GRUPO MEXLAB®

ALTA CALIDAD EN PRUEBAS PARA SU LABORATORIO

# DHEA-S ELISA

No. de producto DH291S (96 Pruebas)

## USO INDICADO

El kit ELISA de DHEA-S se utiliza para la medición cuantitativa de DHEA-S en suero humano y plasma.

## RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La DHEA-S es una hormona esteroide producida principalmente en la corteza de las glándulas suprarrenales. Las mediciones de este esteroide son ampliamente utilizadas en la práctica clínica. La importancia clínica de los ensayos plasmáticos de DHEA-S se asocia con el diagnóstico de hiperplasia suprarrenal y diagnóstico diferencial de hirsutismo.

## PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El kit DHEA-S se basa en el principio de unión competitiva entre la DHAEA-S en la muestra del ensayo y DHEA-S conjugada con HRP para una cantidad constante de anticuerpos anti-DHEA-S. En la primera incubación, los pozos recubiertos con cabra-anti-Conejo-IgG se incuban con 10µl de estándar de DHEA-S, muestras de pacientes, 50µl de reactivo de enzima DHEA-S (HRP) y 50µl de reactivo de anticuerpo anti-DHEA-S a temperatura ambiente, durante 60 minutos. Durante la incubación, el DHEA-S marcado con HRP compite con la DHEA-S endógena en el estándar y la muestra, para un número fijo de sitios de unión del anticuerpo DHEA-S, mientras que simultáneamente el anticuerpo anti DHEA-S se une al anticuerpo secundario inmovilizado. Por lo tanto, la cantidad de conjugado DHEA-S HRP inmunológicamente unido al pozo disminuye progresivamente a medida que aumenta la concentración de DHEA-S en la muestra. A continuación, se retira el conjugado DHEA-S HRP sin unir y se lavan los pozos. A continuación, el reactivo TMB se añade y se incuba a temperatura ambiente durante 30 minutos, lo que resulta en el desarrollo de color azul. El desarrollo del color se detiene con la adición de la solución stop, y la absorbancia se mide espectrofotométricamente a 450 nm. Se prepara una curva estándar relacionando la intensidad del color con la concentración de DHEA-S.

| MATERIALES PROPORCIONADOS | 96 Pruebas |
|---|---|
| Micropocillos recubiertos con Cabra anti-conejo IgG | 12x8x1 |
| Set estándar, 7 viales (listos para usar) | 0.25 ml |
| Reactivo enzimático DHEA-S, 1 botella (lista para usar) | 6 ml |
| Reactivo de anticuerpo Anti- DHEA-S, 1 botella (lista para usar) | 6 ml |
| Sustrato TMB (listo para usar) | 12 ml |
| Solución Stop (listo para usar) | 12 ml |
| Solución de lavado, 1 frasco (20X) | 25 ml |

## MATERIALES NO SUMINISTRADOS

1. Pipetas de precisión
2. Puntas de pipeta desechables
3. Lector ELISA capaz de leer la absorbancia a 450 nm
4. Mezclador Vortex de cabeza plana
5. Agitador de placas
6. Papel gráfico

## ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

1. Conservar el kit a 2-8°C
2. Mantenga los micropocillos sellados en una bolsa seca con desecantes.
3. Los reactivos son estables hasta la expiración del kit.
4. No exponga los reactivos de prueba al calor, al sol o a la luz fuerte.

## ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Posibles materiales biológicos peligrosos:

1. El estándar contiene componentes de origen humano, que han sido probados y encontrados no reactivos para el antígeno de superficie de la hepatitis B, así como anticuerpos contra el VIH con reactivos autorizados por la FDA. Sin embargo, no existe un método de prueba que pueda ofrecer una garantía completa de que el VIH, el virus de la hepatitis B u otros agentes infecciosos están ausentes. Estos reactivos deben tratarse en el nivel 2 de Bioseguridad, como se recomienda en el manual de los Centros para el Control y la Salud de enfermedades, "Bioseguridad en laboratorios microbiológicos y biomédicos" 1984.
2. Este kit de prueba está diseñado para uso de investigación solamente.
3. No pipetee por vía oral. No fume, coma ni beba en las áreas en las que se manipulan muestras o reactivos del kit.
4. Los componentes de este kit están diseñados para su uso como unidad integral. Los componentes de diferentes lotes no deben mezclarse.
5. Se recomienda que las normas, el control y las muestras de suero se ejecuten por duplicado.
6. Los resultados óptimos se obtendrán mediante una estricta adhesión a este protocolo. Pipeteos exactos y precisos, así como seguir los requisitos exactos de tiempo y temperatura prescritos son esenciales. Cualquier desviación de esto puede producir datos no válidos.

## MANEJO Y RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

1. Recoger muestras de sangre y separar el suero inmediatamente.
2. Las muestras pueden almacenarse refrigeradas a (2-8°C) durante 1 semana. Si el tiempo de almacenamiento supera la semana, almacene congelado a (-20°C) hasta un máximo de un mes.
3. Evitar varios ciclos de congelación y descongelación.
4. Antes del ensayo, los sueros congelados deben descongelarse y mezclarse bien.
5. No utilice muestras altamente lipémicas.

## PREPARACIÓN DE REACTIVOS

1. **Preparar 1X búfer de lavado** añadiendo el contenido de la botella (25 ml, 20X) a 475 ml de agua destilada o desionizada. Conservar a temperatura ambiente (18-24°C).

## PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

Se debe permitir que todos los reactivos y muestras lleguen a temperatura ambiente antes de su uso.

1. Fijar el número deseado de tiras recubiertas en el soporte.
2. Dispensar 10µl de cada estándar, controles y muestra con nuevas puntas desechables en los pozos apropiados.
3. Dispensar 50µl de reactivo enzimático DHEA-S en cada pozo.
4. Dispensar 50µl de reactivo de anticuerpo Anti-DHEA-S en cada pozo.
5. Mezclar minuciosamente la placa durante 10 segundos. Es importante tener una mezcla completa en este paso.
6. Incubar durante 60 minutos a temperatura ambiente.
7. Agitar rápidamente el contenido de los pozos.
8. Enjuagar los pozos 3 veces con la solución de lavado diluida (350µl por pozo). Golpee los pozos fuertemente sobre papel absorbente para eliminar las gotas residuales.
9. Añadir 100 l de sustrato de TMB en cada pocillo.
10. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
11. Detener la reacción enzimática añadiendo 50µl de solución Stop en cada pozo.
12. Leer la absorbancia en el lector ELISA a 450 nm dentro de los 10 minutos posteriores a la adición de la solución Stop.

**CÁLCULO DE RESULTADOS**

La curva estándar se construye de la siguiente manera:

1. Compruebar el valor estándar de DHEA-S en cada vial estándar. Este valor puede variar de lote a lote. Asegúrese de comprobar el valor de cada kit. Vea el ejemplo del estándar adjunto**.**
2. Para construir la curva estándar, trazar la absorbancia para los estándares DHEA-S (eje vertical) frente a las concentraciones estándar (eje horizontal) en un papel gráfico lineal. Dibuja la mejor curva a través de los puntos.
3. Leer la absorbancia de los controles y cada muestra desconocida de la curva. Registre el valor de cada control o ejemplo desconocido.

**Ejemplo de una curva estándar**

| | Conc. µg/mL | OD 450 nm |
|---|---|---|
| Est. 1 | 0 | 2.02 |
| Est. 2 | 0.1 | 1.34 |
| Est. 3 | 0.5 | 0.95 |
| Est. 4 | 1 | 0.70 |
| Est. 5 | 2.5 | 0.40 |
| Est. 6 | 5 | 0.24 |
| Est. 7 | 10 | 0.13 |

**VALORES ESPERADOS**

Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios rangos normales basados en un muestreo representativo de la población local. Los siguientes valores solo se pueden utilizar como rangos de directriz iniciales:

| Clasificación | Rango normal |
|---|---|
| *Masculino* | 1.0 - 4.2 µg/ml |
| *Femenino* | |
| Premenopáusica | 0.8 - 3.9 µg/ml |
| Embarazo | 0.2 - 1.2 µg/ml, |
| Posmenopáusica | 0.1 - 0.6 µg/ml |
| *Recién nacido (ambos sexos)* | 1.7 - 3.6 µg/ml |

Factor de conversión: 1 µg/ml = 2.6 µmol/L

**LIMITACIONES DE LA PRUEBA**

1. Los resultados de las pruebas obtenidas con este kit sólo sirven como una ayuda para el diagnóstico y deben interpretarse en relación con la historia del paciente, los hallazgos físicos y otros procedimientos de diagnóstico.
2. No utilizar azida sódica como conservante. La azida sódica inhibe las actividades enzimáticas de HRP.

**CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO**

**Correlación con un kit ELISA de referencia:**

Un total de 60 sueros fueron probados por este ELISA y un kit ELISA de referencia. Los resultados fueron los siguientes:

| Correlación | Pendiente | Intercepción |
|---|---|---|
| 0.99 | 1.05 | 0.026 |

**Precisión**

**Intra-Ensayo**

| Suero | No. de réplicas | Media µg/ml | Desviación estándar | Coeficiente de variación (%) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 16 | 0.82 | 0.033 | 4.0 |
| 2 | 16 | 1.61 | 0.061 | 3.8 |
| 3 | 16 | 4.75 | 0.169 | 3.5 |

**Inter-ensayo**

| Suero | No. de réplicas | Media µg/ml | Desviación estándar | Coeficiente de variación (%) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 16 | 0.82 | 0.035 | 4.23 |
| 2 | 16 | 1.59 | 0.053 | 3.35 |
| 3 | 16 | 4.68 | 0.177 | 3.77 |

**Sensibilidad**

La sensibilidad se determinó calculando la media más 2DE del punto cero estándar probado 20 veces en la misma ejecución.

| Suero | No. de réplicas | Media µg/ml | Desviación estándar | Media + 2DE (Sensibilidad) |
|---|---|---|---|---|
| Estándar Cero | 20 | 0.007 | 0.0165 | 0.0236 |

**Especificidad**

El porcentaje de reactividad cruzada de la prueba DHEA-S a otros compuestos relacionados, se evaluó añadiendo los compuestos a la matriz sérica en concentraciones masivas. La reactividad cruzada se calculó derivando una relación entre la dosis del compuesto interferente y la dosis de DHEA-S necesaria para desplazar la misma cantidad de análogo etiquetado.

| Compuesto | % Reactividad cruzada |
|---|---|
| DHEA-S | 100% |
| E1, 10ng/ml | ND |
| E2, 10ng/ml | ND |
| E3, 400ng/ml | ND |
| Progesterona. 400ng/ml | ND |
| Cortisol, 8µg/ml | ND |
| Testosterona, 200ng/ml | ND |
| Androstenediona, 1µg/ml | ND |
| DHEA, 300ng/ml | ND |

**REFERENCIAS**

1. Tietz, N. W., Textbook of Clinical Chemistry, Saunders, 1968

2017-02-24

Distribuido por:
Grupo Mexlab
01800-111-4343
www.grupomexlab.com