurement at 450±10nm
- Microplate mixer operating at about 600-900 rpm
- Vortex mixer
- Calibrated variable precision micropipettes (50 µl, 100 µl, 200 µl)
- Absorbent paper
- Distilled or deionized water
- Timer
- Semi logarithmic graph paper or software for data reduction

### 4.3 Storage conditions

When stored at 2°C to 8°C unopened reagents will be stable until expiration date. Do not use reagents beyond this date. Opened reagents must be stored at 2°-8°C. After first opening the reagents are stable for 30 days if used and stored properly.

Microtiter wells must be stored at 2°C to 8°C. Take care that the foil bag is sealed tightly.

### 4.4 Reagents preparations

Allow the reagents and the required number of wells to reach room temperature (21-26°C) before starting the test.

#### **Wash Solution**

Add deionized water to the 10X concentrated *Wash Solution*.

Dilute 50 ml of concentrated *Wash Solution* with 450 ml deionized water to a final volume of 500 ml.

*The diluted Wash Solution is stable for 3 months at room temperature.*

### 4.5 Disposal of the kits

The disposal of the kit must be made according to the national regulations. Special information for this product is given in the Material Safety Data Sheet.

#### 4.6 Damaged test kits

In case of any severe damage of the test kit or components, DEMEDITEC has to be informed written, latest one week after receiving the kit. Severely damaged single components should not be used for a test run. They have to be stored until a final solution has been found. After this, they should be disposed according to the official regulations.

### 5 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Samples containing sodium azide should not be used in the assay. The saliva samples should be completely colorless. Even the slightest red color shows blood contamination. Such blood contamination will give falsely elevated concentration values. In case of visible blood contamination the patient should discard the sample, rinse the collection device with water, also rinse the mouth with (preferably) cold water, wait for 10 minutes and take a new sample. Do not chew anything during the sampling period. Any pressure on the teeth may result in falsely elevated measurements due to an elevated content of gingival liquid in the saliva sample.

#### 5.1 Specimen Collection

For the correct collection of saliva we are recommending to use only appropriate devices made from ultra-pure polypropylene. Do not use any PE devices or cotton based Salivettes for sampling. False readings will result. Glass tubes can be used as well, but in this case special attention is necessary for excluding any interference caused by the stopper. Please contact DEMEDITEC for more details.

As food might contain significant amounts of steroid hormones samples preferably should be taken while fasting. If fasting should be a problem at least any food of animal origin (meat or dairy products) should be avoided prior to finalizing the collection. In the morning breakfast should be done only after finalizing the collection procedure. During the day the collection period should be timed just before an anticipated meal. As the steroid hormone secretion in saliva as well as in serum shows an obvious dynamic secretion pattern throughout the day it is important to always collect 5 samples during a 2 hour period; this means every 30 minutes one sample. If possible the volume of each single sample should be a minimum of 0.5 ml (better 1 ml). Saliva flow may be stimulated by drinking water. This is allowed and even recommended before and during the collection period. Drinking of water is not allowed during the last 5 minutes before taking the single samples.

#### 5.2 Specimen Storage and Preparation

Saliva samples in general are stable at ambient temperature for several days. Therefore mailing of such samples by ordinary mail without cooling will not create a problem. Storage at 4°C can be done for a period of up to one month. Whenever possible samples preferable should be kept at a temperature of -20°C. Even repeated thawing and freezing is no problem. Each sample has to be frozen, thawed, and centrifuged at least once anyhow in order to separate the mucins by centrifugation. Upon arrival of the samples in the lab the samples have to be kept frozen at least overnight. Next morning the frozen samples are warmed up to room temperature and mixed carefully. Then the samples have to be centrifuged for 5 to 10 minutes. Now the clear colorless supernatant is easy to pipette. If the sample should show even a slightly red color it should be discarded. Otherwise the concentration value most probably will be falsely elevated. Due to the episodic variations of the steroid secretion we highly recommend the strategy of multiple sampling. If such a set of multiple samples has to be tested the lab (after at least one freezing, thawing, and centrifugation cycle) has to mix the aliquots of the 5 single samples in a separate sampling device and perform the testing from this mixture.

#### 5.3 Specimen Dilution

If in an initial assay, a specimen is found to contain more than the highest calibrator, the specimens can be diluted with *Calibrator 0* and re-assayed as described in Assay Procedure.

For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

Example:

- a) Dilution 1:10: 10 µl saliva + 90 µl *Calibrator 0* (mix thoroughly)
- b) Dilution 1:100: 10 µl of dilution a) + 90 µl *Calibrator 0* (mix thoroughly).

---

## 6 ASSAY PROCEDURE

### 6.1 General remarks

- All reagents and specimens must be allowed to come to room temperature before use. All reagents must be mixed without foaming.
- Once the test has been started, all steps should be completed without interruption.
- Use new disposal plastic pipette tips for each standard, control or sample in order to avoid cross contamination.
- Absorbance is a function of the incubation time and temperature. Before starting the assay, it is recommended that all reagents are ready, caps removed, all needed wells secured in holder, etc. This will ensure equal elapsed time for each pipetting step without interruption.
- As a general rule the enzymatic reaction is linearly proportional to time and temperature.
- Respect the incubation times as stated in this instructions for use

### 6.2 Assay procedure

Each run must include a standard curve.

1. Secure the desired number of coated strips in the frame holder.
2. Dispense **100 µl** of each **Calibrator, Control and sample** with new disposable tips into appropriate wells.
3. Dispense **100 µl** of **Enzyme Conjugate** into each well.
4. Incubate for **60 minutes** at room temperature on a Microplate mixer ( $\geq 600$  rpm).  
**Important note:** Optimal reaction in this assay is markedly dependent on shaking of the microplate!
5. Briskly empty the contents of the wells by aspiration or by decanting. Rinse the wells 4 times with diluted Wash Solution (300 µl per well). Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.  
**Important note:** The sensitivity and precision of this assay is markedly influenced by the correct performance of the washing procedure!
6. Add **200 µl** of **Substrate Solution** to each well.
7. Incubate for **30 minutes** in the dark at room temperature.
8. Stop the enzymatic reaction by adding **50 µl** of **Stop Solution** to each well.
9. Determine the absorbance of each well at **450±10 nm**.  
It is recommended that the wells are read within 15 minutes.

### 6.3 Calculation of results

1. Calculate the average absorbance values for each set of calibrators, controls and patient samples.
2. Construct a standard curve by plotting the mean absorbance obtained from each calibrator against its concentration with absorbance value on the vertical (Y) axis and concentration on the horizontal (X) axis.
3. Using the mean absorbance value for each sample determine the corresponding concentration from the standard curve.
4. Automated method: The results in the package insert have been calculated automatically using a 4 PL (4 Parameter Logistics) curve fit. 4 Parameter Logistics is the preferred calculation method. Other data reduction functions may give slightly different results.
5. The concentration of the samples can be read directly from this standard curve. Samples with concentrations higher than that of the highest calibrator have to be further diluted. For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

#### 6.3.1 Example of typical calibrator curve

The following data is for demonstration only and cannot be used in place of data generations at the time of assay.

Calibrator		Optical Units (450 nm)
Calibrator 0	0 pg/ml	2.940
Calibrator 1	10 pg/ml	2.701
Calibrator 2	40 pg/ml	2.290
Calibrator 3	160 pg/ml	1.657
Calibrator 4	640 pg/ml	0.890
Calibrator 5	2560 pg/ml	0.426

## 7 EXPECTED NORMAL VALUES

In order to determine the normal range of DHEA free in Saliva samples from adult male and female apparently healthy subjects were collected and analyzed using the DEMEDITEC DHEA free in Saliva ELISA kit. The following range was calculated from this study.

Age Group [Years]	Men			Women		
	5% - 95% Percentile [pg/ml]	Median [pg/ml]	n	5% - 95% Percentile [pg/ml]	Median [pg/ml]	n
<21	30.4 – 537.7	200.7	7	27.2 – 564.5	215.7	24
21 - 30	291.4 – 826.7	464.4	10	73.5 – 780.7	605.2	50
31 - 40	306.7 – 892.3	514.2	10	124.5 – 745.1	335.0	50
41 - 50	86.8 – 713.7	285.2	25	85.7 – 480.8	222.3	50
51 - 60	79.1 – 525.3	228.4	23	76.7 – 620.2	217.7	50
>60	39.4 – 694.9	171.2	28	34.7 – 467.1	170.8	50

The results alone should not be the only reason for any therapeutic consequences and should be correlated to other clinical observations and diagnostic tests.

Furthermore, we recommend that each laboratory determines its own range for the population tested.



## 8 QUALITY CONTROL

Good laboratory practice requires that controls need to be run with each calibration curve. A statistically significant number of controls should be assayed to establish mean values and acceptable ranges to assure proper performance.

It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results. Use controls at both normal and pathological levels.

The controls and the corresponding results of the QC-Laboratory are stated in the QC certificate added to the kit. The values and ranges stated on the QC sheet always refer to the current kit lot and should be used for direct comparison of the results.

It is also recommended to make use of national or international Quality Assessment programs in order to ensure the accuracy of the results.

Employ appropriate statistical methods for analysing control values and trends. If the results of the assay do not fit to the established acceptable ranges of control materials patient results should be considered invalid.

In this case, please check the following technical areas: Pipetting and timing devices; photometer, expiration dates of reagents, storage and incubation conditions, aspiration and washing methods.

After checking the above mentioned items without finding any error contact your distributor or DEMEDITEC directly.

## 9 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### 9.1 Analytical Sensitivity

The analytical sensitivity of the DHEA free in Saliva ELISA was calculated by subtracting 2 standard deviations from the mean of twenty-two (22) replicate analyses of *Calibrator 0*. The analytical sensitivity of the assay is 3.7 pg/ml.

### 9.2 Specificity (Cross Reactivity)

The following materials have been evaluated for cross reactivity.

Steroids	% Crossreactivity at 50% Binding
DHEA-S	<0.01
Testosterone	<0.01
5 $\alpha$ -Dihydrotestosterone	<0.01
Androstendione	0.06
Progesterone	0.23
17 $\alpha$ -Hydroxyprogesterone	<0.01
Pregnenolone	0.01
17-Hydroxy-Pregnenolone	0.07
Deoxycorticosterone	0.05
Corticosterone	<0.01
Cortisol	<0.01
11-Desoxycortisol	0.01
Estradiol-17 $\beta$	<0.01
Estradiol-17 $\alpha$	<0.01
Estrone	<0.01
Estriol	<0.01

### 9.3 Assay Dynamic Range

The range of the assay is between 10 - 2560 pg/ml.

## 9.4 Reproducibility

### 9.4.1 Intra-Assay

The intra-assay variation was determined by replicate measurements of 3 saliva samples within one run using the DEMEDITEC DHEA free in Saliva ELISA. The within-assay variation is shown below:

	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Mean (pg/ml)	255.1	672.8	822.8
SD (pg/ml)	13.3	60.7	39.9
CV (%)	5.2	9.0	4.9
n =	19	19	19

### 9.4.2 Inter-Assay

The inter-assay variation was determined by duplicate measurements of 3 saliva samples in 10 different runs using the DEMEDITEC DHEA free in Saliva ELISA. The inter-assay variation is shown below:

	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Mean (pg/ml)	238.6	648.8	797.5
SD (pg/ml)	10.6	44.2	51.2
CV (%)	4.5	6.8	6.4
n =	10	10	10

## 9.5 Recovery

Using the calibrator matrix a spiking solution of 20 ng DHEA/ml was prepared. 500 µl of three saliva were spiked with 5, 10 and 15 µl of the spiking solution leaving the saliva matrices relatively intact. All samples were measured by the DEMEDITEC DHEA free in Saliva ELISA procedure.

Saliva	Spiking (pg/ml)	Observed (pg/ml)	Expected (pg/ml)	Recovery (%)
1	-	291	-	-
	200	517	491	105
	400	668	691	97
	600	859	891	96
2	-	64	-	-
	200	287	264	109
	400	520	464	112
	600	661	664	100
3	-	247	-	-
	200	490	447	110
	400	668	647	103
	600	847	847	100

## 9.6 Linearity

Four saliva samples containing different amounts of analyte were serially diluted with *Calibrator 0* and assayed with the DEMEDTEC DHEA free in Saliva ELISA. The percentage recovery was calculated by comparing the expected and observed values for DHEA.

Saliva	Dilution	Observed (pg/ml)	Expected (pg/ml)	Linearity (%)
1	native	569	-	-
	1 in 2	284	285	100
	1 in 4	127	142	89
	1 in 8	77	71	108
2	native	384	-	-
	1 in 2	167	192	87
	1 in 4	78	96	81
	1 in 8	40	48	83
3	native	238	-	-
	1 in 2	86	119	72
	1 in 4	63	60	105
	1 in 8	30	30	100
4	native	292	-	-
	1 in 2	135	146	92
	1 in 4	73	73	100
	1 in 8	40	37	108

## 10 LIMITATIONS OF PROCEDURE

Reliable and reproducible results will be obtained when the assay procedure is performed with a complete understanding of the package insert instruction and with adherence to good laboratory practice.

Any improper handling of samples or modification of this test might influence the results. The patient should not eat, drink, chew gum or brush teeth for 30 minutes before sampling. Otherwise rinse mouth thoroughly with cold water 5 min prior to sample collection. Do not collect samples when oral diseases, inflammation or lesions exist (blood contamination).

### 10.1 High-Dose-Hook Effect

No hook effect was observed in this test.

### 10.2 Drug Interferences

Any medication (cream, oil, pill etc) containing DHEA of course will significantly influence the measurement of this analyte in saliva.

## **11 LEGAL ASPECTS**

### **11.1 Reliability of Results**

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable national standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include a sufficient number of controls within the test procedure for validating the accuracy and precision of the test.

The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications. In case of any doubt or concern please contact DEMEDITEC.

### **11.2 Therapeutic Consequences**

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as stated under point 11.1. Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of a patient.

Only in cases where the laboratory results are in acceptable agreement with the overall clinical picture of the patient therapeutic consequences should be derived.

The test result itself should never be the sole determinant for deriving any therapeutic consequences.

### **11.3 Liability**

Any modification of the test kit and/or exchange or mixture of any components of different lots from one test kit to another could negatively affect the intended results and validity of the overall test. Such modification and/or exchanges invalidate any claim for replacement.

Claims submitted due to customer misinterpretation of laboratory results subject to point 11.2. are also invalid. Regardless, in the event of any claim, the manufacturer's liability is not to exceed the value of the test kit. Any damage caused to the test kit during transportation is not subject to the liability of the manufacturer.

---

**12 REFERENCES**

1. Assessing cortisol and dehydroepiandrosterone (DHEA) in saliva: effects of collection method.  
Gallagher P, Leitch MM, Massey AE, McAllister-Williams RH, Young AH  
J Psychopharmacol, Sep 2006 (Vol. 20, Issue 5, Pages 643-9)
2. Effects of DHEA administration on episodic memory, cortisol and mood in healthy young men: a double-blind, placebo-controlled study.  
Alhaj HA, Massey AE, McAllister-Williams RH  
Psychopharmacology (Berl), Nov 2006 (Vol. 188, Issue 4, Pages 541-51)
3. Bacteria in the oral mucosa and its effects on the measurement of cortisol, dehydroepiandrosterone, and testosterone in saliva.  
Whembolua GL, Granger DA, Singer S, Kivlighan KT, Marguin JA  
Horm Behav, Apr 2006 (Vol. 49, Issue 4, Pages 478-83)
4. Anthropometry and body composition do not predict bioavailable androgen or progesterone concentration in adolescent girls.  
Bond LJ, Vella ET, Kiparissis Y, Wynne-Edwards KE  
Am J Hum Biol, Sep 2006 (Vol. 18, Issue 5, Pages 639-53)
5. The influence of 10 min of the Johrei healing method on laboratory stress.  
Laidlaw TM, Naito A, Dwivedi P, Hansi NK, Henderson DC, Gruzelier JH  
Complement Ther Med, Jun 2006 (Vol. 14, Issue 2, Pages 127-32)
6. Salivary cortisol, dehydroepiandrosterone-sulphate (DHEA-S) and testosterone in women with chronic migraine.  
Patacchioli FR, Monnazzi P, Simeoni S, De Filippis S, Salvatori E, Coloprisko G, Martelletti P  
J Headache Pain, Apr 2006 (Vol. 7, Issue 2, Pages 90-4)
7. Aggression, dominance, and affiliation: Their relationships with androgen levels and intelligence in 5-year-old children.  
Azurmendi A, Braza F, Garcia A, Braza P, Munoz JM, Sanchez-Martin JR  
Horm Behav, Jun 2006 (Vol. 50, Issue 1, Pages 132-40)
8. Cognitive abilities, androgen levels, and body mass index in 5-year-old children.  
Azurmendi A, Braza F, Sorozabal A, Garcia A, Braza P, Carreras MR, Munoz JM, Cardas J, Sanchez-Martin JR  
Horm Behav, Aug 2005 (Vol. 48, Issue 2, Pages 187-95)
9. Effect of prolonged stress on the adrenal hormones of individuals with irritable bowel syndrome  
Sugaya N., Izawa S., Saito K., Shirotzuki K., Nomura S. and Shimada H.  
*BioPsychoSocial Medicine* 2015, 9:4

## 1 EINLEITUNG

### 1.1 Verwendungszweck

Enzym-Immuno-Assay zur quantitativen Bestimmung von aktivem, freiem DHEA in Speichel.

**Nur für In-vitro Diagnostik.**

### 1.2 Zusammenfassung

Dehydroepiandrosteron (DHEA; 3 $\beta$ -Hydroxy-androst-5-en-17-on) ist ein C19-Steroid, welches in der Nebennierenrinde sowie, in geringeren Mengen, in den Gonaden produziert wird. DHEA dient als Vorstufe in der Synthese von Testosteron und den Estrogenen. Durch die 17-oxo-Gruppe besitzt DHEA eine relativ schwache androgene Wirkung, die ~10% der Aktivität des Testosterons entspricht.

In Neugeborenen, peripupertären Kindern und erwachsenen Frauen kann das zirkulierende DHEA die Testosteronkonzentration um ein vielfaches übersteigen. Im peripheren Gewebe kann eine Umwandlung zu stärker androgen-wirksamen Steroiden wie Androstendion oder Testosteron oder zu Estrogenen erfolgen. DHEA besitzt eine schwache Affinität zu Bindungsproteinen.

Die physiologische Funktion von DHEA kann noch nicht abschließend beurteilt werden. Eine Vielzahl an in-vitro-Effekten wie antiproliferative Effekte in verschiedenen Zelllinien und Effekte auf den enzymvermittelten Zellmetabolismus wurden berichtet. In-viv-Studien lassen eine Wirkung von DHEA auf den Lipid-Metabolismus, der Insulinsensitivität und –sekretion sowie auf das Immunsystem vermuten. Abnormale DHEA-Werte wurden beobachtet in Patienten mit Schizophrenie und Adipositas.

## 2 TESTPRINZIP

Der DEMEDITEC DHEA free in Saliva ELISA ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay, der auf dem Prinzip der kompetitiven Bindung basiert.

Die Vertiefungen der Mikrotiterplatten sind mit einem polyklonalen Antikörper beschichtet, der gegen das DHEA-Molekül gerichtet ist. Die Proben werden in die beschichteten Vertiefungen gegeben und zusammen mit einem DHEA-Enzymkonjugat inkubiert. Während der Inkubation konkurriert das DHEA aus der Probe mit dem DHEA-Enzymkonjugat um die freien Bindungsstellen auf den beschichteten Vertiefungen.

Das nicht gebundene Konjugat wird durch Waschen der Vertiefungen entfernt. Anschließend wird die Substratlösung zugegeben und die Farbentwicklung nach einer definierten Zeit gestoppt. Die Intensität der gebildeten Farbe ist umgekehrt proportional der DHEA-Konzentration in der Probe. Die Extinktion wird bei 450 nm mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät gemessen.

### 3 VORSICHTSMAßNAHMEN

1. Dieser Kit ist nur zum in-vitro-diagnostischen Gebrauch geeignet und sollte nur von medizinischem Fachpersonal durchgeführt werden.
2. Lesen Sie vor dem Testansatz sorgfältig die Packungsbeilage. Verwenden Sie nur die gültige, im Testkit enthaltene Arbeitsanleitung.
3. Die Mikrotiterplatte enthält teilbare einzeln brechbare Mikrotiterstreifen. Unbenutzte Mikrotiterstreifen sollten im verschlossenen Folienbeutel bei 2-8°C aufbewahrt werden und im mitgelieferten Rahmen verwendet werden.
4. Proben und Reagenzien sollten so schnell wie möglich und in einer gleichbleibenden Sequenz pipettiert werden.
5. Verwenden Sie für jedes Reagenz einen separaten Pipettenaufsatz. Das gilt besonders für die Substrat-Lösung. Wenn der Pipettenaufsatz der Substrat-Lösung vorher z.B. für das Konjugat verwendet wurde, kommt es zu einem Farbumschlag der Substrat-Lösung. Gießen Sie Reagenzien nie zurück ins Fläschchen, da so Reagenz-Kontaminationen verursacht werden können.
6. Mischen Sie den Inhalt der Mikrotiterplatte sorgfältig, um gute Testergebnisse zu gewährleisten. Mikrotiterplatten nicht wiederverwenden!
7. Mikrotiterstreifen nicht austrocknen lassen während des Testlaufes. Nach jedem Waschschrift zügig im Testprotokoll fortfahren.
8. Bringen Sie die Reagenzien vor dem Ansetzen des Tests auf Raumtemperatur (21-26°C).
9. Nicht mit dem Mund pipettieren und den Kontakt von Kitbestandteilen und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
10. In den Bereichen, in denen Proben oder Kitbestandteile verwendet werden, nicht rauchen, essen oder Kosmetika verwenden.
11. Beim Umgang mit Proben oder Reagenzien Einweg-Latexhandschuhe tragen. Die Verunreinigung von Reagenzien oder Proben mit Mikroben kann zu falschen Ergebnissen führen.
12. Der Gebrauch sollte in Übereinstimmung mit den Verfahren erfolgen, welche durch eine nationale Gefahrenstoff-Sicherheitsrichtlinie festgelegt sind.
13. Reagenzien nicht nach dem auf dem Kit-Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.
14. Alle im Kit-Protokoll angegebenen Mengen müssen genau eingehalten werden. Optimale Ergebnisse können nur durch Verwendung kalibrierter Pipetten und Mikrotiterplatten-Lesegeräte erreicht werden.
15. Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Lotnummern nicht untereinander vertauschen oder mischen. Es wird empfohlen, keine Vertiefungen von verschiedenen Platten zu verwenden, auch nicht, wenn es sich um das gleiche Lot handelt. Die Kits können unter anderen Bedingungen gelagert oder versendet worden sein, so dass die Bindungscharakteristika der Platten leicht unterschiedlich ausfallen.
16. Der Kontakt mit der Stopp-Lösung sollte vermieden werden, da sie Hautreizungen und Verbrennungen verursachen kann.
17. Die Entsorgung aller Bestandteile sollte gemäß der Vorschriften einer entsprechenden nationalen Gefahrenstoff-Sicherheitsrichtlinie erfolgen.
18. Informationen zu im Kit enthaltenen gefährlichen Substanzen entnehmen Sie bitte dem Materialsicherheitsdatenblatt. Materialsicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt von der Firma Demeditec Diagnostics GmbH erhältlich.

## 4 BESTANDTEILE DES KITS

### 4.1 Kitinhalt

1. **SORB MT Mikrotiterplatte**, 12 x 8 (einzeln brechbare) Mikrotiterstreifen mit 96 Vertiefungen; mit anti-DHEA-Antiserum (polyklonal) beschichtet.
2. **CAL 0 Standard 0**, 1 Fläschchen, 3,0 ml, gebrauchsfertig.
3. **CAL 1-5 Standard (Standard 1-5)**, 5 Fläschchen, je 1,0 ml, gebrauchsfertig.  
Konzentrationen: 10 - 40 - 160 - 640 - 2560 pg/ml
4. **CONTROL 1-2 Kontrolle 1 (niedrig) / Kontrolle 2 (hoch)**, 2 Fläschchen, je 1,0 ml, gebrauchsfertig.  
Kontrollwerte und -bereiche entnehmen Sie bitte dem QC-Datenblatt.
5. **ENZ CONJ Enzymkonjugat**, 1 Fläschchen, 11 ml, gebrauchsfertig.  
DHEA mit Meerrettichperoxidase konjugiert.
6. **SUB TMB Substratlösung**, 1 Fläschchen, 22 ml, gebrauchsfertig.  
Tetramethylbenzidine (TMB).
7. **STOP SOLN Stopplösung**, 1 Fläschchen, 7 ml, gebrauchsfertig.  
Enthält 2 N Salzsäure.
8. **WASH SOLN 10x Waschlösung, 10X** konzentriert, 1 Fläschchen, 50 ml.  
siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.

Alle Reagenzien enthalten Konservierungsmittel, die frei sind von Aziden und Quecksilber.

**Anmerkung:** Zusätzlicher *Standard 0* zur Probenverdünnung ist auf Anfrage erhältlich.

### 4.2 Nicht im Kit enthaltene aber erforderliche Geräte und Materialien

- Mikrozentrifuge
- Kalibriertes Mikrotiterplatten-Lesegerät mit 450±10 nm Filter
- Mikrotiterplattenmixer, 600-900 rpm
- Vortex Mixer
- Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipette (50 µl, 100 µl, 200 µl)
- Saugfähiges Papier
- Aqua dest.
- Zeitnahmegerät
- Semilogarithmisches Papier

### 4.3 Lagerung und Haltbarkeit des Kits

Die ungeöffneten Reagenzien behalten bei Lagerung um 2-8°C ihre Reaktivität bis zum Verfallsdatum. Nach dem Verfallsdatum die Reagenzien nicht mehr verwenden. Nach dem Öffnen sollten alle Reagenzien bei 2-8°C gelagert werden. Nach dem ersten Öffnen sind die Reagenzien bei sachgemäßer Abarbeitung und Lagerung 30 Tage stabil.

Die Mikrotiterstreifen sollten bei 2-8°C gelagert werden. Der einmal geöffnete Folienbeutel sollte stets sehr sorgfältig wieder verschlossen werden.

### 4.4 Vorbereitung der Reagenzien

Alle Reagenzien sowie die benötigte Anzahl von Vertiefungen sollen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht werden.

#### Waschlösung

Die 10-fach konzentrierte Waschlösung (50 ml) mit 450 ml destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 500 ml verdünnen. *Die verdünnte Waschlösung ist bei Raumtemperatur für 3 Monate stabil.*

### 4.5 Entsorgung des Kits

Die Entsorgung des Kits muss gemäß den nationalen gesetzlichen Vorschriften erfolgen. Spezielle Informationen für dieses Produkt finden Sie im Material Sicherheitsdatenblatt.



#### 4.6 Beschädigte Testkits

Im Falle einer starken Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss die Firma DEMEDITEC in schriftlicher Form spätestens eine Woche nach Erhalt des Kits informiert werden. Stark beschädigte Einzelkomponenten sollten nicht für den Testlauf verwendet werden. Sie müssen gelagert werden, bis eine endgültige Lösung gefunden wurde. Danach sollten sie gemäß den offiziellen Richtlinien entsorgt werden.

### 5 PROBENVORBEREITUNG

Proben, die Natriumazid enthalten, sollten nicht verwendet werden. Die Proben sollten vollkommen farblos sein; zumindest darf auch nur eine geringfügige Rotfärbung bedingt durch Blutkontamination nicht erkennbar sein. Eine Rotfärbung wird bei dieser Bestimmungsmethode immer einen zu hohen Wert ergeben. Bereits die geringste rötliche Färbung sollte Anlass dafür sein, dass der Patient die Probe verwirft, 10 Minuten wartet und dann eine neue Probe nimmt. Während der Sammelperiode darf nichts gekaut werden. Jeder erhöhte Druck auf die Zähne kann zu unerwünschten Einschwemmungen von (unsichtbaren) Blutbestandteilen und damit erhöhten Messwerten führen.

#### 5.1 Probenentnahme

Für die korrekte Speichelsammlung empfehlen wir geeignete Sammelgefäße aus ultra-reinem Polypropylen zu verwenden. PE-enhaltende Behältnisse oder Salivetten sind wegen möglicher Interferenzen zum Sammeln von Speichelproben für diesen Test ungeeignet. Glasgefäße sind ebenfalls geeignet, allerdings muss darauf geachtet werden, dass verwendete Stopfen keine Interferenzen zeigen, was bei PE-Stopfen aber zu erwarten ist.

Da die Sekretion der Steroidhormone eine ausgeprägte episodische Dynamik zeigt, ist es erforderlich eine Sammelstrategie anzuwenden, die Zufallsergebnisse vermeidet. Wir empfehlen daher, stets mehrfach Proben zu sammeln. Dazu sollte ein Zeitraum von 2 Stunden im Laufe eines Tages ausgesucht werden, in dem dann 5 Proben im Abstand von jeweils 30 Minuten genommen werden können. Vor und während dieser Sammelperiode darf keine Nahrung (fest oder flüssig) aufgenommen werden. Wenn ein Fasten vor der Sammelperiode zu schwierig sein sollte, darf in begrenzten Mengen vegetarische Nahrung gegessen werden. Milch- und Fleischprodukte sind aber in jedem Fall zu vermeiden. Das Trinken von Wasser ist jederzeit erlaubt und sogar empfohlen, um den Speichelfluss anzuregen. Das Wassertrinken ist in den letzten 5 Minuten vor dem eigentlichen Speichelsammeln zu unterlassen. Die Sammelperiode sollte möglichst in einer 2-Stunden-Periode vor einer geplanten Mahlzeit gelegt werden.

#### 5.2 Probenaufbewahrung und Vorbereitung

Die Proben können falls erforderlich mehrere Tage bei Raumtemperatur aufbewahrt werden. Daher kann man diese Proben auch problemlos und ohne Kühlung per Post versenden. Eine Aufbewahrung bei 4°C ist aber vorzuziehen und kann bis zu einem Monat lang vorgenommen werden. Wenn möglich sollte man aber die Proben sicherheitshalber bei -20°C aufbewahren, wobei mehrfache Gefrier- und Auftauzyklen unbedenklich sind. In jedem Fall muss jede Speichelprobe ohnehin zumindest einmal einen Gefrier- und Auftauzyklus durchlaufen, um die Muzine durch Zentrifugation entfernen zu können. Daher sollten die Speichelproben nach der Ankunft im Labor erst einmal eingefroren werden. Zur eigentlichen Messung der Hormonkonzentration werden dann alle Speichelproben wieder aufgetaut und 5 bis 10 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand sollte nun klar und farblos sein. Schon bei der leichtesten Rotfärbung sollte die Probe verworfen und eine neue Probe angefordert werden. Auch nur leicht rötlich gefärbte Proben zeigen immer zu hohe Konzentrationswerte. Wegen der episodischen Sekretionsmuster sollten in der Routine immer Mehrfachproben eingesetzt werden (siehe oben). Die fünf zu einer Abnahmeserie gehörenden Proben werden wie oben beschrieben vorbereitet. Anschließend werden Aliquots aus jeder Einzelprobe in einem separaten Probengefäß gemischt. Aus dieser Mischung wird dann die eigentliche Messung vorgenommen.

### 5.3 Probenverdünnung

Wenn in einem ersten Testdurchlauf bei einer Probe eine höhere Konzentration als der höchste Standard gefunden wird, kann diese Probe mit *Standard 0* weiter verdünnt und nochmals bestimmt werden. Die Verdünnung muss jedoch bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

Beispiel:

- a) Verdünnung 1:10: 10 µl Speichel + 90 µl *Standard 0* (gründlich mischen)
- b) Verdünnung 1:100: 10 µl Verdünnung a) 1:10 + 90 µl *Standard 0* (gründlich mischen).

## 6 TESTDURCHFÜHRUNG

### 6.1 Allgemeine Hinweise

- Alle Reagenzien und Proben müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht und gut durchmischt werden. Dabei sollte Schaumbildung vermieden werden.
- Wenn die Testdurchführung einmal begonnen wurde, muss sie ohne Unterbrechung zu Ende geführt werden.
- Für jeden Standard, jede Kontrolle oder Probe eine neue Plastikspitze verwenden, um Verschleppungen zu vermeiden.
- Die Optische Dichte ist abhängig von Inkubationszeit und Temperatur. Deshalb ist es notwendig, vor Beginn der Testdurchführung alle Reagenzien in einen arbeitsbereiten Zustand zu bringen, die Deckel der Fläschchen zu öffnen, alle benötigten Vertiefungen in den Halter zu setzen. Nur eine solche Vorbereitung garantiert gleiche Zeiten für jeden Pipettiervorgang ohne Pausen.
- Als generelle Regel gilt, dass die enzymatische Reaktion linear proportional zu Zeit und Temperatur ist.
- Die in der Gebrauchsanweisung angegebenen Inkubationszeiten müssen eingehalten werden.

### 6.2 Testdurchführung

Jede Messreihe muss eine Standardkurve beinhalten.

1. Die benötigte Anzahl Vertiefungen in der Halterung befestigen.
2. Je **100 µl Standard, Kontrolle** und **Probe** mit neuen Plastikspitzen in die entsprechenden Vertiefungen geben.
3. **100 µl Enzymkonjugat** in jede Vertiefung geben.
4. **60 Minuten** schüttelnd bei Raumtemperatur auf einem Mikrotiterplatten-Schüttler ( $\geq 600$  rpm) inkubieren.  
**Achtung:**  
Eine optimale Reaktion wird erheblich beeinflusst durch das Schütteln der Mikrotiterplatte!
5. Den Inhalt der Vertiefungen kräftig ausschütteln. Vertiefungen **4mal** mit verdünnter Waschlösung (300 µl pro Vertiefung) waschen. Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Vertiefungen auf saugfähigem Papier entfernen.  
**Achtung:** Die Sensitivität und Präzision dieses Tests wird erheblich beeinflusst von der korrekten Durchführung des Waschschrilles!
6. **200 µl Substratlösung** in jede Vertiefung geben.
7. **30 Minuten** bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren.
8. Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von **50 µl Stopplösung** in jede Vertiefung beenden.
9. Die Optische Dichte bei **450±10 nm** mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät innerhalb von **15 Minuten** nach Zugabe der Stopplösung bestimmen.

### 6.3 Ergebnisermittlung

1. Die durchschnittlichen Werte der Optischen Dichte (OD) für jedes Set von Standards, Kontrollen und Patientenproben bestimmen.
2. Eine Standardkurve ermitteln durch Auftragen der mittleren Optischen Dichte jedes Standards gegen die Konzentration, wobei der OD-Wert auf der vertikalen (Y) Achse und die Konzentration auf der horizontalen (X) Achse eingetragen wird.
3. Unter Verwendung der mittleren OD wird für jede Probe die entsprechende Konzentration aus der Standardkurve ermittelt.
4. Automatische Methode: Die in der Arbeitsanleitung ermittelten Werte wurden automatisch mit Hilfe der 4 Parameter Gleichung (4PL, 4 Parameter Logistics, 4 Parameter Rodbard) bestimmt. Andere Auswertungsfunktionen können leicht abweichende Werte ergeben.
5. Die Konzentration der Proben kann direkt von der Standardkurve abgelesen werden. Proben, die eine höhere Konzentration als die des höchsten Standards enthalten, müssen verdünnt werden. Dieser Verdünnungsfaktor muss bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

#### 6.3.1 Beispiel für eine Standardkurve

Nachfolgend wird ein typisches Beispiel für eine Standardkurve mit dem DEMEDITEC DHEA free in Saliva ELISA gezeigt. Diese Werte sollten nicht zur Berechnung von Patientendaten verwendet werden.

Standard		Optische Dichte (450 nm)
Standard 0	0 pg/ml	2,940
Standard 1	10 pg/ml	2,701
Standard 2	40 pg/ml	2,290
Standard 3	160 pg/ml	1,657
Standard 4	640 pg/ml	0,890
Standard 5	2560 pg/ml	0,426

## 7 ERWARTETE WERTE

Zur Ermittlung der Normalbereiche von freiem DHEA in Speichel wurden Speichelproben von scheinbar gesunden erwachsenen Männern und Frauen mit dem Demeditec DHEA free in Saliva ELISA gemessen. Diese Studie ergab folgende Bereiche:

Alter [Jahre]	Männer			Frauen		
	5% - 95% Perzentile [pg/ml]	Median [pg/ml]	n	5% - 95% Perzentile [pg/ml]	Median [pg/ml]	n
<21	30,4 – 537,7	200,7	7	27,2 – 564,5	215,7	24
21 - 30	291,4 – 826,7	464,4	10	73,5 – 780,7	605,2	50
31 - 40	306,7 – 892,3	514,2	10	124,5 – 745,1	335,0	50
41 - 50	86,8 – 713,7	285,2	25	85,7 – 480,8	222,3	50
51 - 60	79,1 – 525,3	228,4	23	76,7 – 620,2	217,7	50
>60	39,4 – 694,9	171,2	28	34,7 – 467,1	170,8	50

Nur alleine auf den Ergebnissen basierend sollten keine therapeutischen Konsequenzen getroffen werden. Es sind immer andere klinische Beobachtungen mit einzubeziehen. Des Weiteren wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen normalen und abnormalen Werte ermittelt.

## 8 QUALITÄTSKONTROLLE

Es wird empfohlen, die Kontrollproben gemäß den nationalen gesetzlichen Bestimmungen einzusetzen. Durch die Verwendung von Kontrollproben wird eine Tag-zu-Tag Überprüfung der Ergebnisse erzielt. Es sollten Kontrollen sowohl mit normalem als auch pathologischem Level eingesetzt werden.

Die Kontrollen mit den entsprechenden Ergebnissen des QC-Labors sind im QC-Zertifikat, das dem Kit beiliegt, aufgeführt. Die im QC-Blatt angegebenen Werte und Bereiche beziehen sich stets auf die aktuelle Kitcharge und sollten zum direkten Vergleich der Ergebnisse verwendet werden.

Es sollten geeignete statistische Methoden zur Analyse von Kontroll-Werten und Trends angewendet werden. Wenn die Ergebnisse des Tests nicht mit den angegebenen Akzeptanzbereichen des Kontrollmaterials übereinstimmen, sollten die Patientenergebnisse als ungültig eingestuft werden.

In diesem Fall überprüfen Sie bitte die folgenden Bereiche: Pipetten und Zeitnehmer, Photometer, Verfallsdatum der Reagenzien, Lagerungs- und Inkubationsbedingungen, Absaug- und Waschmethode.

Sollten Sie nach Überprüfung der vorgenannten Bereiche keinen Fehler erkannt haben, setzen Sie sich bitte mit Ihrem Lieferanten oder direkt mit der Firma DEMEDITEC in Verbindung.

## 9 TEST CHARACTERISTIKA

### 9.1 Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität, definiert als Mittelwert abzüglich der zweifachen Standardabweichung des Standards 0 (n = 22), beträgt 3,7 pg/ml.

### 9.2 Spezifität der Antikörper (Kreuzreaktivität)

Die Daten entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

### 9.3 Messbereich

Der Messbereich des Testes liegt zwischen 10 - 2560 pg/ml.

Die Daten zu:

### 9.4 Präzision

### 9.5 Wiederfindung

### 9.6 Linearität

entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

## 10 GRENZEN DES TESTS

Zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse können nur erzielt werden, wenn der Testansatz mit vollstem Verständnis der Packungsbeilage und unter Einhaltung der guten Laborpraxis durchgeführt wird. Jede unsachgemäße Behandlung von Proben oder Modifikationen dieses Tests können die Ergebnisse beeinflussen. Der Patient sollte 30 Minuten vor Speichelentnahme nicht essen, trinken, Kaugummi kauen oder Zähne putzen; ansonsten den Mund gründlich mit kaltem Wasser 5 Minuten vor Probennahme spülen. Keine Speichelprobe entnehmen, wenn orale Krankheiten, Entzündungen oder Läsionen vorhanden sind (Blutkontamination).

### 10.1 High-Dose-Hook-Effekt

Ein Hook-Effekt tritt in diesem Test nicht auf.

### 10.2 Beeinflussung durch Medikamente

Medikationen wie Cremes, Öle oder Pillen, die DHEA enthalten, haben einen entsprechenden Einfluss auf die Bestimmung des Analyten im Speichel.

## **11 RECHTLICHE GRUNDLAGEN**

### **11.1 Zuverlässigkeit der Ergebnisse**

Der Test muss exakt gemäß der Testanleitung des Herstellers abgearbeitet werden. Darüber hinaus muss der Benutzer sich strikt an die Regeln der GLP (Good Laboratory Practice) oder andere eventuell anzuwendende Regeln oder nationale gesetzliche Vorgaben halten. Dies betrifft besonders den Gebrauch der Kontrollreagenzien. Es ist sehr wichtig, bei der Testdurchführung stets eine ausreichende Anzahl Kontrollen zur Überprüfung der Genauigkeit und Präzision mitlaufen zu lassen.

Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn alle Kontrollen in den vorgegebenen Bereichen liegen, und wenn alle anderen Testparameter die vorgegebenen Spezifikationen für diesen Assay erfüllen. Wenn Sie bezüglich eines Ergebnisses Zweifel oder Bedenken haben, setzen Sie sich bitte mit der Firma DEMEDITEC in Verbindung.

### **11.2 Therapeutische Konsequenzen**

Therapeutische Konsequenzen sollten keinesfalls nur aufgrund von Laborergebnissen erfolgen, selbst dann nicht, wenn alle Testergebnisse mit den in 11.1. genannten Voraussetzungen übereinstimmen. Jedes Laborergebnis ist nur ein Teil des klinischen Gesamtbildes eines Patienten.

Nur in Fällen, in denen die Laborergebnisse in akzeptabler Übereinstimmung mit dem allgemeinen klinischen Bild des Patienten stehen, sollten therapeutische Konsequenzen eingeleitet werden.

Das Testergebnis allein sollte niemals als alleinige Grundlage für die Einleitung therapeutischer Konsequenzen dienen.

### **11.3 Haftung**

Jegliche Veränderungen des Testkits und/oder Austausch oder Vermischung von Komponenten unterschiedlicher Chargen von einem Testkit zu einem anderen können die gewünschten Ergebnisse und die Gültigkeit des gesamten Tests negativ beeinflussen. Solche Veränderungen und/oder Austausch haben den Ausschluss jeglicher Ersatzansprüche zur Folge.

Reklamationen, die aufgrund von Falschinterpretation von Laborergebnissen durch den Kunden gemäß Punkt 11.2. erfolgen, sind ebenfalls abzuweisen. Im Falle jeglicher Reklamation ist die Haftung des Herstellers maximal auf den Wert des Testkits beschränkt. Jegliche Schäden, die während des Transports am Kit entstanden sind, unterliegen nicht der Haftung des Herstellers.











## **12 REFERENZEN**

Angaben zu den Referenzen entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.





## SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ELISAS

Symbol	English	Deutsch	Français	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Ussage Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di Cat.
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta y precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Temperature de conservation	Temperatura de conservacion	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore