

6.2 Testdurchführung

1.	Die benötigte Anzahl Wells der Mikrotiterplatte in der Halterung befestigen.
2.	Je 100 µl Standard, Kontrolle und Probe mit <u>neuen Plastikspitzen</u> 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 Waschschrilles!
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±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 DHEA Saliva ELISA gezeigt. Diese Werte dürfen nicht zur Berechnung von Patientendaten verwendet werden.

Standard	Optische Dichte (450 nm)
Standard A 0 pg/ml	2,940
Standard B 10 pg/ml	2,701
Standard C 40 pg/ml	2,290
Standard D 160 pg/ml	1,657
Standard E 640 pg/ml	0,890
Standard F 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 dem Hersteller in Verbindung.

9. TEST CHARACTERISTIKA

9.1 Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität des DHEA Saliva ELISA wurde durch Subtraktion von 2 Standardabweichungen vom Mittelwert von mindestens zwanzig (20) Wiederholungsanalysen von Standard A (STD A) 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 DHEA 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 DHEA 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 endogenen Analyten enthielten, bestimmt. Jede Probe (nativ und nach Zugabe von definierten Mengen) wurde mit dem DHEA 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 A seriell verdünnt und mit dem DHEA 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 DHEA 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 dem Hersteller 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 6.0c zur aktuellen Version 7.0

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.

Symbole:

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