



ElisaRSR™ 21-OH Ab

Coffret ELISA pour le dosage des auto-anticorps 21-hydroxylase (21-OH) – Notice d'utilisation

EXCLUSIVEMENT RÉSERVÉ À LA RECHERCHE

RSR Limited

Avenue Park Pentwyn Cardiff CF23 8HE Royaume-Uni

Tél. : +44 29 2073 2076

Télécopie : +44 29 2073 2704

Courrier électronique : info@rsrltd.com

Site Internet : www.rsrltd.com



Distribué par **Cisbio Bioassays**

Parc Marcel Boiteux - BP 84175 - Codolet France

Tél. : 33 (0)4.66.79.67.00

INDICATION

Le coffret ELISA pour le dosage des auto-anticorps anti-21-hydroxylase (Ac 21-OH) de RSR est exclusivement destiné aux professionnels effectuant la détermination quantitative des Ac 21-OH dans le sérum humain. La destruction auto-immune de la corticosurrénale est la cause la plus fréquente de la maladie d'Addison, et les auto-anticorps dirigés contre l'hormone stéroïdienne spécifique de la corticosurrénale, la 21-hydroxylase, sont des marqueurs importants de l'auto-immunité surrénalienne. Cette situation peut se rencontrer lorsque la pathologie correspond à une maladie d'Addison ou entre dans le cadre de syndromes polyglandulaires auto-immuns (APS) de type I ou II.

RÉFÉRENCES

J. Furmaniak and B. Rees Smith

Editorial: Adrenal and Gonadal Autoimmune Diseases

J. Clin. Endocrinol. Metab. 1995 **80** : 1502 – 1505

S. Chen et al

Autoantibodies to Steroidogenic Enzymes in Autoimmune Polyglandular Syndrome, Addison's Disease, and Premature Ovarian Failure

J. Clin. Endocrinol. Metab. 1996 **81** : 1871-1876

H. Tanaka et al

Steroid 21-Hydroxylase Autoantibodies: Measurements with a New Immunoprecipitation Assay

J. Clin. Endocrinol. Metab. 1997 **82** : 1440-1446

G. Coco et al

Estimated Risk for Developing Autoimmune Addison's Disease in Patients with Adrenal Cortex Autoantibodies

J. Clin. Endocrinol. Metab. 2006 **91** : 1637-1645

PRINCIPE DU DOSAGE

Dans le coffret ELISA 21-OH Ab de RSR, les auto-anticorps anti-21-OH présents dans les sérums des patients à examiner, les calibrateurs, et les contrôles interagissent avec la 21-OH revêtant l'intérieur des puits d'une plaque ELISA. Après une incubation de 16 à 20 heures, les échantillons sont éliminés laissant les auto-anticorps anti-21-OH liés aux puits revêtus de 21-OH. De la 21-OH biotine est ajoutée pendant une deuxième étape d'incubation au cours de laquelle, grâce à la capacité des auto-anticorps anti-21-OH d'agir de manière divalente, un pont est formé entre la 21-OH immobilisée sur la plaque et la 21-OH biotine. La quantité de 21-OH biotine liée est alors déterminée au cours d'une troisième étape d'incubation comportant l'addition de streptavidine peroxydase (SA-POD), qui se

lie de manière spécifique à la biotine. L'excès non lié de SA-POD est ensuite éliminé par lavage et l'addition de substrat de peroxydase, la 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB), entraîne la formation d'une couleur bleue. La réaction est stoppée par l'addition d'une solution d'arrêt qui provoque le changement de la couleur de contenu du puits en jaune. L'absorbance du mélange réactif jaune à 450 nm et 405 nm est ensuite lue en utilisant un lecteur de plaques ELISA. Une absorbance plus élevée indique la présence d'auto-anticorps anti-21-OH dans l'échantillon à examiner. La lecture à 405 nm permet la quantification d'absorbances élevées. Il est recommandé de mesurer les valeurs inférieures à 1 U/ml à la longueur d'onde de 450 nm. S'il n'est possible que de lire qu'à une seule longueur d'onde, la valeur de 405 nm doit être utilisée. L'intervalle de mesure est compris entre 0,3 et 100 U/ml (unités arbitraires de RSR).

CONSERVATION ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS DE SÉRUM

Les sérums à analyser doivent être dosés immédiatement après leur séparation ou conservés, de préférence en parties aliquotes, à une température inférieure ou égale à -20 °C. 100 µl sont suffisants pour un dosage (double détermination de 50 µl). Des cycles congélation-décongélation répétés ou une augmentation de la température de conservation doivent être évités. Ne pas utiliser d'échantillons de sérum lipidémiques ou hémolysés. Ne pas utiliser de plasma pour le dosage. Le cas échéant, décongeler les sérums à examiner à température ambiante et mélanger doucement pour assurer leur homogénéité. Centrifuger le sérum avant le dosage (de préférence 5 minutes à 10 000-15 000 g dans une microcentrifugeuse) afin d'éliminer les particules. Veuillez ne pas omettre cette étape de centrifugation si les sérums sont troubles ou contiennent des particules.

SYMBOLES UTILISÉS DANS LE MODE D'EMPLOI

Symbole	Signification
	Exclusivement réservé à la recherche (Research Use Only)
	Numéro de référence
	Numéro de lot
	Veuillez vous reporter aux instructions
	Fabriqué par
	Suffisant pour
	Date de péremption
	Conservation

MATÉRIELS NÉCESSAIRES MAIS NON FOURNIS

Pipettes capables de délivrer 50 µl et 100 µl.

Instruments de mesure de différents volumes permettant de reconstituer ou de diluer les réactifs fournis.

Eau purifiée.

Lecteur de plaques ELISA pour des formats de 96 puits, capable de mesurer à des longueurs d'onde de 450 nm et 405 nm.

Agitateur de plaques ELISA, capable d'effectuer 500 oscillations/mn (ne pas utiliser d'agitateur orbital).

Couvercle pour plaques ELISA.

Laveur de plaques ELISA.

PRÉPARATION DES RÉACTIFS FOURNIS

Conserver le coffret non ouvert et tous les composants du coffret entre 2 et 8 °C.

A	Puits revêtus de 21-OH 12 barrettes détachables de 8 puits (96 puits au total) dans un cadre et scellées dans un sachet. Laisser le sachet reposer à température ambiante (20 à 25 °C) pendant 30 minutes avant ouverture.
	S'assurer que les barrettes sont convenablement placées dans le cadre fourni. Après ouverture, replacer tous les puits non utilisés dans le sachet original avec le dessiccant fourni et le sceller avec une bande adhésive. Placer le sachet dans le sac en plastique autorefermable fourni et le conserver entre 2 et 8 °C pendant une durée maximale de 14 jours.
B1-4	Calibrateurs 0,3 ; 1,0 ; 10 ; 100 U/ml (unités arbitraires de RSR) 4 × 0,7 ml Prêts à l'emploi
C1-2	Contrôles positifs I & II (voir l'étiquette pour l'intervalle des concentrations) 2 × 0,7 ml Prêts à l'emploi
D	Contrôle négatif 0,7 ml Prêt à l'emploi
E	Amplificateur de réaction 6 ml, coloration rouge Prêt à l'emploi
F	21-OH-biotine 3 flacons Lyophilisée
	Immédiatement avant utilisation, reconstituer avec le tampon de reconstitution pour 21-OH-biotine (G), 5,5 ml par flacon. Lorsque plusieurs flacons sont utilisés, regrouper les flacons et mélanger doucement.

G	Tampon de reconstitution pour 21-OH-biotine 2 × 15 ml Prêt à l'emploi
H	Streptavidine peroxydase (SA-POD) 0,7 ml Concentrée
	Diluer au 20 ^e avec le diluant pour SA-POD (I). Par exemple, 0,5 ml (H) + 9,5 ml (I). Conserver pendant une durée maximale de 16 semaines entre 2 et 8 °C après dilution.
I	Diluant pour SA-POD 15 ml Prêt à l'emploi
J	Substrat peroxydase (TMB) 15 ml Prêt à l'emploi
K	Solution d'arrêt 12 ml Prête à l'emploi
L	Solution de lavage concentrée 125 ml Concentrée
	Diluer au 10 ^e avec de l'eau purifiée avant utilisation. Conserver entre 2 et 8 °C jusqu'à la date de péremption du coffret.

PROCÉDURE DU DOSAGE

Laisser tous les réactifs reposer à température ambiante (20 à 25 °C) pendant 30 minutes avant utilisation. Ne pas reconstituer la 21-OH-biotine avant l'étape 5 ci-dessous. Une pipette de type Eppendorf à répétition est recommandée pour les étapes 2, 5, 8, 11 et 12.

Jour 1	1.	Pipetter 50 µl (en double) de sérums de patients, de calibrateurs (B1-4) et de contrôles (C1-2 et D) dans les puits respectifs. Laisser un puits vide pour le blanc (voir étape 13).
	2.	Pipetter 50 µl d'amplificateur de réaction (E) dans chaque puits (à l'exception du blanc).
	3.	Couvrir le cadre et agiter les puits sur un agitateur de plaques ELISA (500 oscillations par minute) pendant une minute. Mettre en incubation pendant une nuit (16 à 20 heures) entre 2 et 8 °C, sans agitation.
Jour 2	4.	Aspirer et laver/aspirer les puits à trois reprises avec la solution de lavage diluée (L) en utilisant une machine à laver les plaques.
	5.	Reconstituer la 21-OH-biotine (F) et pipetter 100 µl dans chaque puits (à l'exception du blanc).

Jour 2 (suite)	6.	Couvrir le cadre et agiter les puits pendant une heure à température ambiante sur un agitateur de plaques ELISA (500 oscillations par minute).
	7.	Répéter l'étape de lavage 4.
	8.	Pipetter 100 µl de SA-POD diluée (H) dans chaque puits (à l'exception du blanc).
	9.	Couvrir le cadre et agiter les puits pendant 20 minutes à température ambiante sur un agitateur de plaques ELISA (500 oscillations par minute).
	10.	Répéter l'étape de lavage 4.
	11.	Pipetter 100 µl de TMB (J) dans chaque puits (y compris le blanc) et mettre en incubation dans l'obscurité à température ambiante pendant 20 minutes sans agiter.
	12.	Pipetter 50 µl de la solution d'arrêt (K) dans chaque puits (y compris le blanc), recouvrir le cadre et agiter la plaque pendant environ 5 secondes sur un agitateur de plaques ELISA. S'assurer que les incubations des substrats sont les mêmes pour chaque puits.
	13.	Lire l'absorbance de chaque puits à 450 nm et 405 nm (dans un délai de 5 minutes après avoir achevé l'étape 12) en utilisant un lecteur de plaques ELISA, en la comparant avec celle du blanc contenant 100 µl de TMB (J) et 50 µl de solution d'arrêt (K) uniquement .

ANALYSE DES RÉSULTATS

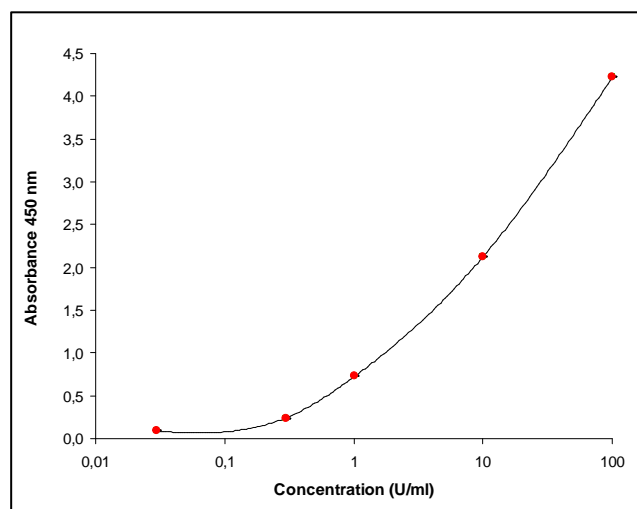
Une courbe d'étalonnage peut être établie avec la concentration des calibrateurs sur l'axe des abscisses (x) (échelle logarithmique) et l'absorbance des calibrateurs sur l'axe des ordonnées (y) (échelle linéaire). Les concentrations des auto-anticorps anti-21-OH dans les sérums des patients peuvent ensuite être lues sur la courbe d'étalonnage (tracée par RSR sous forme de courbe spline log/linéaire [facteur de lissage= 0]). D'autres systèmes de réduction des données peuvent être utilisés. Une valeur de 0,03 U/ml peut être assignée au contrôle négatif pour contribuer à un traitement informatique des résultats du dosage.

Les échantillons contenant des concentrations d'auto-anticorps anti-21-OH supérieures à 100 U/ml peuvent être dilués (par exemple au 10^e et/ou au 100^e) dans un sérum négatif aux auto-anticorps anti-21-OH. Certains sérums ne se dilueront pas de manière linéaire.

RÉSULTATS TYPIQUES (fournis uniquement à titre d'exemple, et non pour le calcul de résultats réels)

	Abs. 450 nm	Conc. U/ml	Abs. 405 nm	Conc. U/ml
Contrôle négatif (D)	0,090		0,028	
B1	0 231	0,3	0 073	0,3
B2	0 728	1	0,232	1
B3	2,121	10	0,679	10
B4	4,223	100	1,242	100
Contrôle positif (CI)	0,464	0,57	0,151	0,59
Contrôle positif (CII)	1,684	5,37	0,541	5,32

Les lectures d'absorbance à 405 nm peuvent être converties en valeurs d'absorbance à 450 nm en multipliant par le facteur approprié (3,4 dans le cas d'équipements utilisés chez RSR).



SEUIL DE DOSAGE

Négatif	< 0,4 U/ml
Positif	≥ 0,4 U/ml

ÉVALUATION CLINIQUE

Spécificité clinique

Les sérums de 211 donneurs de sang individuels sains ont été testés avec le coffret RSR 21-OH Ab ELISA. Deux cent dix (210) sérums (99,5 %) ont été identifiés comme négatifs aux auto-anticorps anti-21-OH. Le sérum d'un donneur de sang sain positif aux auto-anticorps 21-OH a également été positif avec le radio-immunos dosage RSR 21-OH Ab lorsque l'association IgM anti-humaines-agarose a été utilisée au lieu de la protéine A.

Sensibilité clinique

Les sérums de 63 patients atteints de maladie d'Addison auto-immune ont été testés avec le coffret 21-OH Ab ELISA. Cinquante et un (51) sujets (81 %) ont été identifiés comme positifs aux auto-anticorps anti-21-OH.

Précision clinique

L'analyse de 162 sérums des patients atteints de maladies auto-immunes autres que la maladie d'Addison n'a mis en évidence aucune interférence avec les auto-anticorps dirigés contre la thyroglobuline, la thyroïde peroxydase, le récepteur de la TSH, l'acide glutamique décarboxylase, le transporteur du zinc 8, l'aquaporine 4, le récepteur de l'acétylcholine ou le facteur rhumatoïde. Un échantillon de sérum provenant d'un autre patient atteint de diabète sucré de type 1 (positif aux anticorps anti-GAD) a donné une valeur de 44 U/ml. Cet échantillon a été testé avec le radio-immunos dosage RSR 21-OH Ab et a été positif à une concentration d'anticorps anti-21-OH de 100 U/ml.

Les données indiquées dans ces instructions ne doivent être utilisées que comme indications. Il est recommandé que chaque laboratoire inclue son propre ensemble d'échantillons de contrôle dans le dosage. Chaque laboratoire doit établir ses propres

intervalles de référence normaux et pathologiques pour les concentrations d'auto-anticorps anti-21-OH.

CONSIDÉRATIONS DE SÉCURITÉ

Ce coffret est réservé à des utilisateurs professionnels. Suivre les instructions avec soin. Respecter les dates de péremption indiquées sur les étiquettes et la stabilité spécifiée pour les puits revêtus, ainsi que les réactifs dilués et reconstitués. Veuillez vous référer aux fiches de données de sécurité pour des informations plus détaillées sur la sécurité d'emploi. Éviter toute action susceptible d'entraîner une ingestion. Éviter le contact avec la peau et les vêtements. Porter des vêtements de protection. Des tests effectués sur les matériels d'origine humaine utilisés au cours de la préparation de ce coffret ont montré qu'ils n'étaient pas réactifs aux anticorps anti-VIH 1 et 2 et anti-VHC et à l'antigène AgHBs, mais ceux-ci doivent néanmoins être manipulés

comme étant potentiellement infectieux. Se laver les mains soigneusement si une contamination est survenue et avant de quitter le laboratoire. Stériliser tous les déchets potentiellement contaminés, notamment les échantillons à examiner avant de les éliminer. Les matériels d'origine animale utilisés dans la préparation de ce coffret ont été obtenus à partir d'animaux certifiés sains, mais ils doivent être manipulés comme étant potentiellement infectieux. Certains composants contiennent de petites quantités d'azote de sodium utilisé comme conservateur. Comme pour les composants de tous les coffrets, éviter leur ingestion, leur inhalation, leur injection ou leur contact avec la peau, les yeux et les vêtements. Éviter la formation d'azotures de métaux lourds dans le système d'évacuation en rinçant tous les composants du coffret avec des quantités d'eau abondantes.

RÉSUMÉ DU DOSAGE

Jour 1	Laisser tous les réactifs et les échantillons reposer à température ambiante (20 à 25 °C) avant utilisation.	
	Pipetter :	50 µl de calibrateurs, de contrôles et de sérums de patients
	Pipetter :	50 µl d'amplificateur de réaction (à l'exception du blanc)
	Mélanger :	Agiter sur un agitateur de plaques ELISA à 500 oscillations/mn pendant 1 minute
	Mettre en incubation :	Une nuit (16 à 20 heures) entre 2 et 8 °C sans agitation
Jour 2	Aspirer /laver :	La plaque à trois reprises
	Pipetter :	100 µl de 21-OH-biotine (reconstituée) dans chaque puits (à l'exception du blanc)
	Mettre en incubation :	Une heure à température ambiante sur un agitateur de plaques ELISA à 500 oscillations par minute
	Aspirer /laver :	La plaque à trois reprises
	Pipetter :	100 µl de SA-POD (diluée au 20 ^e) dans chaque puits (à l'exception du blanc)
	Mettre en incubation :	20 minutes à température ambiante sur un agitateur de plaques ELISA à 500 oscillations par minute
	Aspirer /laver :	La plaque à trois reprises
	Pipetter :	100 µl de TMB dans chaque puits (y compris le blanc)
	Mettre en incubation :	20 minutes à température ambiante dans l'obscurité sans agitation
	Pipetter :	50 µl de solution d'arrêt dans chaque puits (y compris le blanc) et agiter pendant 5 secondes
	Lire l'absorbance à 450 nm et 405 nm rapidement (dans un délai de 5 minutes)	