

Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



DHEA free in Saliva ELISA



DES6666



96



Demeditec Diagnostics GmbH
Lise-Meitner-Strasse 2
24145 Kiel – Germany
www.demeditec.com

CONTENTS / INHALTSVERZEICHNIS

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

1 INTRODUCTION

1.1 Intended Use

The Demeditec DHEA free in Saliva ELISA is an enzyme immunoassay for the quantitative determination of Dehydroepiandrosterone (DHEA) in human saliva.

The assay is intended for *in-vitro* diagnostic use by professional users only. All therapeutic consequences must take not only the test result but always also all clinical and laboratory diagnostic results into account. The laboratory values themselves must never be the sole reason for therapeutic consequences derived from them. Manual processing is recommended. The usage of laboratory automats is the user's sole responsibility. The kit is intended for single use only.

1.2 Description of the analyte

Dehydroepiandrosterone (DHEA; androstenedione; 3 β -hydroxy-androst-5-en-17-one) is a C₁₉ 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 measurement of DHEA is a useful marker of adrenal androgen synthesis. Elevated levels may occur under various conditions, including 11 β -hydroxylase and 3-hydroxysteroid dehydrogenase deficiencies, and in some cases female hirsutism. Since very little DHEA is produced by the gonads, measurement of DHEA levels can help to locate the source of androgen under virilizing conditions [7].

Salivary DHEA concentrations show good correlation with serum, and decreasing values with increasing age in adults have been well-documented [3]. Thus the measurement of DHEA levels in saliva, in addition to other clinical observations and diagnostic tests is useful in assessing the adrenal function and can be used as an aid in the diagnosis of adrenal disorders in conjunction with other steroids like testosterone, DHT or androstenedione.

2 PRINCIPLE

The Demeditec DHEA free in Saliva ELISA is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on the competition principle. An unknown amount of antigen present in the sample and enzyme-labeled antigen compete for the binding sites of antibodies coated onto the wells. After incubation, any unbound sample antigen and 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 sample. The enzymatic reaction is stopped by addition of stop solution and the optical density (OD) is measured. A calibration curve is constructed by plotting OD values against concentrations of calibrators, and concentrations of unknown samples are determined using this standard curve.

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 microtiter plate contains break-apart strips. Unused wells must be stored at 2-8°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 or multipette tips only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing substrate solution that had previously been used for conjugate solution may turn solution colored. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur.
6. Mix the contents of the microtiter plate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse wells.
7. Do not let wells dry during assay, add reagents immediately after completing the washing steps.
8. Allow the reagents to reach room temperature (18-25°C) before starting the test. Temperature will affect the optical density of the assay.
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 protective 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 microtiter plate 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 be slightly different.
16. Avoid contact with Stop Solution. It may cause skin irritation and burns.
17. Some reagents contain Proclin 300, CMIT and/or MIT as preservatives. In case of contact with eyes or skin, flush immediately with water.
18. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guideline or regulation.
19. For information on hazardous substances included in the kit please refer to Safety Data Sheets. Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from Demeditec Diagnostics GmbH or on Demeditec homepage (www.demeditec.com).
20. All serious incidents occurring in relation to products made available on the EU market in accordance with Article 2(61) of Regulation (EU) 2017/746 shall be notified to the manufacturer and to the competent authority of the Member State where the user or patient is established in accordance with Article 82 of Regulation (EU) 2017/746.
21. If product information, including labeling, is incorrect or inaccurate, please contact the kit manufacturer or supplier.

4 REAGENTS

4.1 Reagents provided

1. **SORB** **MT** **Microtiter plate**, 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.
Buffered matrix spiked with defined quantity of DHEA.
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.
Buffered matrix with defined quantity of DHEA.
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; contains 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 „Reagents preparations“ (4.4).

4.2 Material required but not provided

- Microtiter plate reader capable for endpoint measurement at 450 nm
- Calibrated variable precision micropipettes and multichannel pipettes with disposable pipette tips
- Microtiter plate mixer operating at 900 rpm
- Manual or automatic equipment for microtiter plate washing
- Absorbent paper
- Deionized water
- Timer
- Semilogarithmic graph paper or software for data reduction
- Vortex mixer
- Microcentrifuge

4.3 Storage conditions

When stored at 2-8°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. Keep away from heat and direct sunlight. Microtiter wells must be stored at 2-8°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 (18-25°C) before starting the test.

Wash Solution

Dilute 50 ml of 10x concentrated Wash Solution with 450 ml deionized water to a final volume of 500 ml. The diluted Wash Solution is stable for at least 12 weeks at room temperature (18-25°C). Precipitates may form when stored at 2-8°C, which should dissolve again by swirling at room temperature (18-25°C). The Wash Solution should only be used when the precipitates have completely dissolved.

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 Diagnostics GmbH 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 false 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.

5.1 Specimen Collection

For the correct collection of saliva we recommend to use only appropriate devices made from ultra-pure polypropylene. Do not use any PE devices or Salivettes for sampling. In most cases this will result in significant interferences. 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 Diagnostics GmbH for more details.

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 five samples during a two hour period; this means every 30 minutes one sample. It is recommended to collect the samples within two hours after awakening time. If possible the volume of each single sample should be a minimum of 0.5 ml (better 1 ml). Rinse mouth with water 10 minutes prior to specimen collection.

The patient should not eat a major meal, brush teeth or chew gum for 60 minutes before sampling. Do not take a sample within 12 hours after drinking alcohol.

5.2 Specimen Storage and Preparation

Saliva samples may be stored at 2-8°C for up to one week. For longer storage, it is recommended to store the samples at $\leq -20^{\circ}\text{C}$. Repeated thawing and freezing should be minimized. 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 at the lab, the samples have to be kept frozen at least overnight. Next morning the samples are thawed and mixed carefully. The samples have to be centrifuged for 5 to 10 minutes. The clear colorless supernatant is easy to pipette. If the sample should show even a slighty red colour, it might be contaminated with blood and should be discarded. Blood contamination influences the results and leads to false results. Due to the episodic variations of the steroid secretion the strategy of multiple sampling is highly recommended. If such a set of multiple samples has to be tested the staff of lab (after at least one freezing, thawing, and centrifugation cycle) should mix aliquots of the five single samples and perform the determination using the 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 (CAL 0) and re-assayed as described in Assay Procedure. For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

6 ASSAY PROCEDURE

6.1 General remarks

- All reagents and specimens must be allowed to come to room temperature (18-25°C) 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.
- Optical density 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.
- Calibrators, controls and samples should at least be assayed in duplicates.
- Microtiter plate washing is important. Improperly washed wells will give erroneous results. It is recommended to use a multichannel pipette or a multipette, respectively, or an automatic microtiter plate washing system. Do not allow the wells to dry between incubations. Do not scratch coated wells during rinsing and aspiration. Rinse and fill all reagents with care. While rinsing, check that all wells are filled precisely with wash solution, and that there are no residues in the wells.
- A calibrator curve must be established for every run.

6.2 Assay procedure

1. Prepare a sufficient number of microtiter plate wells to accommodate calibrators, controls and samples in duplicates.
2. Dispense **100 µl** of each **calibrator, control and sample** with new disposable tips in duplicates into appropriate wells.
3. Dispense **100 µl** of **Enzyme Conjugate** into each well.
4. Incubate for **60 minutes** at room temperature (18-25°C) on a microtiter plate shaker at 900 rpm.
Important note: Optimal reaction in this assay is markedly dependent on shaking of the microtiter plate!
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 without shaking for **30 minutes** in the dark at room temperature (18-25°C).
8. Stop the enzymatic reaction by adding **50 µl** of **Stop Solution** to each well.
9. Determine the absorbance of each well at **450 nm**. It is recommended to read the wells within 15 minutes.

6.3 Calculation of results

1. Calculate the average absorbance values for each set of calibrators, controls and patient samples.
2. The obtained OD of the standards (y-axis, linear) are plotted against their concentration (x-axis, logarithmic) either on semi-logarithmic paper or using an automated method.
3. Using the mean optical density 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 determined directly from this calibrator 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 are intended for demonstration only and must not be used to calculate results from another run.

| Calibrator | | Optical Density (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

Because of differences, which may exist between laboratories and location with respect to population, laboratory technique and selection of reference group, it is important for each laboratory to determine its own normal and pathological values. Samples were collected in the morning.

| 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.

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 kit-controls and the corresponding results 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 Diagnostics GmbH 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 at least twenty (20) replicate analyses of Calibrator 0 (CAL 0). The analytical sensitivity of the assay is 6.4 pg/ml.

9.2 Specificity (Cross-Reactivity)

The following materials have been evaluated for cross reactivity. The percentage indicates cross-reactivity at 50% displacement compared to DHEA.

| Steroids | % Cross-Reactivity |
|----------------------------------|--------------------|
| Testosterone | <0.01 |
| Androstendione | 0.07 |
| Progesterone | 0.04 |
| 17 α -Hydroxyprogesterone | 0.10 |
| Pregnenolone | 0.03 |
| 11-Deoxycorticosterone | 0.09 |
| Corticosterone | <0.01 |
| Cortisol | <0.01 |
| 11-Desoxycortisol | <0.01 |
| Estradiol-17 β | <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 20 replicate measurements of three saliva samples within one run using the Demeditec DHEA free in Saliva ELISA.

| | Sample 1 | Sample 2 | Sample 3 |
|--------------|----------|----------|----------|
| Mean (pg/ml) | 117.5 | 316.0 | 1018.3 |
| SD (pg/ml) | 12.9 | 25.1 | 82.8 |
| CV (%) | 11.0 | 7.9 | 8.1 |
| n = | 20 | 20 | 20 |

9.4.2 Inter-Assay

The inter-assay variation was determined by duplicate measurements of three saliva samples in ten different runs using the Demeditec DHEA free in Saliva ELISA.

| | Sample 1 | Sample 2 | Sample 3 |
|--------------|----------|----------|----------|
| Mean (pg/ml) | 250.6 | 891.3 | 143.7 |
| SD (pg/ml) | 19.0 | 88.9 | 16.7 |
| CV (%) | 7.6 | 10.0 | 11.6 |
| n = | 10 | 10 | 10 |

9.5 Recovery

Recovery was determined by adding increasing amounts of the analyte to three different saliva samples containing different amounts of endogenous analyte. Each sample (non-spiked and spiked) was measured by the Demeditec DHEA ELISA. The percentage recoveries were determined by comparing expected and observed results of the samples.

| Saliva | Spiking (pg/ml) | Observed (pg/ml) | Expected (pg/ml) | Recovery (%) |
|--------|-----------------|------------------|------------------|--------------|
| 1 | native | 242.9 | - | - |
| | 200 | 467.0 | 442.9 | 105 |
| | 400 | 714.2 | 642.9 | 111 |
| | 800 | 1158.3 | 1042.9 | 111 |
| 2 | native | 143.7 | - | - |
| | 200 | 417.7 | 343.7 | 122 |
| | 400 | 620.8 | 543.7 | 114 |
| | 800 | 1231.2 | 943.7 | 130 |
| 3 | native | 122.6 | - | - |
| | 200 | 338.4 | 322.6 | 105 |
| | 400 | 579.2 | 522.6 | 111 |
| | 800 | 1191.0 | 922.6 | 129 |

9.6 Linearity

Three saliva samples containing different amounts of analyte were serially diluted with Calibrator 0 (CAL 0) and assayed with the Demeditec DHEA free in Saliva ELISA. The percentage linearity was calculated by comparing the expected and observed values for DHEA.

| Saliva | Dilution | Observed (pg/ml) | Expected (pg/ml) | Linearity (%) |
|--------|----------|------------------|------------------|---------------|
| 1 | native | 690.5 | - | - |
| | 1 : 2 | 290.4 | 345.3 | 84 |
| | 1 : 4 | 140.2 | 172.6 | 81 |
| | 1 : 8 | 70.7 | 86.3 | 82 |
| 2 | native | 643.6 | - | - |
| | 1 : 2 | 294.7 | 321.8 | 92 |
| | 1 : 4 | 150.1 | 160.9 | 93 |
| | 1 : 8 | 69.6 | 80.5 | 87 |
| 3 | native | 513.2 | - | - |
| | 1 : 2 | 209.2 | 256.6 | 82 |
| | 1 : 4 | 92.0 | 128.3 | 72 |
| | 1 : 8 | 51.2 | 64.2 | 80 |

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.

10.1 Interfering Substances

- Blood contamination in saliva samples will affect results and usually can be seen by eye. In case of visible blood contamination, the patient should discard the sample, rinse the sampling device with water, wait for ten minutes and take a new sample. Do not collect samples when oral diseases, inflammation, or lesions exist (blood contamination). Find more details about sample collection and preparation in chapter 5.
- Samples containing sodium azide should not be used in the assay. This can cause false results.
- The result of any immunological test system may be affected by heterophilic antibodies, anti-species antibodies or rheumatoid factors present in human samples [8-10]. For example, the presence of heterophilic antibodies in patients who are regularly exposed to animals or animal products may interfere with immunological tests. Therefore, interference with this *in-vitro* immunoassay cannot be excluded. If unplausible results are suspected, they should be considered invalid and verified by further testing. For diagnostic purposes, results should always be considered only in conjunction with the patient's clinical picture and further diagnostic tests.

10.2 Drug Interferences

Any medication (cream, oil, pill, etc.) containing DHEA of course will significantly influence the measurement of this analyte. The clinical significance of the determination of DHEA can be invalidated if the patient was treated with natural or synthetic steroids. Any medication should be taken into account when assessing the results.

10.3 High Dose Hook Effect

Up to a tested concentration of 100 000 pg/ml DHEA, no High Dose Hook Effect was observed for the Demeditec DHEA free in Saliva ELISA.

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 DemeditecDiagnostics GmbH.

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 REVISION HISTORY OF INSTRUCTION FOR USE

Changes from the previous version 2a-07/16 to actual version 3-05/22

| | |
|------------|--|
| Cover page | Layout change |
| General | Editorial changes |
| Chapter 1 | Updated intended use and description of the analyte |
| Chapter 2 | updated; editorial changes |
| Chapter 3 | additional information |
| Chapter 4 | updated and additional information; plate shaker at 900 rpm required (before ≥ 600 rpm) (4.2) |
| Chapter 5 | updated: collection and storage conditions of saliva samples |
| Chapter 6 | updated information (6.1; 6.3); shaking during incubation at 900 rpm (before ≥ 600 rpm) (6.2) |
| Chapter 9 | updated assay characteristics |
| Chapter 10 | additional information, updates of interfering substances; High-Dose-Hook-Effect added (10.3) |
| Chapter 12 | added |
| Chapter 13 | References updated |

13 REFERENCES

1. Gallagher P, Leitch MM, Massey AE, McAllister-Williams RH, Young AH. Assessing cortisol and dehydroepiandrosterone (DHEA) in saliva: effects of collection method. *J Psychopharmacol*, Sep 2006 (Vol. 20, Issue 5, Pages 643-9)
2. Whemolua GL, Granger DA, Singer S, Kivlighan KT, Marguin JA . Bacteria in the oral mucosa and its effects on the measurement of cortisol, dehydroepiandrosterone, and testosterone in saliva. *Horm Behav*, Apr 2006 (Vol. 49, Issue 4, Pages 478-83)
3. Wood, P. Salivary steroid assays—research or routine?. *Annals of clinical biochemistry*, 2009, 46(3), 183-196
4. Labrie F, Luu-The V, Belanger A, Lin SX, Simard J, Pelletier G, Labrie C.: Is dehydroepiandrosterone a hormone?, *J Endocrinol*. 2005 Nov;187(2):169-96.
5. Carlstrom K, Brody S, Lunell NO, Lagrelius A, Mollerstrom G, Pousette A, Rannevik G, Stege R, von Schoultz B.; Dehydroepiandrosterone sulphate and dehydroepiandrosterone in serum: differences related to age and sex. *Maturitas*. 1988 Dec;10(4):297-306
6. Rainey WE & Nakamura Y.: Regulation of the Adrenal Androgen Biosynthesis *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008 February; 108(3-5): 281-286
7. Thomas L. Labor und Diagnose – Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik. 8. Auflage
8. Marks V.: False-Positive Immunoassay Results: A Multicenter Survey of Erroneous Immunoassay Results from Assays of 74 Analytes in 10 Donors from 66 Laboratories in Seven Countries *Clinical Chemistry* 2002, 48:11: 2008-2016
9. Tate & Ward (2004): Interferences in Immunoassays, *Clin. Biochem Rev* Vol 25, May 2004
10. Selby (1999): Interference in immunoassays; *Ann. Clin. Biochem* 1999, 36: 704-721

1 EINLEITUNG

1.1 Zweckbestimmung

Der Demeditec DHEA free in Saliva ELISA ist ein Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Dehydroepiandrosteron (DHEA) in humanem Saliva.

Dieser Test ist nur für *in-vitro* diagnostische Anwendungen durch geschultes Laborpersonal bestimmt. Das Testergebnis muss immer alle klinischen und labordiagnostischen Ergebnisse berücksichtigen. Die Laborwerte selbst dürfen niemals der alleinige Grund für daraus abgeleitete therapeutische Konsequenzen sein. Die manuelle Abarbeitung wird empfohlen. Der darüberhinausgehende Einsatz von Laborautomaten liegt in der Verantwortung des Anwenders. Das Kit ist zum einmaligen Gebrauch bestimmt.

1.2 Beschreibung des Analyten

Dehydroepiandrosteron (DHEA; 3β -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 Messung von DHEA ist ein nützlicher Marker der adrenalen Androgensynthese. Erhöhte Spiegel treten unter verschiedenen Bedingungen auf; dazu gehören 11β -Hydroxylase- und 3-Hydroxysteroiddehydrogenase-Mängel und in einigen Fällen weiblicher Hirsutismus. Da von den Keimdrüsen nur sehr wenig DHEA produziert wird, kann die Messung des DHEA-Spiegels zur Lokalisierung der Androgenquelle unter virilisierenden Bedingungen beitragen [7].

Die DHEA-Konzentrationen im Speichel korrelieren gut mit denen im Serum, und es ist beschrieben, dass die Werte mit zunehmendem Alter bei Erwachsenen abnehmen [3]. Daher ist die Messung des DHEA-Spiegels im Speichel zusätzlich zu anderen klinischen Beobachtungen und diagnostischen Tests nützlich für die Beurteilung der Nebennierenfunktion und kann in Verbindung mit anderen Steroiden wie Testosteron, DHT oder Androstendion als Hilfsmittel für die Diagnose von Nebennierenerkrankungen verwendet werden.

2 TESTPRINZIP

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

Die Wells der Mikrotiterplatten sind mit einem polyklonalen Antikörper beschichtet, der gegen das DHEA-Molekül gerichtet ist. Die Proben werden in die beschichteten Wells 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 Wells.

Das nicht gebundene Konjugat wird durch Waschen der Wells 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. Es wird eine Standardkurve erstellt, indem die OD-Werte gegen die Konzentrationen der Standards aufgetragen werden. Die Konzentrationen der unbekanntenen Proben werden anhand dieser Standardkurve bestimmt.

3 WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

1. Dieses Kit ist nur zum *in-vitro* diagnostischen Gebrauch geeignet und sollte nur von medizinischem Fachpersonal durchgeführt werden.
2. Vor der Testdurchführung muss die Arbeitsanleitung vollständig und sorgfältig gelesen werden und verstanden worden sein. Die gültige Version aus dem Kit verwenden.
3. Die Mikrotiterplatte enthält teilbare, einzeln brechbare Mikrotiterstreifen. Unbenutzte Mikrotiterstreifen müssen im verschlossenen Folienbeutel bei 2-8°C aufbewahrt werden und im mitgelieferten Rahmen verwendet werden.
4. Proben und Reagenzien müssen so schnell wie möglich und in einer gleichbleibenden Sequenz pipettiert werden.
5. Für jedes Reagenz einen separaten Behälter oder Mehrkanalpipetten mit Einwegspitzen verwenden. Das gilt besonders für die Substratlösung. Wenn der Behälter der Substratlösung vorher z.B. für das Konjugat verwendet wurde, kommt es zu einem Farbumschlag der Substratlösung. Reagenzien nie zurück ins Fläschchen überführen, da so Reagenz-Kontaminationen verursacht werden können.
6. Den Inhalt der Mikrotiterplatte sorgfältig mischen, um gute Testergebnisse zu gewährleisten. Mikrotiterplatten nicht wiederverwenden!

7. Mikrotiterstreifen nicht austrocknen lassen während des Testlaufes. Nach jedem Waschschrift zügig im Testprotokoll fortfahren.
8. Reagenzien vor dem Testansatz auf Raumtemperatur (18-25°C) bringen. Die Temperatur hat einen Einfluss auf die Bestimmung der Optischen Dichte.
9. Nicht mit dem Mund pipettieren und Kontakt von Kitbestandteilen und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
10. In den Bereichen, in denen Proben oder Kitbestandteile verwendet werden, nicht rauchen, essen, trinken oder Kosmetika verwenden.
11. Beim Umgang mit Proben oder Reagenzien Einweg-Handschuhe tragen. Die mikrobielle Verunreinigung von Reagenzien oder Proben 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 in der Packungsbeilage angegebenen Volumina 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 austauschen oder mischen. Es wird empfohlen, keine Wells von verschiedenen Platten zu verwenden, auch nicht, wenn es sich um die 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 Stopplösung sollte vermieden werden, da sie Hautreizungen und Verätzungen verursachen kann.
17. Einige Reagenzien enthalten ProClin 300, CMIT und/oder MIT als Konservierungsmittel. Bei Kontakt mit Augen oder Haut sofort mit Wasser spülen.
18. Die Reagenzien des Kits sind als gesundheitsgefährdende Abfälle zu betrachten und gemäß den nationalen Vorschriften zu entsorgen.
19. Informationen zu im Kit enthaltenen gefährlichen Substanzen können dem Sicherheitsdatenblatt entnommen werden. Sicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt von der Firma Demeditec Diagnostics GmbH erhältlich. Diese sind auch unter www.demeditec.de zum Herunterladen zu finden.
20. Alle im Zusammenhang mit den Produkten, die auf dem EU-Markt bereitgestellt werden, auftretende schwerwiegende Ereignisse gemäß VERORDNUNG (EU) 2017/746 Artikel 2, Absatz 61 sind dem Hersteller und der zuständigen Behörde des Mitgliedstaates, in dem der Anwender oder Patient niedergelassen ist, gemäß VERORDNUNG (EU) 2017/746 Artikel 82 zu melden.
21. Sollten Produktinformationen, einschließlich Etikettierung falsch oder ungenau sein, bitte den Hersteller oder den Lieferanten des Kits kontaktieren.

4 BESTANDTEILE DES KITS

4.1 Kitinhalt

1. **SORB MT Mikrotiterplatte**, 12 x 8 (einzeln brechbare) Mikrotiterstreifen mit 96 Wells; 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.
Puffermatrix mit definierter Menge DHEA.
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.
Puffermatrix mit definierter Menge DHEA
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.
Kontakt mit der Stopplösung vermeiden. Kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
8. **WASH SOLN 10X Waschlösung, 10X** konzentriert, 1 Fläschchen, 50 ml; siehe „Vorbereitung der Reagenzien“ (siehe 4.4).

4.2 Nicht im Kit enthaltene aber erforderliche Geräte und Materialien

- Kalibriertes Mikrotiterplatten-Lesegerät mit 450 nm-Filter
- Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipetten und Mehrkanalpipetten mit Einwegspitzen
- Mikrotiterplatten-Schüttler (900 rpm)
- Manuelle oder automatische Geräte zum Waschen von Mikrotiterplatten
- Saugfähiges Papier
- Deionisiertes Wasser
- Zeitnahmegerät
- Semilogarithmisches Papier oder Software zur Datenverarbeitung
- Vortex-Mixer
- Mikrozentrifuge

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. Vor Hitze und direkter Sonneneinstrahlung schützen. 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 (18-25°C) gebracht werden.

Waschlösung

Die zehnfach konzentrierte Waschlösung (50 ml) mit 450 ml deionisiertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 500 ml verdünnen. Die verdünnte Waschlösung ist bei Raumtemperatur (18-25°C) für mindestens zwölf Wochen stabil. Bei einer Lagerung bei 2-8°C können sich Präzipitate bilden, die sich durch Schwenken bei Raumtemperatur wieder auflösen sollten (18-25°C). Die Waschlösung sollte erst verwendet werden, wenn sich die Präzipitate komplett aufgelöst haben.

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 Diagnostics GmbH 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 für den Test verwendet werden. Die Speichelproben sollten völlig farblos sein. Selbst die geringste Rotfärbung zeigt eine Blutkontamination an. Eine solche Blutkontamination führt zu falschen Konzentrationswerten. Im Falle einer sichtbaren Blutkontamination sollte der Patient die Probe verwerfen, das Sammelgefäß mit Wasser ausspülen, den Mund mit (vorzugsweise) kaltem Wasser spülen, zehn Minuten warten und eine neue Probe entnehmen.

5.1 Probenentnahme

Für die korrekte Sammlung von Speichel empfehlen wir, nur geeignete Sammelgefäße aus hochreinem Polypropylen zu verwenden. Verwenden Sie keine Sammelgefäße aus Polyethylen oder Salivetten für die Probenahme. Dies führt in den meisten Fällen zu erheblichen Interferenzen. Glasröhrchen können ebenfalls verwendet werden, aber in diesem Fall ist besondere Aufmerksamkeit erforderlich, um Störungen durch den Stopfen auszuschließen. Bitte kontaktieren Sie Demeditec Diagnostics GmbH für weitere Details.

Da die Steroidhormonsekretion sowohl im Speichel als auch im Serum ein deutliches dynamisches Sekretionsmuster über den Tag hinweg aufweist, ist es wichtig, innerhalb von zwei Stunden immer fünf Proben zu sammeln, d.h. alle 30 Minuten eine Probe. Es wird empfohlen, die Proben morgens innerhalb von zwei Stunden nach dem Aufwachen zu sammeln. Wenn möglich, sollte das Volumen jeder einzelnen Probe mindestens 0,5 ml (besser 1 ml) betragen. Den Mund zehn Minuten vor der Probenentnahme mit Wasser ausspülen. Der Patient sollte vor der Probenentnahme 60 Minuten keine größere Mahlzeit einnehmen, Zähne putzen oder Kaugummi kauen. Keine Probenentnahme innerhalb von 12 Stunden nach dem Genuss von Alkohol.

5.2 Probenaufbewahrung und Vorbereitung

Speichelproben können bis zu einer Woche bei 2-8°C gelagert werden. Bei längerer Lagerung wird empfohlen, die Proben bei $\leq -20^{\circ}\text{C}$ aufzubewahren. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren sollte auf ein Minimum beschränkt werden. Jede Probe muss auf jeden Fall mindestens einmal eingefroren, aufgetaut und zentrifugiert werden, um die Muzine durch Zentrifugation zu trennen. Wenn die Proben im Labor ankommen, müssen sie mindestens über Nacht eingefroren werden. Am nächsten Morgen werden die Proben aufgetaut und sorgfältig gemischt. Die Proben müssen fünf bis zehn Minuten lang zentrifugiert werden. Der klare, farblose Überstand ist einfach zu pipettieren. Sollte die Probe auch nur eine leichte Rotfärbung aufweisen, ist sie zu verwerfen. Blutkontaminationen können die Ergebnisse beeinflussen und zu falschen Ergebnissen führen. Aufgrund der episodischen Schwankungen der Steroidsekretion wird dringend die Strategie der Mehrfachentnahme empfohlen. Wenn ein solcher Satz von Mehrfachproben getestet werden muss, sollte das Laborpersonal (nach mindestens einem Einfrier-, Auftau- und Zentrifugationszyklus) Aliquots der fünf Einzelproben mischen und die Bestimmung mit dieser Mischung durchführen.

5.3 Probenverdünnung

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

6 TESTDURCHFÜHRUNG

6.1 Allgemeine Hinweise

- Alle Reagenzien und Proben müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur (18-25°C) 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 Wells 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.
- Standards, Kontrollen und Proben sollten zumindest in Doppelansätzen bestimmt werden.
- Die korrekte Durchführung der Waschschriffe ist entscheidend. Ungenügend gewaschene Wells ergeben falsche Ergebnisse. Die Verwendung einer Multikanalpipette bzw. Multistepppers oder eines automatischen Waschgerätes für Mikrotiterplatten wird empfohlen. Zwischen den Inkubationen die Wells nicht austrocknen lassen. Beim Waschen und Ausschütteln dürfen die beschichteten Wells nicht beschädigt werden. Alle Reagenzien müssen daher mit Vorsicht pipettiert werden. Beim Waschvorgang ist es wichtig, dass alle Wells vollständig und gleichmäßig mit Waschlösung gefüllt werden und nach dem Ausschütteln kein Rückstand an Flüssigkeit zurückbleibt.
- Jeder Testlauf muss eine eigene Standardkurve beinhalten.

6.2 Testdurchführung

1. Die benötigte Anzahl Wells der Mikrotiterplatte in der Halterung befestigen.
2. Je **100 μl Standard, Kontrolle und Probe** mit neuen Plastikspitzen in Duplikaten in die entsprechenden Wells geben.
3. **100 μl Enzymkonjugat** in jedes Well geben.
4. **60 Minuten** schüttelnd bei Raumtemperatur (18-25°C) auf einem Mikrotiterplatten-Schüttler bei 900 rpm inkubieren.
Achtung: Eine optimale Reaktion wird erheblich beeinflusst durch das Schütteln der Mikrotiterplatte!
5. Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln. Wells **4mal** mit verdünnter Waschlösung (300 μl pro Well) waschen. Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Wells auf saugfähigem Papier entfernen.
Achtung: Die Sensitivität und Präzision dieses Tests wird erheblich beeinflusst von der korrekten Durchführung des Waschschriffes!
6. **200 μl Substratlösung** in jedes Well geben.
7. **30 Minuten** bei Raumtemperatur (18-25°C) im Dunkeln ohne Schütteln inkubieren.
8. Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von **50 μl Stopplösung** in jedes Well beenden.
9. Die Optische Dichte bei **450 \pm 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. Die erhaltenen OD-Werte der Standards (y-Achse, linear) werden gegen ihre Konzentration (x-Achse, logarithmisch) entweder auf semi-logarithmischem Papier oder mit einer automatisierten Methode aufgetragen. Unter Verwendung der mittleren OD wird für jede Probe die entsprechende Konzentration aus der Standardkurve ermittelt.
3. Unter Verwendung der mittleren OD-Werte 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) 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 dürfen 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

Aufgrund der Unterschiede, die zwischen den einzelnen Laboratorien und Standorten in Bezug auf die Bevölkerung, die Labortechnik und die Auswahl der Referenzgruppe bestehen können, ist es wichtig, dass jedes Labor seine eigenen normalen und pathologischen Werte bestimmt. Die Proben wurden morgens entnommen.

| 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 |

Therapeutische Konsequenzen sollten nicht allein auf Basis der mit diesem Test ermittelten Ergebnisse getroffen werden, sondern unter Berücksichtigung klinischer Beobachtungen und weiterer diagnostischer Tests.

8 QUALITÄTSKONTROLLE

Es wird empfohlen, 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 Kit-Kontrollen mit den entsprechenden Ergebnissen 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 Diagnostics GmbH in Verbindung.

9 TEST CHARACTERISTIKA

9.1 Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität des DHEA free in Saliva ELISA wurde durch Subtraktion von 2 Standardabweichungen vom Mittelwert von mindestens zwanzig (20) Wiederholungsanalysen von Standard 0 (CAL 0) berechnet. Die analytische Sensitivität des Assays beträgt 6,4 pg/ml.

9.2 Spezifität der Antikörper (Kreuzreaktivität)

Die folgenden Materialien wurden auf Kreuzreaktivität untersucht. Der Prozentsatz gibt die Kreuzreaktivität bei 50% Verdrängung im Vergleich zu DHEA an.,

| Steroide | % Kreuzreaktivität |
|---------------------------------|--------------------|
| Testosteron | <0,01 |
| Androstendion | 0,07 |
| Progesteron | 0,04 |
| 17 α -Hydroxyprogesteron | 0,10 |
| Pregnenolon | 0,03 |
| 11-Deoxycorticosteron | 0,09 |
| Corticosteron | <0,01 |
| Cortisol | <0,01 |
| 11-Desoxycortisol | <0,01 |
| Estradiol-17 β | <0,01 |
| Estron | <0,01 |
| Estriol | <0,01 |

9.3 Messbereich

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

9.4 Präzision

9.4.1 Intra-Assay

Die Intra-Assay-Variation wurde durch die Bestimmung von 20 Wiederholungsmessungen von drei Speichelproben in einem Testansatz mit dem Demeditec DHEA free in Saliva ELISA ermittelt.

| | Probe 1 | Probe 2 | Probe 3 |
|--------------------|---------|---------|---------|
| Mittelwert (pg/ml) | 117,5 | 316,0 | 1018,3 |
| SD (pg/ml) | 12,9 | 25,1 | 82,8 |
| CV (%) | 11,0 | 7,9 | 8,1 |
| n = | 20 | 20 | 20 |

9.4.2 Inter-Assay

Die Inter-Assay-Variation wurde durch Doppelmessungen von drei Speichelproben in zehn verschiedenen Tests mit dem Demeditec DHEA free in Saliva ELISA bestimmt .

| | Probe 1 | Probe 2 | Probe 3 |
|--------------------|---------|---------|---------|
| Mittelwert (pg/ml) | 250,6 | 891,3 | 143,7 |
| SD (pg/ml) | 19,0 | 88,9 | 16,7 |
| CV (%) | 7,6 | 10,0 | 11,6 |
| n = | 10 | 10 | 10 |

9.5 Wiederfindung

Die Wiederfindungsrate wurde durch Zugabe zunehmender Mengen des Analyten zu drei verschiedenen Speichelproben, die unterschiedliche Mengen an endogenem Analyten enthielten, bestimmt. Jede Probe (nativ und nach Zugabe von definierten Mengen) wurde mit dem Demeditec DHEA free in Saliva ELISA gemessen. Die prozentualen Wiederfindungen wurden durch Vergleich der erwarteten und beobachteten Ergebnisse der Proben ermittelt.

| Saliva | Zugegebenes DHEA (pg/ml) | Beobachteter Wert (pg/ml) | Erwarteter Wert (pg/ml) | Wiederfindung (%) |
|--------|--------------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------|
| 1 | nativ | 242,9 | - | - |
| | 200 | 467,0 | 442,9 | 105 |
| | 400 | 714,2 | 642,9 | 111 |
| | 800 | 1158,3 | 1042,9 | 111 |
| 2 | nativ | 143,7 | - | - |
| | 200 | 417,7 | 343,7 | 122 |
| | 400 | 620,8 | 543,7 | 114 |
| | 800 | 1231,2 | 943,7 | 130 |
| 3 | nativ | 122,6 | - | - |
| | 200 | 338,4 | 322,6 | 105 |
| | 400 | 579,2 | 522,6 | 111 |
| | 800 | 1191,0 | 922,6 | 129 |

9.6 Linearität

Drei Speichelproben mit verschiedenen Mengen des Analyten wurden mit dem Standard 0 seriell verdünnt und mit dem Demeditec DHEA free in Saliva ELISA untersucht. Die prozentuale Linearität wurde durch Vergleich der erwarteten und beobachteten Werte berechnet.

| Saliva | Verdünnung | Beobachteter Wert (pg/ml) | Erwarteter Wert (pg/ml) | Wiederfindung (%) |
|--------|------------|---------------------------|-------------------------|-------------------|
| 1 | nativ | 690,5 | - | - |
| | 1 : 2 | 290,4 | 345,3 | 84 |
| | 1 : 4 | 140,2 | 172,6 | 81 |
| | 1 : 8 | 70,7 | 86,3 | 82 |
| 2 | nativ | 643,6 | - | - |
| | 1 : 2 | 294,7 | 321,8 | 92 |
| | 1 : 4 | 150,1 | 160,9 | 93 |
| | 1 : 8 | 69,6 | 80,5 | 87 |
| 3 | nativ | 513,2 | - | - |
| | 1 : 2 | 209,2 | 256,6 | 82 |
| | 1 : 4 | 92,0 | 128,3 | 72 |
| | 1 : 8 | 51,2 | 64,2 | 80 |

10 GRENZEN DES TESTS

Zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse können nur erzielt werden, wenn der Testansatz mit vollem Verständnis der Packungsbeilage und unter Einhaltung der guten Laborpraxis durchgeführt wird. Jede unsachgemäße Behandlung von Proben oder Modifikationen dieses Tests können die Ergebnisse beeinflussen.

10.1 Interferenzen

- Eine Kontamination der Speichelproben mit Blut beeinflusst das Ergebnis. Eine solche Verunreinigung kann bereits mit den Augen wahrgenommen werden. Im Falle einer sichtbaren Blut-Kontamination sollte der Patient die Probe verwerfen, das Probenentnahmegesäß mit Wasser spülen, zehn Minuten abwarten und eine erneute Probenentnahme durchführen. Weitere Informationen zur Probenentnahme und Vorbereitung sind in Kapitel 5 zu entnehmen.
- Natriumazid darf nicht in diesem Assay eingesetzt werden. In dem Fall kann es zu falschen Ergebnissen führen.
- Das Ergebnis eines jeden immunologischen Testsystems kann durch heterophile Antikörper, Anti-Spezies-Antikörper oder Rheumafaktoren, die in menschlichen Proben vorhanden sind, beeinflusst werden [8-10]. Das Auftreten von heterophilen Antikörpern bei Patienten, die regelmäßig mit Tieren oder tierischen Produkten in Berührung kommen, kann beispielsweise zu Störungen bei immunologischen Tests führen. Daher können Interferenzen mit diesem *In-vitro*-Immunoassay nicht ausgeschlossen werden. Bei Verdacht auf unplausible Ergebnisse sollten diese als nicht gültig betrachtet und durch weitere Untersuchungen überprüft werden. Zu diagnostischen Zwecken sollten die Ergebnisse immer nur in Verbindung mit dem klinischen Bild des Patienten und weiteren diagnostischen Tests betrachtet werden.

10.2 Beeinflussung durch Medikamente

Medikationen wie Cremes, Öle oder Pillen, die DHEA enthalten, haben einen entsprechenden Einfluss auf die Bestimmung des Analyten. Die klinische Bedeutung der Bestimmung von DHEA kann beeinflusst werden, wenn der Patient mit natürlichen oder synthetischen Steroiden behandelt wurde. Jede Medikation muss bei der Bewertung der Ergebnisse berücksichtigt werden.

10.3 High-Dose-Hook-Effekt

Bis zu einer getesteten Konzentration von 100.000 pg/ml DHEA wurde für den Demeditec DHEA free in Saliva ELISA kein High-Dose-Hook-Effekt beobachtet.

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 Diagnostics GmbH 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 ÄNDERUNGSHISTORIE DER ARBEITSANLEITUNG

Änderungen gegenüber der Vorgängerversion 2a-07/16 zur aktuellen Version 3-05/22

| | |
|------------|---|
| Deckblatt | Layout aktualisiert |
| Allgemein | Redaktionelle Änderungen |
| Kapitel 1 | Aktualisierung der Zweckbestimmung und Beschreibung des Analyten |
| Kapitel 2 | Aktualisierung; redaktionelle Änderung |
| Kapitel 3 | zusätzliche Informationen |
| Kapitel 4 | Aktualisierung und zusätzliche Angaben; Mikrotiterplatten-Schüttler bei 900 rpm benötigt (vorher ≥ 600 rpm) (4.2) |
| Kapitel 5 | Aktualisierung: Probenentnahme und Lagerbedingung von Speichelproben |
| Kapitel 6 | aktualisierte und zusätzliche Informationen (6.1; 6.3); Schütteln während der Inkubation bei 900 rpm (zuvor ≥ 600 rpm) (6.2) |
| Kapitel 9 | aktualisierte Testspezifikationen |
| Kapitel 10 | zusätzliche Informationen, Aktualisierungen Interferenzen, High-Dose-Hook-Effekt hinzugefügt (10.3) |
| Kapitel 12 | hinzugefügt |
| Kapitel 13 | Literatur aktualisiert |

13 REFERENZEN

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

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ELISAS

| Symbol | English | Deutsch | Française | Español | 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 | utilisation 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 catalogo |
|  | 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 | Tenga en cuenta y advertencias precauciones | Annoti avvisi e le precauzioni |
|  | Storage Temperature | Lagerungstemperatur | Température de conservation | Temperatura de conservación | 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> | Distributed by | Vertrieb durch | Distribution par | Distribución por | Distribuzione da parte di |
|  | Version | Version | Version | Versión | Versione |
|  | Single-use | Einmalverwendung | À usage unique | Uso único | Uso una volta |