



ElisaRSR™ AChRab

Coffret ELISA pour le dosage des auto-anticorps anti-récepteur de l'acétylcholine – Notice d'utilisation



RSR Limited

Parc Ty Glas, Llanishen, Cardiff CF14 5DU Royaume-Uni
Tél. : +44 29 2068 9299 Fax : +44 29 2075 7770
Courrier électronique : info@rsrltd.com Site Internet : www.rsrltd.com

INDICATION

Le kit ELISA pour le dosage des auto-anticorps anti-récepteur de l'acétylcholine (AChRab) de RSR est exclusivement destiné aux professionnels effectuant la détermination quantitative de l'AChRab dans le sérum humain.

Les auto-anticorps dirigés contre le récepteur de l'acétylcholine (AChR) sont responsables de la déficience de la jonction neuromusculaire dans la myasthénie. La mesure de ces anticorps peut être d'un grand intérêt pour le diagnostic et la prise en charge de la maladie.

RÉFÉRENCES

R. Hewer et al
A sensitive non-isotopic assay for acetylcholine receptor autoantibodies
Clinica Chimica Acta 2006 **364** : 159 – 166

PRINCIPE DU DOSAGE

Le kit ELISA AChRab de RSR repose sur la capacité de l'AChRab présent dans le sérum humain de se lier à des sites de l'AChR similaires à ceux de différents anticorps monoclonaux, notamment MAb1 (dont sont revêtus les puits de la plaque ELISA) et/ou MAb2 et/ou MAb3 (qui sont marqués à la biotine). En l'absence d'AChRab, un complexe se forme entre MAb1, dont sont revêtus les puits de la plaque, l'AChR et les anticorps MAb2-biotine et MAb3-biotine. MAb2-biotine et MAb3-biotine liés sont détectés par 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 est ensuite lue en utilisant un lecteur de plaques ELISA. En présence d'AChRab, la formation du complexe MAb1-AChR-MAb2-/MAb3-biotine est inhibée, entraînant la diminution de la quantité de SA-POD liée, et par conséquent une réduction de l'absorbance finale à 450 nm. Plus la concentration d'AChRab est élevée dans le sérum à examiner, plus l'inhibition de la liaison aux MAb-biotine sera importante. En utilisant les calibrateurs du coffret, l'intervalle de mesure est compris entre 0,45 et 20 nmol/L de toxine liée.

CONSERVATION ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS DE SÉRUM À TESTER

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 (doubles déterminations 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. Les études dans lesquelles les échantillons de plasmas EDTA, citraté et hépariné ont été enrichis de sérums AChRab-positifs ont montré des changements mineurs dans le signal par rapport au sérum enrichi du même donneur. En particulier, les valeurs DO₄₅₀ avec des plasmas EDTA, citraté et hépariné enrichis étaient composées de 83 % à 122 % de sérum enrichi (20 échantillons avec des

concentrations de sérums comprises entre 0,28 nmol/L et 18 nmol/L) ou de 69 % à 165 % en termes de nmol/L.

En cas de besoin, amener les sérums à tester 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 tr/min dans une micro centrifugeuse) afin d'éliminer les particules. Veuillez ne pas omettre cette étape de centrifugation si les sérums sont troubles ou contiennent des particules.

SYMBOLES

Symbole	Signification
	Déclaration de conformité CE
	Dispositif de diagnostic in vitro
	Numéro de référence
	Numéro de lot
	Veuillez-vous reporter aux instructions
	Fabriqué par
	Suffisant pour
	Date de péremption
	Conservation
	Contrôle négatif
	Contrôle positif

MATÉRIELS NÉCESSAIRES MAIS NON FOURNIS

Pipettes capables de délivrer 25 µl, 50 µl et 100 µl.
Pipette de type Eppendorf à répétition.
Instruments de mesure de différents volumes permettant de reconstituer ou de diluer les réactifs fournis.
Tubes Eppendorf.
Eau purifiée.
Lecteur de plaques ELISA pour des formats de 96 puits, capable de mesurer à 450 nm.
Agitateur pour plaques ELISA, capable d'effectuer 500 oscillations/mn (ne pas utiliser d'agitateur orbital).
Couvercle pour plaques ELISA.

PRÉPARATION DES RÉACTIFS FOURNIS

Conserver le kit non ouvert et les composants (A-P) à une température comprise entre 2 et 8 °C.

A	Puits revêtus d'AChR MAb1 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 puits sont convenablement placés dans le cadre fourni. Après ouverture, replacer tous les puits non utilisés dans le sachet original et le sceller avec une bande adhésive. Placer ensuite le sachet dans un sac en plastique autorefermable avec le dessiccant fourni et le conserver entre 2 et 8 °C jusqu'à la date de péremption du coffret.
B	AChR de type fœtal 3 flacons Lyophilisé

	Reconstituer chaque flacon avec 0,7 ml de tampon de reconstitution pour l'AChR (D). Mélanger doucement et laisser reposer à température ambiante (entre 20 et 25 °C) pendant 5 minutes avant utilisation. Regrouper les flacons lorsque plusieurs flacons sont nécessaires et les utiliser immédiatement pour reconstituer l'AChR de type adulte.
C	AChR de type adulte 3 flacons Lyophilisé
B+C	Reconstituer chaque flacon de C avec 0,5 ml d'AChR de type foetal reconstitué (B) pour obtenir un mélange d'AChR foetal et adulte (B+C). Mélanger doucement et laisser reposer à température ambiante (entre 20 et 25 °C) pendant 5 minutes avant utilisation. Regrouper les flacons lorsque plusieurs flacons sont nécessaires. Utiliser au maximum 6 heures après reconstitution si la conservation a été effectuée entre 2 et 8 °C ¹ .
D	Tampon de reconstitution pour AChR 5 ml Prêt à l'emploi
E	AChR Mab-biotine (MAB2 + MAB3) 3 flacons Lyophilisé Reconstituer chaque flacon avec le volume de tampon de reconstitution pour Mab-biotine (F) indiqué sur l'étiquette du flacon. Mélanger doucement et laisser reposer à température ambiante (entre 20 et 25 °C) pendant 5 minutes avant utilisation. Regrouper les flacons lorsque plusieurs flacons sont nécessaires. Conserver entre 2 et 8 °C jusqu'à la date de péremption du coffret indiquée après la reconstitution.
F	Tampon de reconstitution pour MAB-biotine 15 ml Prêt à l'emploi
G	Streptavidine peroxydase (SA-POD) 0,7 ml Concentrée Diluer au 1:20 avec le diluant pour SA-POD (H). Par exemple, 0,5 ml (G) + 9,5 ml (H). Conserver entre 2 et 8 °C pendant une durée maximale de 16 semaines après dilution.
H	Diluant pour SA-POD 15 ml Prêt à l'emploi
J	Substrat de peroxydase (TMB) 15 ml Prêt à l'emploi
K	Solution d'arrêt 10 ml Prêt à l'emploi
L	Solution de lavage concentrée 100 ml Concentrée Diluer au 1:10 avec de l'eau purifiée avant utilisation. Par exemple, 100 ml (L) + 900 ml d'eau purifiée. Utiliser jusqu'à la date de péremption du kit après la dilution.
M1-4	Calibrateurs 0.5 ; 1.0 ; 6.5 et 20 nmol/L de toxine liée 4 x 0,7 ml Prêts à l'emploi
N	Contrôle négatif 3 ml Prêt à l'emploi

P1-2	Contrôles positifs I et II (voir l'étiquette pour l'intervalle de concentration) 2 x 0,7 ml Prêts à l'emploi
-------------	--

¹ L'absorbance à 450 nm sera de 10 à 15 % inférieure si les récepteurs reconstitués ont été conservés pendant 6 heures entre 2 et 8 °C.

PROCÉDURE DU DOSAGE

Laisser tous les réactifs reposer à température ambiante (20 à 25 °C) pendant au moins 30 minutes avant utilisation. Une pipette automatique de type Eppendorf est recommandée pour les étapes 2, 5, 7, 9 et 10.

JOUR 1	1	Pipetter 100 µl d'échantillons (calibrateurs [M1-4 - facultatif], contrôles positifs [P1-2] et contrôle négatif [N] et sérums à examiner) dans des tubes Eppendorf individuels de 1,5 ml, étiquetés en conséquence.
	2	Pipetter 25 µl de mélange d'AChR foetal et adulte (B+C) dans chaque tube Eppendorf (de l'étape 1) puis sceller les tubes. S'assurer que tout le liquide est au fond de chaque tube (en cas de doute, centrifuger les tubes dans une microcentrifugeuse pendant 10 secondes à 10 000-15 000 tr/min). Passer au vortex doucement puis mettre en incubation pendant une nuit (16 à 20 heures) entre 2 et 8 °C.
JOUR 2	3	Mélanger doucement chaque tube de mélange échantillon-AChR de l'étape 2 en utilisant un agitateur vortex. Pipetter en double 50 µl de chaque mélange échantillon-AChR dans les puits revêtus d'AChR MAB1 (A), en laissant deux puits vides pour les blancs. Couvrir le cadre et mettre en incubation à température ambiante sur un agitateur de plaques ELISA (500 oscillations par minute) pendant 1 heure.
	4	Aspirer les échantillons en utilisant un laveur de plaques ou éliminer les échantillons en retournant brusquement le cadre contenant les barrettes au-dessus d'un récipient adapté. Laver les puits à trois reprises avec la solution de lavage diluée (L). Pour un lavage manuel, tapoter doucement les puits renversés sur une surface absorbante propre et sèche afin d'éliminer l'excès de solution de lavage.
	5	Pipetter 50 µl d'AChR Mab-biotine reconstitué (E) dans chaque puits (à l'exception des blancs). Couvrir le cadre et mettre en incubation à température ambiante sur un agitateur de plaques ELISA (500 oscillations par minute) pendant 1 heure.
	6	Répéter l'étape de lavage 4.
	7	Pipetter 100 µl de SA-POD diluée (G) dans chaque puits (à l'exception des blancs). Couvrir le cadre et mettre en incubation à température ambiante sur un agitateur de plaques ELISA (500 oscillations par minute) pendant 30 minutes.
Suite	8	Répéter l'étape de lavage 4. Pour un lavage manuel, laver une fois de plus avec de l'eau purifiée pour retirer toute trace de mousse. Tapoter doucement les puits renversés sur une surface absorbante propre et sèche afin d'éliminer l'excès de solution de lavage.
	9	Pipetter 100 µl de TMB (J) dans chaque puits (y compris les blancs). Couvrir le cadre et mettre en incubation dans l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes sans agiter.

10	Pipetter 50 µl de la solution d'arrêt (K) dans chaque puits (y compris les blancs), couvrir le cadre et agiter pendant environ 5 secondes sur un agitateur de plaques. S'assurer que les incubations des substrats sont les mêmes pour chaque puits.
11	Dans les 30 minutes qui suivent, lire l'absorbance de chaque puits à 450 nm en utilisant un lecteur de plaques ELISA, en la comparant avec celle des puits des blancs contenant 100 µl de substrat TMB (J) et 50 µl de solution d'arrêt (K) uniquement.

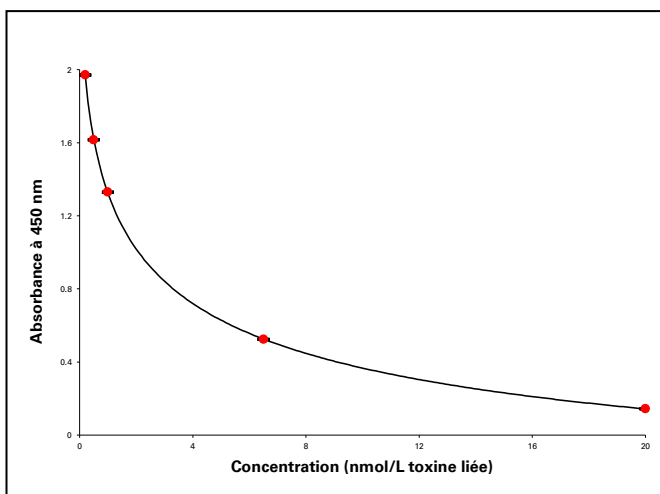
ANALYSE DES RÉSULTATS

Une courbe d'étalonnage peut être établie avec la concentration des calibrateurs (incluant une valeur de 0,2 nmol/L pour le contrôle négatif) sur l'axe des abscisses (x) (échelle linéaire) et l'absorbance des calibrateurs sur l'axe des ordonnées (y) (échelle linéaire). Les concentrations des auto-anticorps anti-AChR dans les sérums des patients peuvent être lues à partir de la courbe d'étalonnage. Les données contenues dans ces instructions sont basées sur une courbe ajustée à quatre paramètres. Les échantillons présentant des concentrations élevées d'auto-anticorps anti-AChR peuvent être dilués dans le contrôle négatif (N). Par exemple, 10 µl d'échantillon plus 90 µl de contrôle négatif (N) constituera une dilution au 10^e. D'autres dilutions (par exemple, au 100^e) peuvent être préparées à partir d'une dilution au 10^e ou par une autre méthode appropriée. Certains sérums ne se dilueront pas de manière linéaire et nous suggérons que la dilution permettant d'obtenir la valeur la plus proche d'une inhibition à 50 % soit utilisée pour le calcul de la concentration des auto-anticorps anti-AChR.

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

Échantillon	Abs. 450 nm	Conc. nmol/L
Contrôle négatif N	1,970	0,2 ²
M1	1,616	0,5
M2	1,329	1,0
M3	0,524	6,5
M4	0,144	20
Contrôle positif P1	0,469	7,5
Contrôle positif P2	1,124	1,6

² Voir analyse des résultats ci-dessus.



Les résultats peuvent également être exprimés par l'inhibition (I en %) de la liaison à l'AChR en utilisant la formule suivante :

$$100 \times \left(1 - \frac{\text{absorbance de l'échantillon à examiner à 450 nm}}{\text{absorbance du contrôle négatif (N) à 450 nm}} \right)$$

Cette valeur d'inhibition exprimée en % peut ensuite être convertie en nmol/L de toxine liée en utilisant la formule suivante :

$$0,2 \times 2^{(0,067 \times \% \text{ d'inhibition de l'échantillon à examiner})}$$

Cette formule a été établie de manière empirique en utilisant une comparaison des mesures d'auto-anticorps anti-AChR par les méthodes ELISA et radio-immunologiques de RSR. On ne doit pas s'attendre à une concordance entre les valeurs en nmol/L obtenues dans l'ELISA AChRAB en utilisant la courbe d'étalonnage et cette formule dans le cas de tous les sérums individuels.

RÉSULTATS TYPIQUES EXPRIMÉS EN % DE L'INHIBITION

Échantillon	Abs. 450 nm	% d'inhibition	Calcul en nmol/L
Contrôle négatif N	1,970	0	0,2
Contrôle positif P1	0,469	76,2	6,9
Contrôle positif P2	1,124	42,9	1,5

SEUIL DU DOSAGE

Négatif	< 0,45 nmol/L
Positif	≥ 0,45 nmol/L

Ce seuil a été validé par RSR. Chaque laboratoire doit toutefois établir ses propres intervalles de référence normaux et pathologiques pour les concentrations d'auto-anticorps anti-récepteur de l'acétylcholine. Il est également recommandé à chaque laboratoire d'inclure son propre ensemble d'échantillons de contrôle dans le dosage.

ÉVALUATION DU DOSAGE

Spécificité clinique

Un dosage ELISA des auto-anticorps anti-AChR a été effectué sur le sérum de 402 donneurs de sang sains individuels. 401 (99,8 %) ont été identifiés comme AChR-négatifs. Un échantillon a été positif et a donné une valeur d'inhibition de 20 % (0,54 nmol/L à partir de la courbe d'étalonnage, 0,052 nmol/L calculé).

Sensibilité clinique

Le sérum de 83 patients atteints de myasthénie a été dosé avec le coffret AChRAB ELISA. Soixante-seize (76) sujets (92 %) ont été identifiés comme AChR-positifs.

Seuil de détection inférieur

Le contrôle négatif a été dosé 20 fois et la moyenne et l'écart type ont été calculés. Le seuil de détection inférieur à 2 écarts types a été de 0,25 nmol/L.

Précision interdosage (n = 20)

Échantillon	% d'inhibition	CV (%)	nmol/L	CV (%)
1	76,4	3,3	7,7	8,7
2	52,4	6,7	2,0	11,1
3	27,3	9,4	0,62	9,4

Précision intradosage (n = 24)

Échantillon	% d'inhibition	CV (%)	nmol/L	CV (%)
4	90,8	0,6	13,5	2,5
5	45,9	2,4	1,7	5,2
6	25,9	7,1	0,67	8,5

Précision clinique

L'analyse de 107 sérums des patients atteints de maladies auto-immunes autres que la myasthénie n'a mis en évidence aucune interférence avec les auto-anticorps dirigés contre la thyroglobuline (n=10), la thyroïde peroxydase (n=11), l'ADN double brin (n=9), le récepteur de la TSH (n=40), l'acide glutamique décarboxylase (n=10), la 21-hydroxylase (n=10) ou avec le facteur rhumatoïde (n=27). Deux autres échantillons ont donné des valeurs d'inhibition de 28 % (0,74 nmol/L) et 44 % (1,5 nmol/L). Ces échantillons provenaient respectivement d'un patient atteint de goitre


exophtalmique (maladie de Basedow) (positif aux anticorps anti-TR) et d'un patient atteint de lupus érythémateux disséminé (positif aux auto-anticorps anti-ADN double brin). Ces échantillons, dosés avec le coffret AChRab RIA de RSR, ont été positifs (valeurs respectives de 1,3 et 1,5 nmol/L). De plus, deux échantillons de patients atteints d'arthrite rhumatoïde (positifs au facteur rhumatoïde) étaient positifs dans le cadre du dosage ELISA AChRab de RSR et ont donné des valeurs d'inhibition de 24 % (0,77 nmol/L) et de 19 % (0,61 nmol/L.). Le premier de ces échantillons était aussi positif dans le cadre du dosage RIA AChRab de RSR (5,3 nmol/L).

Interférences

Aucune interférence n'a été observée lorsque les échantillons ont été chargés avec les substances suivantes : hémoglobine à 500 mg/dl, bilirubine à 20 mg/dl ou Intralipid jusqu'à 3 000 mg/dl.

CONSIDÉRATIONS DE SÉCURITÉ

Streptavidine-peroxydase (SA-POD)

Mention d'avertissement : Mise en garde 

Mention(s) de danger

H317 : Peut provoquer une allergie cutanée

Conseil(s) de prudence

P280 : Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage

P302 + P352 : EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU : laver abondamment à l'eau et au savon

P333 + P313 : En cas d'irritation ou d'éruption cutanée : consulter un médecin

P362 + P364 : Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation

Tampon de recons. pour AChR et Tampon de recons. pour

Mab-biotine

Mention d'avertissement : Mise en garde 

Mention(s) de danger

H319 : Provoque une sévère irritation des yeux

RÉSUMÉ DU DOSAGE

Jour 1	Laisser tous les réactifs et les échantillons reposer à température ambiante (20 à 25 °C) avant utilisation.	
	Pipetter :	100 µl de calibrateurs (M 1-4 facultatifs), de contrôles (N et P 1-2) et de sérums à tester dans des tubes Eppendorf
	Pipetter :	25 µl d'AChR (mélange foetal et adulte B+C) (centrifuger le cas échéant) et mélanger au vortex
	Mettre en incubation :	16 à 20 heures entre 2 et 8 °C
Jour 2	Pipetter :	50 µl du mélange échantillon-AChR (en double) de chaque tube dans les puits (à l'exception des blancs)
	Mettre en incubation :	1 heure à température ambiante sur un agitateur de plaques ELISA à 500 oscillations par minute
	Aspirer / décanter :	Plaque
	Laver :	La plaque à trois reprises et tapoter sur un matériel absorbant pour la sécher
	Pipetter :	50 µl de AChR Mab-biotine (E) (reconstitué) dans chaque puits (à l'exception des blancs)
	Mettre en incubation :	1 heure à température ambiante sur un agitateur de plaques ELISA à 500 oscillations par minute
	Aspirer / décanter :	Plaque
	Laver :	La plaque à trois reprises et tapoter sur un matériel absorbant pour la sécher
	Pipetter :	100 µl de SA-POD (G) (dilué à 1:20) dans chaque puits (à l'exception des blancs)
	Mettre en incubation :	30 minutes à température ambiante sur un agitateur de plaques ELISA à 500 oscillations par minute
	Aspirer / décanter :	Plaque
	Laver :	La plaque à trois reprises et rincer à l'eau purifiée, ³ puis la tapoter sur un matériau absorbant pour la sécher
	Pipetter :	100 µl de TMB (J) dans chaque puits (y compris les blancs)
Mettre en incubation :	30 minutes dans l'obscurité à température ambiante sans agitation	
Pipetter :	50 µl de solution d'arrêt (K) dans chaque puits (y compris les blancs) et agiter pendant 5 secondes	
Lire l'absorbance à 450 nm, dans un délai de 30 minutes après ajout de la solution d'arrêt.		
³ Omettre le lavage à l'eau purifiée si une machine à laver les plaques est utilisée.		

Conseil(s) de prudence

P280 : Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage

P305 + P351 + P338 : EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.

P337 + P313 : Si l'irritation oculaire persiste : consulter un médecin.

Ce kit a été conçu pour être utilisé *in vitro* par des professionnels uniquement. Suivre les instructions avec soin. Respecter les dates de péremption indiquées sur les étiquettes et la durée de conservation spécifiée pour les puits revêtus, les réactifs dilués ou reconstitués. Se reporter aux fiches de données de sécurité pour des informations plus détaillées sur la sécurité d'emploi. Pour tous les composants du coffret, éviter toute ingestion, inhalation, injection ou contact avec la peau, les yeux ou 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. 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.