

**СОДЕРЖАНИЕ**

1. НАЗНАЧЕНИЕ	2
2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА	3
3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	3
4. СОСТАВ НАБОРА	4
5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	5
6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ	5
7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА	5
8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА	6
9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	7
10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ	8
11. ЛИТЕРАТУРА	9

**CONTENT**

1. INTENDED USE	10
2. SUMMARY AND EXPLANATION	10
3. PRINCIPLE OF THE TEST	11
4. WARNINGS AND PRECAUTIONS	11
5. KIT COMPONENTS	12
6. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE	13
7. TEST PROCEDURE	13
8. QUALITY CONTROL	15
9. CALCULATION OF RESULTS	15
10. EXPECTED VALUES	15
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	16
12. LITERATURE	16

Инструкция составлена Руководителем службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА»,  
к. б. н. Д. С. Кострикиным

## **ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДЕГИДРОЭПИАНДРОСТЕРОН-СУЛЬФАТА В СЫВОРОТКЕ (ПЛАЗМЕ) КРОВИ «ДЭАС-ИФА»**

### **1. НАЗНАЧЕНИЕ**

**1.1.** Набор реагентов «ДЭАС-ИФА» предназначен для количественного определения концентрации дегидроэпиандростерон-сульфата в сыворотке (плазме) крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

**1.2.** Дегидроэпиандростерон – андроген с молекулярной массой 288,4 дальтон, секретирующийся в пучковой и сетчатой зонах надпочечников. В организме человека он присутствует в основном в виде сульфатного производного – дегидроэпиандростерон-сульфата (ДЭАС). Начиная с рождения, концентрация ДЭАС в плазме постепенно повышается, затем резко возрастает после пубертатного периода, достигая максимума к 20 годам, а после этого снижается. Поскольку ДЭАС является основным компонентом 17-кетостероидов (17-КС) в сыворотке, этот тест может заменить устаревшие методы определения 17-КС в моче. Повышение уровня ДЭАС отмечено при аденогенитальном синдроме, гирсутизме, акне, поликистозе яичников, врожденной гиперплазии и опухолях коры надпочечников, болезни Кушинга, синдроме Штейна-Левентала. Понижение концентрации ДЭАС происходит с возрастом у мужчин и женщин, а также отмечается при гиперлипидемии, психозе, псориазе, недостаточности коры надпочечников.

## 2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

Определение дегидроэпиандростерон-сульфата основано на использовании конкурентного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизованы кроличьи поликлональные антитела к ДЭАС. Дегидроэпиандростерон-сульфат из образца конкурирует с конъюгированным ДЭАС за связывание с антителами на поверхности лунки. В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) происходит окрашивание растворов в лунках. Интенсивность окраски обратно пропорциональна концентрации дегидроэпиандростерон-сульфата в исследуемом образце. Концентрацию дегидроэпиандростерон-сульфата в исследуемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания дегидроэпиандростерон-сульфата в калибровочных пробах.

## 3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

**3.1. Специфичность.** Перекрестная реакция кроличьих поликлональных антител к ДЭАС с другими анализатами приведена в таблице:

Аналит	Перекрестная реакция, %
ДЭАС	100
ДЭА	50
Другие родственные стероиды	<0.1

### 3.2. Воспроизводимость.

Коэффициент вариации результатов определения содержания ДЭАС в одном и том же образце сыворотки (плазмы) крови с использованием Набора «ДЭАС-ИФА» не превышает 8,0%.

### 3.3. Линейность.

Зависимость концентрации ДЭАС в образцах сыворотки (плазмы) крови при разведении их сывороткой (плазмой) крови, не содержащей ДЭАС, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 0.1-10 мкг/мл и составляет  $\pm 10,0\%$ .

### 3.4. Точность.

Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации ДЭАС предписанной, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 0.3 мкг/мл. Процент «открытия» составляет 90-110%.

### 3.5. Чувствительность.

Минимальная достоверно определяемая Набором «ДЭАС-ИФА» концентрация ДЭАС в сыворотке (плазме) крови не превышает 0.05 мкг/мл.

## 4. СОСТАВ НАБОРА

Код компонента	Символ	Наименование	Кол-во	Ед.	Описание
1	P215Z	<b>Планшет</b> 96-луночный полистироловый, стрипированный, готов к использованию	1	шт.	-
2	C215Z	<b>Калибровочные пробы</b> на основе сыворотки крови человека, содержащие известные количества дегидроэпиандростерон-сульфата – <b>0; 0.1; 0.3; 1; 3; 10 мкг/мл</b> , готовы к использованию (по 0.8 мл каждая)	6	шт.	прозрачные жидкости синего цвета (калибровочная проба 0 – прозрачная бесцветная жидкость)
3	Q215Z	<b>Контрольная сыворотка</b> на основе сыворотки крови человека с известным содержанием дегидроэпиандростерон-сульфата, готова к использованию (0.8 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
4	T215Z	<b>Конъюгат</b> , готов к использованию (11 мл)	1	шт.	прозрачная жидкость пурпурного цвета
5	R055Z	<b>Раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ)</b> , готов к использованию (11 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
6	S008Z	<b>Концентрат отмывочного раствора</b> , 21х-кратный (22 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
7	R050Z	<b>Стоп-реагент</b> , готов к использованию (11 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
8	N003	Бумага для заклеивания планшета	2	шт.	-
9	K215I	Инструкция по применению Набора реагентов «ДЭАС-ИФА»	1	шт.	-
10	K215Q	Паспорт контроля качества Набора реагентов «ДЭАС-ИФА»	1	шт.	-

## 5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

**5.1.** Потенциальный риск применения Набора – класс 2a (ГОСТ Р 51609-2000).

**5.2.** Все компоненты Набора, за исключением стоп-реагента (5,0% раствор серной кислоты), в используемых концентрациях являются нетоксичными.

Раствор серной кислоты обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. При попадании на кожу и слизистые пораженный участок следует промыть большим количеством проточной воды.

**5.3.** При работе с Набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

**5.4.** При работе с Набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированный материал, способный длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

## 6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

- фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность содержимого лунок планшета при длине волны 450 нм;
- термостат, поддерживающий температуру  $+37 \pm 0,1$  °С;
- дозаторы со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы в диапазоне 25-250 мкл;
- цилиндр мерный вместимостью 500 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная.

## 7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

**7.1.** Перед проведением анализа компоненты Набора и исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови следует выдержать при комнатной температуре ( $+18-25$  °С) не менее 30 мин.

### **7.2. Приготовление планшета.**

Вскрыть пакет с планшетом и установить на рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы, чтобы предотвратить воздействие на них влаги, тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре  $+2-8$  °С в течение всего срока годности Набора.

### **7.3. Приготовление отмывочного раствора.**

В случае дробного использования Набора следует отобрать необходимое количество концентрата отмывочного раствора и развести дистиллированной водой в 21 раз (1 мл концентрата отмывочного раствора + 20 мл дистиллированной воды).

## 8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

**8.1.** Набор реагентов «ДЭАС-ИФА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2-8 °С в течение всего срока годности, указанного на упаковке Набора.

Допускается хранение (транспортировка) Набора при температуре до +25 °С не более 5 суток. Не допускается замораживание целого набора.

**Допускается однократное замораживание (-20 °С) калибровочных проб и контрольной сыворотки в аликвотах.**

**8.2.** Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 41 исследуемых образцов, 6 калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки (всего 96 определений).

**8.3.** В случае дробного использования Набора компоненты следует хранить следующим образом:

- оставшиеся неиспользованными стрипы необходимо тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре +2-8 °С в течение всего срока годности Набора;
- конъюгат, субстрат, стоп-реагент после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2-8 °С в течение всего срока годности Набора;
- калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2-8 °С не более 2 месяцев;
- оставшийся неиспользованным концентрат отмывочного раствора следует хранить при температуре +2-8 °С в течение всего срока годности Набора;
- приготовленный отмывочный раствор следует хранить при комнатной температуре (+18-25 °С) не более 5 суток или при температуре +2-8 °С не более 30 суток;

Примечание. После использования реагента немедленно закрывайте крышку флакона. Закрывайте каждый флакон своей крышкой.

**8.4.** Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку (плазму) крови, а также сыворотку (плазму) крови, содержащую азид натрия. Если анализ производится не в день взятия крови, сыворотку (плазму) следует хранить при температуре -20 °С. Повторное замораживание-оттаивание образцов сыворотки (плазмы) крови не допускается.

**8.5.** Исключается использование для анализа образцов сыворотки (плазмы) крови людей, получавших в целях диагностики или терапии препараты, в состав которых входят мышинные антитела.

**8.6.** При использовании Набора для проведения нескольких независимых серий анализов следует иметь в виду, что для каждого независимого определения необходимо построение нового калибровочного графика; кроме этого, рекомендуется определение концентрации дегидроэпиандростерон-сульфата в контрольной сыворотке.

**8.7.** Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению Набора.

## 9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1	Поместите в рамку необходимое количество стрипов – исследуемые образцы в 2 повторах и 14 лунок для калибровочных проб и контрольной сыворотки.
2	<b>Внесите в соответствующие лунки в дубликатах по 25 мкл калибровочной пробы и контрольной сыворотки. В остальные лунки внесите в дубликатах по 25 мкл исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови.</b> Внесение калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых образцов необходимо произвести в течение 5–10 минут.
3	<b>Внесите во все лунки по 100 мкл конъюгата.</b>
4	Заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета и <b>инкубируйте</b> его в течение <b>60 минут при температуре +37 °С.</b>
5	По окончании инкубации удалите содержимое лунок и <b>отмойте лунки 5 раз.</b> При каждой отмывке добавьте во все лунки по 250 мкл отмывочного раствора (см. п. 7.3), встряхните планшет круговыми движениями по горизонтальной поверхности с последующей аспирацией или декантированием. Задержка при отмывке (замачивание лунок) не требуется. При каждом декантировании необходимо тщательно удалять остатки жидкости из лунок постукиванием планшета в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.
6	<b>Внесите во все лунки по 100 мкл раствора субстрата тетраметилбензидаина.</b> Внесение раствора субстрата тетраметилбензидаина в лунки необходимо произвести в течение 2–3 мин. <b>Инкубируйте планшет в темноте при комнатной температуре (+18–25°С) в течение 10–20 минут</b> в зависимости от степени развития синего окрашивания.
7	<b>Внесите во все лунки</b> с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор субстрата тетраметилбензидаина, <b>по 100 мкл стоп-реагента</b> , при этом содержимое лунок окрашивается в яркий желтый цвет.
8	<b>Измерьте величину оптической плотности (ОП) содержимого лунок планшета на фотометре</b> вертикального сканирования <b>при длине волны 450 нм.</b> Измерение ОП содержимого лунок планшета необходимо произвести в течение 15 мин после внесения стоп-реагента. Бланк фотометра выставляйте по воздуху.
9	Постройте в полулогарифмических координатах калибровочный график: ось абсцисс (х) – десятичный логарифм концентрации ДЭАС в калибровочных пробах (мкг/мл), ось ординат (у) – оптическая плотность калибровочных проб (ОП 450 нм). Для алгоритма обсчета (аппроксимации) калибровочного графика используйте интервальный (кусочно-линейный, «от точки к точке») метод. Приравняйте концентрацию калибровочной пробы 0 мкг/мл к несущественно малой величине, например, 0.001 мкг/мл
10	Определите по калибровочному графику содержание ДЭАС в исследуемых образцах.

## 10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ

**10.1.** Основываясь на результатах исследований, проведенных ООО «ХЕМА», рекомендуем пользоваться нормами, приведенными ниже. Вместе с тем, в соответствии с правилами *GLP* (Хорошей лабораторной практики), каждая лаборатория должна сама определить параметры нормы, характерные для обследуемой популяции.

**Примечание.** Значения концентраций ДЭАС в исследуемых образцах, находящиеся ниже границы чувствительности Набора (0.05 мкг/мл), а также превышающие значение верхней калибровочной пробы (10 мкг/мл) следует приводить в следующей форме: в исследуемом образце X концентрация ДЭАС ниже 0.05 мкг/мл или выше 10 мкг/мл.

10.2. В Наборе «ДЭАС-ИФА» значения концентраций калибровочных проб выражены в мкг/мл. Для пересчета концентраций в мкмоль/л, полученное значение концентрации в мкг/мл следует умножить на 2.6.

$$1 \text{ мкг/мл} = 2.6 \text{ мкмоль/л}$$

Исследуемая группа	Единицы		Единицы доп.	
	мкг/мл		мкмоль/л	
	Нижний предел	Верхний предел	Нижний предел	Верхний предел
Мужчины				
новорожденные	1.08	4.06	2.81	10.56
1 месяц-5 лет	0.01	0.41	0.03	1.07
6-9 лет	0.03	1.45	0.07	3.77
10-11 лет	0.12	1.15	0.31	2.99
12-17 лет	0.2	5.55	0.52	14.43
18-30 лет	1.25	6.19	3.25	16.09
31-50 лет	0.59	4.52	1.53	11.75
51-60 лет	0.2	4.13	0.52	10.74
>61 года	0.1	2.35	0.26	6.11
Женщины				
новорожденные	0.1	2.48	0.26	6.45
1 месяц-5 лет	0.05	0.55	0.13	1.43
6-9 лет	0.03	1.4	0.07	3.64
10-11 лет	0.15	2.6	0.39	6.76
12-17 лет	0.2	5.35	0.52	13.91
18-30 лет	0.29	7.81	0.75	20.31
31-60 лет	0.12	3.79	0.31	9.85
менопауза	0.3	2.6	0.78	6.76
Беременные:				
1-й триместр	0.38	3.6	0.99	9.36
2-й триместр	0.42	3.0	1.09	7.8
3-й триместр	0.32	2.5	0.83	6.5



## 11. ЛИТЕРАТУРА

1. P. Tijssen, «Practice & Theory of Enzyme Immunoassays», (1985) Amsterdam: Elsevier.
2. E. Friess, et al., Eur J Clin Invest, (2000) 30 Suppl 3:46-50.
3. C. Longscope, J Endocrinology, (1996) 150 Suppl: S125-S127.
4. J. Herbert, Lancet, (1995) 345:1193-1194.
5. A. Michael, et al., Biol. Psychiatry, (2000) 48(10): 989-95.
6. C.R. Dequet and D.J. Wallace, Current Opin Invest Drugs, (2001) 8: 1045-53.
7. W.M. Jeffries., Med Hypotheses, (1998) 51(2):111-4.
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards Evaluation Protocols, SC1, (1989) Villanova, PA: NCCLS.

По вопросам, касающимся качества Набора **«ДЭАС-ИФА»**,  
следует обращаться в ООО «ХЕМА» по адресу:  
105043, Москва, а/я 58,  
тел./факс: (495) 737-39-36, 737-00-40, 510-57-07 (многоканальный)

электронная почта: [info@xema.ru](mailto:info@xema.ru); [rqc@xema.ru](mailto:rqc@xema.ru)  
интернет: [www.xema.ru](http://www.xema.ru); [www.xema-medica.com](http://www.xema-medica.com)

Руководитель службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА»,  
к. б. н. Д. С. Кострикин

*Instruction for use***A SOLID-PHASE ENZYME IMMUNOASSAY  
FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION  
OF DEHYDROEPIANDROSTERONE SULFATE  
IN HUMAN BLOOD SERUM OR PLASMA****1. INTENDED USE**

A solid-phase enzyme immunoassay for the quantitative determination of dehydroepiandrosterone sulfate in blood serum or plasma.

This kit is designed for measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in blood serum or plasma. For possibility of use with other sample types, please, refer to Application Notes (on request). The kit contains reagents sufficient for 96 determinations and allows to analyze 41 unknown samples in duplicates.

**2. SUMMARY AND EXPLANATION**

Dehydroepiandrosterone (DHEA) is an androgen with a MW of 288.4 Dalton secreted in adrenals. The main derivate of DHEA present in human tissue is DHEA sulfate (DHEAS). Since birth, DHEAS serum concentration is increasing continuously showing a pronounced peak after puberty and maximal levels at the age of 20. After that, serum DHEAS level continuously decreases. As DHEAS is the main component of 17-ketosteroids in serum, this test may substitute for column tests for determination of 17-ketosteroids in urine.

Elevated DHEAS concentrations are found in adrenogenital syndrome, hirsutism, acne, benign hyperplasia of adrenals and adrenal tumors, Stein-Leventhal syndrome, polycystic ovary syndrome.

Decreased levels of DHEAS are found in hyperlipidemia, psychotic states, psoriasis, adrenal insufficiency.

### 3. PRINCIPLE OF THE TEST

This test is based on competition enzyme immunoassay principle. Tested specimen is placed into the microwells coated by specific rabbit polyclonal to DHEAS-antibodies simultaneously with conjugated DHEAS-peroxidase. DHEAS from the specimen competes with the conjugated DHEAS for coating antibodies. After washing procedure, the remaining enzymatic activity bound to the microwell surface is detected and quantified by addition of chromogen-substrate mixture, stop solution and photometry at 450 nm. Optical density in the microwell is inversely related to the quantity of the measured analyte in the specimen.

### 4. WARNINGS AND PRECAUTIONS

**4.1.** For professional use only.

**4.2.** This kit is intended for in vitro diagnostic use only.

**4.3. INFECTION HAZARD:** There is no available test methods that can absolutely assure that Hepatitis B and C viruses, HIV-1/2, or other infectious agents are not present in the reagents of this kit. All human products, including patient samples, should be considered potentially infectious. Handling and disposal should be in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guidelines or regulations.

**4.4.** Avoid contact with stop solution containing 5,0% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. It may cause skin irritation and burns.

**4.5.** Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents may give false results.

**4.6.** Do not use the kit beyond the expiration date.

**4.7.** All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microplate readers.

**4.8.** Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.

**4.9.** Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guidelines or regulations.

**4.10.** Do not mix reagents from different lots.

**4.11.** Replace caps on reagents immediately. Do not swap caps.

**4.12.** Do not pipette reagents by mouth.

**4.13.** Specimens must not contain any AZIDE compounds – they inhibit activity of peroxidase.

**4.14.** Safety Data Sheet for this product is available upon request directly from XEMA Co., Ltd.

**4.15.** The Safety Data Sheet fit the requirements of EU Guideline 91/155 EC.

## 5. KIT COMPONENTS

### 5.1. Contents of the Kit

Symbol	Description	Qty	Units	Colour code	Stability of opened/diluted components
1	SORB MTP DHEAS EIA strips, 8x12 wells	1	pcs		until exp.date
2	CAL 1-6 Calibrator set, 0.8 ml each. The set contains 6 calibrators: 0; 0.1; 0.3; 1; 3; 10 µg/ml	6	pcs	blue (C1 – colourless)	2 months
3	CONTROL Control serum (0.8 ml)	1	pcs	colourless	2 months
4	CONJ HRP Conjugate, 11 ml	1	pcs	purple	until exp.date
5	SUBS TMB Substrate solution, 11 ml	1	pcs	colourless	until exp.date
6	BUF WASH 21X Washing solution concentrate 21x, 22 ml	1	pcs	colourless	Concentrate – until exp.date Diluted washing solution – 1 month at 2-8°C or 5 days at RT
7	STOP Stop solution, 11 ml	1	pcs	colourless	until exp.date
8	N003 Plate sealing tape	2	pcs		N/A
9	K215I Instruction DHEAS EIA	1	pcs		N/A
10	K215Q QC data sheet DHEAS EIA	1	pcs		N/A

**5.2. Equipment and material required but not provided**

- Distilled or deionized water;
- Automatic or semiautomatic multichannel micropipettes, 100-250  $\mu$ l, is useful but not essential;
- Calibrated micropipettes with variable volume, range volume 25-250  $\mu$ l;
- Dry thermostat for 37  $^{\circ}$ C  $\pm$  0.1  $^{\circ}$ C
- Calibrated microplate photometer with 450 nm wavelength and OD measuring range 0-3.0

**5.3. Storage and stability of the Kit**

Store the whole kit at 2 to 8  $^{\circ}$ C upon receipt until the expiration date.

After opening the pouch keep unused microtiter wells TIGHTLY SEALED BY ADHESIVE TAPE (INCLUDED) to minimize exposure to moisture.

**6. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE**

This kit is intended for use with serum or plasma (ACD- or heparinized). Grossly hemolytic, lipemic, or turbid samples should be avoided.

Specimens may be stored for up to 48 hours at 2–8  $^{\circ}$ C before testing. For a longer storage, the specimens should be frozen at -20  $^{\circ}$ C or lower. Repeated freezing/thawing should be avoided.

**7. TEST PROCEDURE****7.1. Reagent Preparation**

- All reagents (including unsealed microstrips) should be allowed to reach room temperature (+18 to +25  $^{\circ}$ C) before use.
- All reagents should be mixed by gentle inversion or vortexing prior to use. Avoid foam formation.
- It is recommended to spin down shortly the tubes with calibrators on low speed centrifuge.
- Prepare washing solution from the concentrate BUF WASH 21X by 21 dilutions in distilled water.

**7.2. Procedural Note:**

It is recommended that pipetting of all calibrators and samples should be completed within 3 minutes.

**7.3. Assay flowchart**

See the example of calibration graphic in Quality Control data sheet.

**7.4. Alternative units:**

1  $\mu$ g/ml = 2.6  $\mu$ Mol/l

**7.5.** Assay procedure

1	Put the desired number of microstrips into the frame; allocate 14 wells for the calibrators CAL 1–6 and control samples CONTROL and two wells for each unknown sample. DO NOT REMOVE ADHESIVE SEALING TAPE FROM UNUSED STRIPS.
2	Pipet 25 µl of calibrators CAL 1–6, control samples CONTROL and unknown samples into the wells.
3	Dispense 100 µl of CONJ HRP into the wells. Cover the wells by plate adhesive tape (included into the kit)
4	Incubate 60 minutes at 37 °C.
5	Prepare washing solution by 21x dilution of washing solution concentrate (BUF WASH 21X) by distilled water. Wash the strips 5 times.
6	Dispense 100 µl of SUBS TMB into the wells
7	Incubate 10–20 minutes at 18–25 °C
8	Dispense 100 µl of STOP into the wells.
9	Measure OD (optical density) at 450 nm.
10	Set photometer blank on air
11	Apply lin-log method for data reduction.

**7.6.** Handling notes

Calibrators and control sample(s) – only one freezing/thawing cycle is allowed

## 8. QUALITY CONTROL

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.

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 federal, state, and local standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls 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.

## 9. CALCULATION OF RESULTS

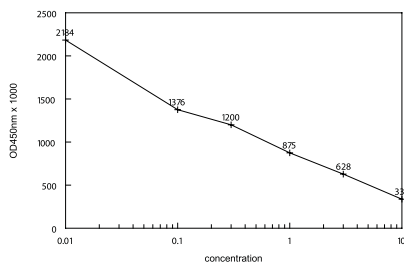
**9.1.** Calculate the mean absorbance values (OD450) for each pair of calibrators and samples.

**9.2.** Plot a calibration curve on graph paper: OD versus dehydroepiandrosterone sulfate concentration.

**9.3.** Determine the corresponding concentration of dehydroepiandrosterone sulfate in unknown samples from the calibration curve. Manual or computerized data reduction is applicable on this stage. Point-by-point or linear data reduction is recommended due to non-linear shape of curve.

**9.4.** Below is presented a typical example of a standard curve with the XEMA Co. Not for calculations!

Calibrators	Value	Absorbance Units (450 nm) x 1000
CAL 1	0 µg/ml	2184
CAL 2	0.1 µg/ml	1376
CAL 3	0.3 µg/ml	1200
CAL 4	1 µg/ml	875
CAL 5	3 µg/ml	628
CAL 6	10 µg/ml	337



## 10. EXPECTED VALUES

Therapeutical consequences should not be based on results of IVD methods alone – all available clinical and laboratory findings should be used by a physician to elaborate therapeutically measures. Each laboratory should establish its own normal range for DHEAS. Based on data obtained by XEMA, the following normal range is recommended (see below). NOTE: the patients that have received murine monoclonal antibodies for radioimaging or immunotherapy develop high titered anti-mouse antibodies (HAMA). The presence of these antibodies may cause false results in the present assay. Sera from HAMA positive patients should be treated with depleting adsorbents before assaying.

Sex, age	Units		Units alternative	
	µg/ml		µMol/l	
	Lower limit	Upper limit	Lower limit	Upper limit
Males				
newborn	1.08	4.06	2.81	10.56
1 month-5 yrs	0.01	0.41	0.03	1.07
6-9 yrs	0.03	1.45	0.07	3.77
10-11 yrs	0.12	1.15	0.31	2.99
12-17 yrs	0.2	5.55	0.52	14.43
18-30 yrs	1.25	6.19	3.25	16.09
31-50 yrs	0.59	4.52	1.53	11.75
51-60 yrs	0.2	4.13	0.52	10.74
>61 yr	0.1	2.35	0.26	6.11
Females				
newborn	0.1	2.48	0.26	6.45
1 month-5 yrs	0.05	0.55	0.13	1.43
6-9 yrs	0.03	1.4	0.07	3.64
10-11 yrs	0.15	2.6	0.39	6.76
12-17 yrs	0.2	5.35	0.52	13.91
18-30 yrs	0.29	7.81	0.75	20.31
31-60 yrs	0.12	3.79	0.31	9.85
post menopausal	0.3	2.6	0.78	6.76
Pregnancy week:				
1st trimester	0.38	3.6	0.99	9.36
2nd trimester	0.42	3.0	1.09	7.8
3rd trimester	0.32	2.5	0.83	6.5

## 11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### 11.1. Analytical specificity / Cross reactivity

Analyte	Cross-reactivity, % wt/wt
DHEAS	100
DHEA	50
other steroids	<0.1

### 11.2. Analytical sensitivity

Sensitivity of the assay was assessed as being 0.05 µg/ml.

### 11.3. Linearity

Linearity was checked by assaying dilution series of 5 samples with different dehydroepiandrosterone sulfate concentrations. Linearity percentages obtained ranged within 90 to 110%.

### 11.4. Recovery

Recovery was estimated by assaying 5 mixed samples with known dehydroepiandrosterone sulfate concentrations. The recovery percentages ranged from 90 to 110%.

## 12. LITERATURE

Look page 9.