

DHEA-S

CE

FRANÇAIS

1. INTRODUCTION

Le sulfate de déshydroépiandrostérone (DHEA-S) est une hormone stéroïde naturelle présente au sommet des reins du corps humain. DHEA-S dérivé de la conversion enzymatique de la DHEA dans les tissus surrénaliens et extradrénaux. La DHEA-S est également produite dans les gonades, le tissu adipeux et le cerveau. C'est l'hormone la plus abondante dans le corps humain et le précurseur de tous les stéroïdes sexuels.

Étant donné que la plus grande quantité de DHEA-S est produite par la zone réticulée de la surrénale, il est expliqué qu'il existe un rôle dans la réponse immunitaire et la réaction au stress. La DHEA-S peut avoir plus de rôles biologiques. Sa production dans le cerveau suggère qu'il joue également un rôle de neurostéroïde.

La mesure de la DHEA-S sérique est un marqueur utile de la synthèse des androgènes surrénaliens. Des taux anormalement bas ont été rapportés dans l'hypoadrénalisme, tandis que des taux élevés se produisent dans plusieurs conditions, par exemple: adénome et carcinome surrénaliens virilisants, déficiences en 21-hydroxylase et en 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase et, dans certains cas, d'hirsutisme chez la femme. Les femmes atteintes du syndrome des ovaires polykystiques ont tendance à avoir des taux de DHEA-S normaux ou légèrement élevés. Étant donné que très peu de DHEA-S est produite par les gonades, la mesure des niveaux de DHEA-S peut aider à localiser la source d'androgènes dans des conditions virilisantes.

La DHEA-S ne montre aucune variation diurne.

2. INDICATION D'UTILISATION

Méthode immunoenzymatique colorimétrique par compétition pour la détermination quantitative de DHEA-S dans le sérum ou le plasma humain.

3. PRINCIPE DU TEST

Les puits des bandes de microtitration sont préalablement recouverts d'anticorps anti-DHEA-S (phase solide). La DHEA-S présente dans l'échantillon entre en compétition avec la DHEA-S (antigène marqué par une enzyme) marquée à la peroxydase de raifort pour la liaison de l'anticorps. Après incubation, une séparation libre-lié est réalisée par lavage de la phase solide. Le complexe immun formé par l'antigène marqué par une enzyme est visualisé en ajoutant un substrat de tétraméthylbenzidine (TMB) qui donne un produit de réaction bleu. L'intensité de ce produit est inversement proportionnelle à la quantité de DHEA-S dans l'échantillon. De l'acide sulfurique est ajouté pour arrêter la réaction. Cela produit une couleur jaune du point final. L'absorption à 450 nm est lue à l'aide d'un lecteur de plaques à micropuits ELISA.

4. MATERIEL

4.1. Réactifs fournis

- **Puits recouverts d'Anti DHEA-S:** 12 bandes sécables à 8 puits sécables revêtues d'anticorps anti-DHEA-S; en feuille d'aluminium refermable.
- **Solution d'arrêt:** 1 flacon contenant 15 ml d'acide sulfurique, 0.15 mol/l (éviter tout contact avec la peau).
- **Conjugué DHEA-S-HRP :** 1 flacon contenant 12 ml de DHEA-S marqué à la peroxydase de raifort.
- **Solution de TMB :** 1 flacon contenant 15 ml de 3, 3', 5, 5'-Tétraméthylbenzidine (H₂O₂-TMB 0.26g/l) (éviter tout contact avec la peau).
- **Diluant:** 1 flacon contenant 100 ml de HEPES 187 mM pH 7,5; BSA 0,5 g / l.
- **Contrôle A:** 1 flacon contenant 1 ml d'un lot spécifique solution de contrôle. La concentration est indiquée sur l'étiquette.
- **Contrôle B:** 1 flacon contenant 1 ml d'un lot spécifique solution de contrôle. La concentration est indiquée sur l'étiquette.
- **Tampon de lavage (concentré x 10):** 1 flacon contenant 50 ml d'une solution concentrée à 10 fois 0,2 M, pH 7,4.
- **Étalons de DHEA-S :** 6 flacons, 1 ml chaque :
 - Étalon 0: 0 μ g/ml
 - Étalon 1: 0,1 μ g/ml
 - Étalon 2: 0,4 μ g/ml
 - Étalon 3: 1,0 μ g/ml
 - Étalon 4: 4,0 μ g/ml
 - Étalon 5: 10,0 μ g/ml

4.2. Matériel fourni

- 1 support de plaque
- 1 jeu de feuilles de recouvrement
- 1 mode d'emploi
- 1 schéma de distribution et d'identification

4.3. Matériel et équipement requis

- Lecteur de microplaques ELISA, pour mesure l'absorbance à 450 nm, 620-630 nm
- Equipement manuel ou automatique pour le rinçage des puits
- Pipettes permettant de délivrer un volume de 10 à 1000 µl
- Vortex
- Eau distillée
- Tubes jetables
- Chronomètre

5. STABILITE ET CONSERVATION

Les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette s'ils sont conservés entre +2...+8 °C à l'obscurité.

6. PREPARATION DES REACTIFS

Il est très important que tous les réactifs, échantillons et contrôles soient portés à température ambiante (+22°C...+28 °C) pour au moins 30 minutes. À la fin de l'essai conservent les réactifs immédiatement à +2...+8 °C; évitez la longue exposition à température ambiante.

6.1. Bandes détachables enduites

Les bandes détachables sont enduites d'anticorps d'IgG anti-DHEA-S et sont prêtes à l'emploi. Conserver entre +2...+8 °C. N'ouvrir l'emballage que si la pièce est à température ambiante. *Après avoir prélevé les bandes nécessaires, refermer immédiatement les autres dans le sachet d'aluminium avec le déshydratant fourni et les conserver entre +2...+8 °C; elles sont stables jusqu'à la date de péremption.*

6.2. Conjugué DHEA-S -HRP

Solution de conjugué DHEA-S-HRP prête à l'emploi.

6.3. Diluant

Le diluant est prête à l'emploi.

6.4. Solution de lavage

Diluer le contenu de la solution de lavage concentrée avec de l'eau distillée jusqu'à un volume final de 500 ml avant utilisation. Pour les petits volumes respecter la dilution au 10^{ème}. La solution de lavage diluée est stable pendant 30 jours entre 2 °C et 8 °C. Il est possible d'observer la présence de cristaux dans la solution de lavage concentrée, dans ce cas, mélanger à température ambiante jusqu'à la dissolution complète des cristaux, pour une meilleure efficacité diluer tout le flacon de solution de lavage jusqu'à 500 ml en surveillant le transfert de cristaux avec le lavage de la bouteille, puis mélanger jusqu'à la dissolution complète des cristaux.

6.5. Étalons de DHEA-S

Les standards sont prêts à l'emploi et sont stables jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette. Les étalons ouverts sont stables pendant encore 6 mois s'ils sont conservés à +2...+8 °C.

6.6. Solution TMB

Le flacon contient 15 ml d'un mélange de peroxyde d'hydrogène et de tétraméthylbenzidine. *La solution doit être incolore ou avoir une légère color bleue. Si le substrat devient bleu, il a pu être contaminé et doit être jeté.*

6.7. Solution d'arrêt

Le flacon contient 15 ml d'une solution d'acide sulfurique 0.15 mol/l.

6.8. Contrôles

Le flacon contient 1 ml d'un lot spécifique solution de contrôle. La concentration est indiquée sur l'étiquette. Les commandes sont prêtes à l'emploi.

7. PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

La détermination de DHEA-S peut être effectuée sur du plasma ou du sérum humain du Patient. Conserver les échantillons à -20°C si la détermination n'est pas effectuée le même jour du prélèvement de l'échantillon. *E vitez les cycles répétés de congélation et de décongélation.*

7.1. Dilution de l'échantillon

Immédiatement avant utilisation, diluer chaque échantillon à 1:50 avec le diluant (c'est-à-dire ajouter 20 µl d'échantillon à 980 µl de diluant). Bien mélanger.

7.2. Précaution

- Évitez l'exposition du substrat TMB à la lumière directe du soleil, aux métaux ou aux oxydants. Ne pas congeler la solution.
- Une précision maximale est requise pour la distribution des réactifs.
- Cette méthode permet de déterminer la DHEA-S de 0,1 à 10 µg / ml
- Le traitement du patient avec de la cortisone, des stéroïdes naturels ou synthétiques peut altérer la détermination de la DHEA-S.

8. PROCEDE DE TEST

8.1. Préparation du dosage

Lire attentivement la notice d'emploi **avant de** réaliser le dosage. La fiabilité des résultats dépend du suivi strict du protocole. Avant de commencer le dosage, déterminer, sur le formulaire fourni dans le kit, le plan de distribution et d'identification des échantillons et des étalons. Sélectionner le nombre de bandes ou de puits nécessaires et les placer sur le support. Le pipetage des échantillons ne doit pas dépasser 10 minutes pour éviter toute dérive. Si vous utilisez plus d'une plaque, il est recommandé de répéter la courbe de réponse à la dose. S'il vous plaît allouer au moins:

1 puits	(ex. A1)	Pour le blanc
2 puits	(ex. B1+C1)	Pour l'étalon 0
2 puits	(ex. D1+E1)	Pour l'étalon 1
2 puits	(ex. F1+G1)	Pour l'étalon 2
2 puits	(ex. H1+A2)	Pour l'étalon 3
2 puits	(ex. B2+C2)	Pour l'étalon 4
2 puits	(ex. D2+E2)	Pour l'étalon 5
2 puits	(ex.F2+G2)	Pour le contrôle A
2 puits	(ex.H2+A3)	Pour le contrôle B

Il est recommandé de déterminer les étalons, contrôles et les échantillons du patient en doublets.

Réaliser toutes les étapes du dosage dans l'ordre donné et sans interruption entre les étapes.

Un cône de pipette propre et jetable doit être utilisé pour distribuer chaque contrôle et échantillon.

1. Pipeter 30 µl des étalons, de contrôle et d'échantillons dilué dans leurs puits respectifs.
2. Ajouter 100 µl de conjugué DHEA-S -HRP dans chaque puits. Garder le puits A1 pour le blanc.
3. Couvrir les puits avec le couvercle fourni dans le kit.
4. **Incuber pendant 1 heure à 37 °C.**
5. À la fin de l'incubation, enlever le couvercle, aspirer le contenu des puits et laver chaque puits trois fois avec 300 µl de solution de lavage diluée. Eviter les débordements de puits de réaction.

Note importante: Pendant chaque, agitez doucement la plaque pendant 5 secondes et enlevez la solution d'excès en tapant la plaque inversée sur un essuie-mains en papier absorbant.

Note : L'étape de lavage est très importante ! Un lavage insuffisant peut conduire à une précision faible et des valeurs d'absorbance faussement élevées.

6. Pipeter 100 µl de solution de TMB dans tous les puits.
7. **Incuber pendant exactement 15 min à température ambiante (+22...+28 °C) à l'obscurité.**
8. Pipeter 100 µl de solution d'arrêt dans tous les puits dans le même ordre à la même vitesse que pour la solution de TMB. Secouer doucement la microplaque.
La couleur bleue développée pendant l'incubation vire au jaune.
9. Mesurer l'absorbance des échantillons à 450 nm contre une longueur d'onde de référence de 620-630 nm ou contre le blanc au cours de 5 minutes.

8.2. Mesure

Faire le **zéro** du lecteur ELISA à l'aide du blanc dans le puits A1.

Si - pour des raisons techniques - le lecteur d'ELISA ne peut pas être ajusté à zéro en utilisant le blanc dans le puits A1, soustraire la valeur d'absorbance du puits A1 de toutes les autres valeurs d'absorbance mesurées afin d'obtenir des résultats fiables !

Mesurer l'absorbance de tous les puits à **450 nm** et enregistrer les valeurs d'absorbance pour chaque contrôle et échantillon de patient dans le plan de distribution et d'identification.

Calculer **les valeurs moyennes d'absorbance pour tous les doublets, si nécessaires.**

9. RESULTATS

9.1. Calcul des résultats

Calculer la moyenne des absorbances pour chaque point de la courbe d'étalonnage et de chaque échantillon.

Tracer les valeurs d'absorbance des étalons en rapport à la concentration.

Tracez la courbe d'ajustement optimale à travers les points tracés (notamment la logistique à quatre paramètres). Interpoler les valeurs des échantillons sur la courbe étalon pour obtenir les valeurs correspondantes de la concentration exprimée en µg/ml.

9.2. Valeurs de Référence

Les valeurs de référence du plasma ou du sérum de DHEA-S sont:

	Femme [µg/ml]	Homme [µg/ml]
Nouveau-nés	0,9 – 1,8	0,9 – 1,8
Avant la puberté	0,25 – 1,0	0,25 – 1,0
Adultes	0,9 – 3,6	0,9 – 3,6
Après la ménopause	< 0,25 – 1,0	--
Grossesse	0,25 – 1,8	--

Veillez tenir compte du fait que la détermination d'une fourchette de valeurs attendues pour une population "normale" dans une méthode donnée dépend de nombreux facteurs, tels que la spécificité et la sensibilité de la méthode utilisée et le type de population sous étude. Par conséquent, chaque laboratoire devrait considérer la plage donnée par le fabricant comme une indication générale et produire sa propre plage de valeurs attendues sur la base de la population autochtone dans laquelle le laboratoire travaille.

10. CONTROLE QUALITE

Chaque laboratoire doit faire des contrôles de dosage à des niveaux de gammes normales, élevées et faibles de DHEA-S pour surveiller la performance des dosages. Ces contrôles doivent être considérés comme inconnus et les valeurs doivent être déterminées dans chaque test effectué. Les chartes de contrôles qualité doivent être maintenues pour suivre les performances des réactifs fournis. Des méthodes de statistiques pertinentes doivent être employées pour établir des tendances. Le laboratoire individuel doit établir des limites de performance de dosage acceptables. D'autres paramètres devant être surveillés impliquent les intersections à 80, 50 et 20% de la courbe étalon pour la reproductibilité. De plus, l'absorbance maximale doit être dans la même ligne que les expériences passées. Les déviations significatives provenant des performances établies peuvent indiquer un changement non remarquable dans les conditions expérimentales ou dans la dégradation des réactifs du kit. Les réactifs frais doivent être utilisés pour déterminer la raison des variations.

11. PERFORMANCES DU TEST

11.1. Précision

Variation Intra Dosage

La variation intra dosage a été déterminée par un répliquant (16x) sur trois sérums différents dans un dosage. La variation intra dosage est $\leq 7,9$ %.

Variation Inter Dosage

La variation inter dosage a été déterminée en répliquant la mesure (20x) de trois sérums de contrôle différents en lots différents. La variation inter dosage est $\leq 10,4$ %.

11.2. Spécificité analytique

La réaction croisée des anticorps calculée à 50% selon Abraham :

Réactif croisés	Réaction croisée
DHEA-S	100 %
DHEA	100 %
Androstenedione	59 %
Androsterone	16 %
DHT	1,0 %
Testosterone	0,63 %
Estrone	0,3 %
Progesterone	0,27 %
Pregnenolone	0,18 %
17-OH Progesterone	0,15 %
11-deoxycortisol	0,08 %
Cortisone	0,013 %
Cortisol	< 0,01 %
17 beta- Estradiol	< 0,01 %
Corticosterone	< 0,01 %
17a-Estradiol	< 0,01 %
Cholesterol	< 0,001 %
Estriol	< 0,001 %
Estradiol Sulphate	< 0,001 %
Aldosterone	< 0,001 %
Estradiol-3-Sulphate-17-Glucuronide	< 0,001 %

11.3. Spécificité: Substances interférentes

Les interférences par la bilirubine, l'hémoglobine et les triglycérides ont été étudiées dans le kit DHEA-S ELISA:

Substance	Concentration testée	Interférence
Bilirubine	0,2 mg/ml	Non
Hémoglobine	2 mg/ml	Non
Triglycérides	6 mg/ml	Non

Aucune interférence n'a été observée avec les substances à l'étude ; suite à de bonnes pratiques de laboratoire, il est de toute façon conseillé d'éviter d'utiliser des échantillons hautement lipidiques ou hémolysés.

11.4. Spécificité: Plasma et tube SST

Interférence dans les échantillons de plasma et SST (tube de séparation du sérum) a été évaluée. Le sérum obtenu à partir du même patient a été utilisé comme référence.

Échantillon	Interférence
SST (tube de séparation du sérum)	Non
EDTA plasma	Non
Plasma d'héparine de lithium	Non
Plasma de sodium-héparine	Non

Aucune interférence n'a été observée.

11.5. Sensibilité

La plus petite concentration détectable de DHEA-S que l'on peut distinguer de l'étalon 0 est de 0,04 µg/ml à la limite de confiance de 95%.

11.6. Exactitude

La récupération de 0,6 - 1,25 - 2,5 et 5 µg/ml de DHEA-S ajouté à l'échantillon a donné une valeur moyenne (±SD) de 102,87% ± 8,63 % par rapport aux concentrations initiales.

La dilution de le dosage effectué sur trois sérums dilués 2 à 4 et 8 fois a donné une valeur moyenne (±SD) de 100,15 % ± 9,02 %.

11.7. Corrélation avec l'AIR

Le test NovaTec DHEA-S ELISA a été comparé à un autre test DHEA-S disponible sur le marché. 42 échantillons de sérum ont été analysés.

La courbe de régression linéaire a été calculée :

$$y = 0,93x + 0,28$$

$$r^2 = 0.961$$

12. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

- En accord avec l'article 1 paragraphe 2b de la directive européenne 98/79/EC, l'utilisation des dispositifs médicaux de diagnostic in vitro est destinée par le fabricant à garantir la pertinence, les performances et la sécurité du produit. Par conséquent, la procédure de dosage, l'information, les précautions et mises en garde du mode d'emploi doivent être suivies de façon stricte. L'utilisation de ces kits avec des automates ou dispositifs similaires doit être validée. Aucun changement de la conception, composition et procédure de dosage, ainsi que l'utilisation avec d'autres produits non approuvés par le fabricant, ne sont autorisés ; seul l'utilisateur est responsable de tels changements. Le fabricant n'est pas responsable des faux résultats et des incidents dus à ces modifications. Le fabricant n'est pas responsable des résultats fournis par analyse visuelle des échantillons des patients.
- Uniquement pour diagnostic in vitro. Ne pas utiliser pour usage interne ou externe chez les Humains ou les Animaux.
- Suivre les Bonnes Pratiques de Laboratoires (BPL) pour la manipulation de produits sanguins.
- Tous les composants d'origine humaine utilisés pour la fabrication de ces réactifs ont été analysés et ont été testés non réactifs aux antigènes HBs, en anticorps anti-VIH et en anticorps anti-VHC. Néanmoins, tous les produits doivent être considérés et traités comme étant potentiellement infectieux.
- Ne pas échanger les réactifs ou les bandes provenant de différents lots de production.
- Ne pas utiliser de réactifs provenant d'autres fabricants avec les réactifs de ce kit.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
- Utiliser seulement des cônes de pipette, des distributeurs et du matériel de laboratoire propres.
- Ne pas échanger les bouchons des flacons, pour éviter la contamination croisée
- Fermer les flacons de réactifs immédiatement après l'utilisation pour éviter l'évaporation et la contamination microbienne.
- Après la première ouverture et après la conservation, vérifiez si le conjugué et les flacons sont contaminés par une contamination microbienne avant de les utiliser
- Pour éviter la contamination croisée et des résultats faussement élevés, introduire les échantillons de patients et le conjugué exactement au fond des puits en évitant les éclaboussures.
- Tenez compte des directives pour effectuer un contrôle de qualité dans les laboratoires cliniques en testant des contrôles et / ou des sérums.

- Il est important que le temps de réaction dans chaque puits soit maintenu constant pour des résultats reproductibles. Le pipetage des échantillons ne doit pas dépasser 10 minutes pour éviter toute dérive. Si plus de 10 minutes sont nécessaires, suivez le même ordre de dispense. Si vous utilisez plus d'une plaque, il est recommandé de répéter la courbe de réponse à la dose dans chaque plaque.
- L'élimination incomplète ou imprécise du liquide des puits pourrait influencer la précision du test et / ou augmenter l'arrière-plan. Pour améliorer les performances du kit sur les systèmes automatiques, il est recommandé d'augmenter le nombre de lavages.
- Les échantillons contaminés microbiologiquement ne doivent pas être utilisés dans le test. Les échantillons très lipémiques ou hémolysés ne doivent pas non plus être utilisés.
- Les lecteurs de plaques mesurent verticalement. Ne touchez pas le fond des puits.
- Certains réactifs contiennent de petites quantités de Proclin 300® comme agent de conservation. Éviter le contact avec la peau ou les muqueuses.
- Le substrat TMB contient un irritant qui peut être nocif s'il est inhalé, ingéré ou absorbé par la peau. Pour prévenir les blessures, éviter l'inhalation, l'ingestion ou le contact avec la peau et les yeux.
- La solution d'arrêt consiste en une solution diluée d'acide sulfurique. L'acide sulfurique est toxique et corrosif et peut être toxique s'il est ingéré. Pour prévenir les brûlures chimiques, éviter le contact avec la peau et les yeux.
- L'addition de la solution de substrat TMB déclenche une réaction cinétique, qui se termine par l'addition de la solution d'arrêt. Par conséquent, le substrat TMB et la solution d'arrêt doivent être ajoutés dans le même ordre pour éliminer tout écart de temps pendant la réaction.

12.1. Élimination des déchets

Les résidus des produits chimiques et des préparations sont considérés en général comme des déchets dangereux. L'élimination de ce type de déchet est réglementée par des lois et réglementations nationales et régionales. Contacter les autorités compétentes ou les sociétés de gestion des déchets pour obtenir des renseignements sur l'élimination des déchets dangereux.

13. INFORMATION POUR LES COMMANDES

Référence: DNOV005 DHEA-S (96 déterminations)