



ElisaRSR™ AQP4 Ab Version 2

Coffret ELISA pour le dosage des anticorps anti-aquaporine-4 (AQP4) Version 2 –



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 coffret ELISA pour le dosage des auto-anticorps anti-AQP4 Version 2 de RSR est exclusivement destiné aux professionnels effectuant la détermination quantitative des auto-anticorps anti-AQP4 (Ac anti-AQP4) dans le sérum humain. La neuromyélie optique (NMO), également dénommée maladie de Devic, est une maladie neurologique immunitaire affectant la moelle épinière et les nerfs optiques. Elle peut être considérée comme un trouble distinct de la sclérose en plaques (SEP). Il a été montré qu'un auto-anticorps sérique de type immunoglobuline G (NMO-IgG) constituait un marqueur spécifique de la NMO, et le canal hydrique aquaporine 4 (AQP4) a été identifié comme l'antigène correspondant à la NMO IgG. La mesure des auto-anticorps AQP4 peut être d'un grand intérêt pour distinguer une NMO d'une SEP, lorsqu'un tableau clinique complet n'est pas présent et qu'une intervention précoce peut prévenir ou retarder l'incapacité.

RÉFÉRENCES

V. A. Lennon et al.

A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis.

Lancet 2004 364(9451) : 2106 - 2112

V. A. Lennon et al.

IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel.

The Journal of Experimental Medicine 2005 202 : 473 – 477

B. G. Weinshenker et al.

Neuromyelitis optica IgG predicts relapse after longitudinally extensive transverse myelitis.

Annals of Neurology 2006 59 : 566 - 569

N. Isobe et al.

Quantitative assays for anti-aquaporin-4 antibody with subclass analysis in neuromyelitis optica.

Multiple Sclerosis Journal 2012 18 : 1541 - 155

S. Jarius et al.

Testing for antibodies to human aquaporin-4 by ELISA: Sensitivity, specificity and direct comparison with immunohistochemistry.

Journal of the Neurological Sciences 2012 320 : 32 - 37

BREVETS

Les brevets suivants s'appliquent :

Brevet européen EP 1 700 120 B1, brevets américains 7 101 679 B2, 7 947 254 B2 et 8 889 102 B2, brevet chinois ZL200480040851.3 et brevet japonais 4538464.

PRINCIPE DU DOSAGE

Dans le coffret ELISA AQP4 Ab de RSR Version 2, les auto-anticorps anti-AQP4 présents dans les sérums des patients, les calibrateurs et les contrôles interagissent avec l'AQP4 revêtant les puits d'une plaque ELISA et l'AQP4 biotinyllée de la phase liquide (AQP4-biotine). Après incubation à température ambiante pendant 2 heures avec agitation, le contenu des puits est éliminé. Les auto-

anticorps anti-AQP4 liés à l'AQP4 revêtant le puits interagissent également avec l'AQP4-biotine grâce à la capacité des auto-anticorps anti-AQP4 présents dans les échantillons d'agir de manière divalente, laissant l'AQP4-biotine liée au puits, par l'intermédiaire d'un pont avec les auto-anticorps anti-AQP4. La quantité d'AQP4-biotine liée est alors déterminée au cours d'une deuxième 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 streptavidine peroxydase 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-AQP4 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 10 U/ml à la longueur d'onde de 450 nm. S'il est possible de lire à une seule longueur d'onde, la longueur d'onde de 405 nm peut être utilisée. L'intervalle de mesure est compris entre 3,0 et 80 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 lipidémiques ou hémolysés. Des études au cours desquelles des échantillons de plasma prélevés sur EDTA, citrate et héparine ont été chargés avec des sérums positifs aux auto-anticorps anti-AQP4 ont montré des changements mineurs du signal par rapport à un sérum chargé du même donneur. Plus précisément, les valeurs de la DO₄₅₀ obtenues avec des plasmas prélevés sur EDTA, citrate et héparine chargés ont atteint 79 % à 128 % des concentrations obtenues avec un sérum chargé (15 échantillons avec des concentrations sériques comprises entre 2,6 U/ml et 30 U/ml) ou 87 % à 130 % si elles sont exprimées en U/ml.

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 tr/min 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

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.

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.

PRÉPARATION DES RÉACTIFS FOURNIS

Conservé le coffret non ouvert et ses composants entre 2 et 8 °C.

A	Puits revêtus d'AQP4 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 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 pendant une durée maximale de 4 mois.
B1-5	Calibrateurs 1,5 ; 5 ; 20 ; 40 ; 80 U/ml (unités arbitraires de RSR) 5 × 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	AQP4-biotine 3 flacons Lyophilisée
	Immédiatement avant utilisation, reconstituer avec le tampon de reconstitution pour AQP4-biotine (F), 1,5 ml par flacon. Lorsque plusieurs flacons sont utilisés, regrouper les contenus des flacons et mélanger doucement.
F	Tampon de reconstitution pour AQP4-biotine 10 ml Prêt à l'emploi
G	Streptavidine peroxydase (SA-POD) 0,8 ml Concentrée

	Diluer au 20 ^e avec le diluant pour SA-POD (H). Par exemple, 0,5 ml (G) + 9,5 ml (H). Conserver pendant une durée maximale de 16 semaines entre 2 et 8 °C après dilution.
H	Diluant pour SA-POD 15 ml Prêt à l'emploi
I	Substrat peroxydase (TMB) 15 ml Prêt à l'emploi
J	Solution de lavage concentrée 120 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.
K	Solution d'arrêt 14 ml Prête à l'emploi

PROCÉDURE DU DOSAGE

Laisser tous les réactifs reposer à température ambiante (20 à 25 °C) pendant 30 minutes avant ouverture. Ne pas reconstituer l'AQP4-biotine avant l'étape 2 ci-dessous. Une pipette de type Eppendorf à répétition est recommandée pour les étapes 2, 5, 8 et 9.

1.	Pipetter 50 µl (en double) des sérums des patients, des calibrateurs (B1-5) et des contrôles (C1-2 et D) dans les puits respectifs. Laisser un puits vide pour le blanc.
2.	Reconstituer l'AQP4-biotine et pipetter 25 µl dans chaque puits (à l'exception du blanc).
3.	Couvrir le cadre et agiter les puits pendant 2 heures à température ambiante sur un agitateur de plaques ELISA (500 oscillations par minute).
4.	Utiliser un laveur de plaques ELISA pour aspirer et laver les puits à trois reprises avec une solution de lavage diluée (J). Si un laveur de plaques n'est pas disponible, jeter le contenu des puits en retournant brusquement le cadre contenant les puits au-dessus d'un récipient adapté, laver trois fois manuellement puis tapoter doucement les puits renversés sur une surface absorbante sèche et propre pour retirer l'excès de solution de lavage.
5.	Pipetter 100 µl de SA-POD diluée (G) dans chaque puits (à l'exception du blanc).
6.	Couvrir la plaque et mettre en incubation pendant 20 minutes à température ambiante sur un agitateur de plaques ELISA (500 oscillations par minute).
7.	Répéter l'étape de lavage 4. Si un lavage manuel est effectué, utiliser de l'eau purifiée pour l'étape finale de lavage (afin de retirer toute trace de mousse) avant de tapoter les puits renversés pour les sécher.
8.	Pipetter 100 µl de TMB (I) dans chaque puits (y compris le blanc) et mettre en incubation pendant 20 minutes dans l'obscurité à température ambiante sans agiter.
9.	Pipetter 100 µl de la solution d'arrêt (K) dans chaque puits (y compris le blanc) et agiter la plaque pendant environ 5 secondes sur un agitateur de plaques. S'assurer que les incubations des substrats sont les mêmes pour chaque puits.

10.	Dans un délai de 10 minutes, lire l'absorbance de chaque puits à 450 nm et 405 nm en utilisant un lecteur de plaques ELISA, en la comparant avec celle d'un puits de blanc contenant 100 µl de TMB (I) et 100 µl de solution d'arrêt (K) uniquement .
-----	--

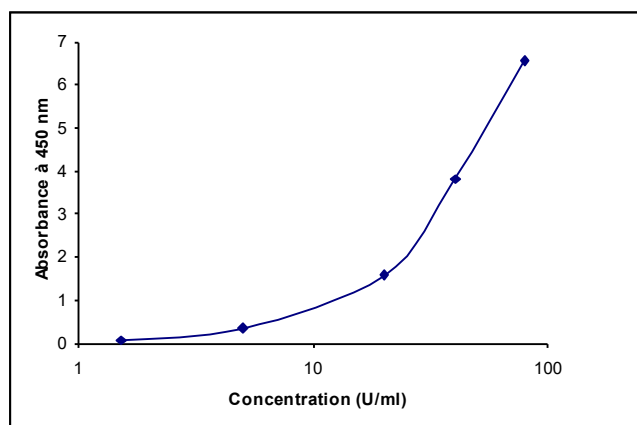
ANALYSE DES RÉSULTATS

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-AQP4 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 0,15 U/ml peut être assignée au contrôle négatif pour contribuer au traitement informatique des résultats du dosage. Les échantillons présentant des concentrations d'auto-anticorps anti-AQP4 supérieures à 80 U/ml peuvent être dilués (par exemple au 10^e et/ou au 100^e) dans un sérum négatif aux auto-anticorps anti-AQP4. 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. A450 nm	Conc. U/ml	A405 nm	Conc. U/ml
Contrôle négatif (D)	0,021		0,006	
B1	0,085	1,5	0,024	1,5
B2	0,354	5	0,108	5
B3	1,577	20	0,468	20
B4	3,802	40	1,118	40
B5	6,588	80	1,938	80
Contrôle positif (C1)	0,755	12,1	0,224	12,0
Contrôle positif (CII)	2,506	28	0,745	28

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 DU DOSAGE

Négatif	< 3,0 U/ml
Positif	≥ 3,0 U/ml

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-AQP4. Il est également recommandé à chaque laboratoire d'inclure son propre ensemble d'échantillons de contrôle dans le dosage.

ÉVALUATION CLINIQUE

(Les informations ci-après ont été obtenues à partir des données à 450 nm)

Spécificité clinique

Les sérums de 358 donneurs de sang individuels sains ont été testés avec le coffret AQP4 Ab ELISA Version 2. Trois cent cinquante-six (356) sérums (99 %) ont été identifiés comme négatifs aux auto-anticorps anti-AQP4.

Sensibilité clinique

Parmi 62 sérums provenant de patients atteints de NMO ou d'une pathologie du spectre de la NMO, 48 (77 %) ont été positifs aux auto-anticorps anti-AQP4.

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 0,17 U/ml

Précision intradosage

Échantillon	Moyenne U/ml (n = 25)	CV (%)
1	3,9	7,7
2	7,0	8,6
3	28	3,2
4	58	3,1

Précision interdosage

Échantillon	Moyenne U/ml (n = 20)	CV (%)
A	5,0	15,6
B	13,3	10,5
C	35	7,9
D	59	7,5

Précision clinique

L'analyse avec le coffret AQP4 Ab ELISA Version 2 de RSR de 205 sérums provenant de patients atteints de maladies auto-immunes autres que les pathologies du spectre de la neuromyérite optique n'a indiqué aucune interférence avec les auto-anticorps dirigés contre le récepteur de la TSH (n = 110), l'acide glutamique décarboxylase (n = 26), la 21-hydroxylase (n = 12), le récepteur de l'acétylcholine (n = 10), la thyroïde peroxydase (n = 15), la thyroglobuline (n = 10), l'IA-2 (n = 7) ou avec le facteur rhumatoïde (n = 15).

Interférences

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

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 réactifs

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'azoture 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

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 :	25 µl d'AQP4 biotine (restituée) dans chaque puits (à l'exception du blanc)
Mettre en incubation :	2 heures 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 ¹
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 / décanter :	Plaque
Laver :	La plaque à trois reprises et tapoter sur un matériel absorbant pour la sécher ^{1,2}
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 :	100 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 dans un délai de 10 minutes après l'ajout de la solution d'arrêt. ³	

¹ Il n'est pas nécessaire de sécher les plaques en les tapotant après le lavage si un laveur de plaques automatique est utilisé.

² Utiliser de l'eau purifiée pour le lavage final en cas de lavage manuel.

³ S'il est possible de lire à une seule longueur d'onde, la longueur d'onde de 405 nm peut être utilisée.