

1. NOM ET DESTINATION

ACHR-AB est une trousse de dosage radiorécepteur (RRA) des auto-anticorps anti-récepteur de l'acétylcholine dans le sérum humain ou plasma EDTA.

2. INTRODUCTION

Les auto-anticorps anti-récepteur de l'acétylcholine (AChRab) sont responsables du dysfonctionnement de la jonction neuromusculaire dans le cas de la myasthénie.

Leur recherche est d'un grand intérêt dans le diagnostic de cette maladie.

3. PRINCIPE

Les formes adultes et fœtales des récepteurs de l'acétylcholine diffèrent par l'une de leur sous-unité (la sous-unité gamma du récepteur fœtal est remplacée par la sous-unité epsilon chez le récepteur adulte). De plus, les auto-anticorps AChRab de certains sérums reconnaissent préférentiellement la forme fœtale du récepteur, tandis que dans d'autres sérums, ces anticorps vont reconnaître la forme adulte du récepteur.

Par conséquent, un mélange soigneusement équilibré de récepteurs solubilisés adultes et fœtaux représente la préparation optimale pour ces dosages. Ce mélange de récepteurs est marqué par de l'alpha-bungaratoxine radioactive (¹²⁵I). Les récepteurs marqués (¹²⁵I-AChR) sont incubés avec les échantillons de sérum. Le complexe formé par le récepteur marqué et les auto-anticorps est immunoprécipité par des anti-IgG humaines.

Après centrifugation et lavage, le précipité est compté.

4. REACTIFS

Chaque trousse contient les réactifs suffisants pour 25 tests. La date de péremption est indiquée sur l'étiquette extérieure.

REACTIFS	QUANTITE	CONSERVATION
ANTISERUM: prêt à l'emploi. Anti-IgG humaines, tampon et azoture de sodium.	1 flacon de 1,5 ml	2-8°C jusqu'à la date de péremption.
RECEPTEUR ¹²⁵I: lyophilisés. Récepteurs de l'acétylcholine marqués à l'iode 125 avec l'alpha bungaratoxine, tampon, protéines animales et colorant rouge. ≤ 40 kBq (≤ 1,5 µCi).	1 flacon qsp 1,3 ml de tampon	2-8°C jusqu'à la date de péremption. 2-8°C 2 semaines après reconstitution.
CONTROLE NEGATIF (N): prêt à l'emploi. Sérum humain et azoture de sodium.	1 flacon de 0,1 ml	2-8°C jusqu'à la date de péremption.
CONTROLE POSITIF (P): prêt à l'emploi. Sérum humain contenant des auto-anticorps du récepteur de l'acétylcholine et azoture de sodium.	1 flacon de 0,1 ml	2-8°C jusqu'à la date de péremption.
DILUANT: prêt à l'emploi. Sérum humain normal et azoture de sodium.	1 flacon de 1 ml	2-8°C jusqu'à la date de péremption.
SOLUTION DE LAVAGE: prêt à l'emploi. Tampon et azoture de sodium.	1 flacon de 70 ml	2-8°C jusqu'à la date de péremption.
TAMPON: prêt à l'emploi. Tampon et azoture de sodium. Pour la reconstitution du traceur uniquement.	1 flacon de 4 ml	2-8°C jusqu'à la date de péremption.

5. PRECAUTIONS D'EMPLOI**5.1. Mesures de sécurité**

Les matières premières d'origine humaine contenues dans les réactifs de cette trousse ont été testées avec des trousse agrées et trouvées négatives en ce qui concerne les anticorps anti-HIV 1, anti-HIV 2, anti-HCV et l'antigène HBs. Cependant aucune méthode d'analyse ne permet à ce jour de garantir totalement qu'une matière première d'origine humaine soit incapable de transmettre l'hépatite, le virus HIV, ou toute autre infection virale. Aussi faut-il considérer toute matière première d'origine humaine, y compris les échantillons à doser, comme potentiellement infectieuse.

Ne pas effectuer les pipetages à la bouche.

Ne pas fumer, boire ou manger dans les locaux où l'on manipule les échantillons ou les réactifs.

Porter des gants à usage unique pendant la manipulation des réactifs ou des échantillons et se laver soigneusement les mains après.

Eviter de provoquer des éclaboussures.

Eliminer les échantillons et décontaminer tout le matériel susceptible d'avoir été contaminé comme s'ils contenaient des agents infectieux. La meilleure méthode de décontamination est l'autoclavage pendant au moins une heure à 121,5°C.

L'azoture de sodium peut réagir avec les canalisations de plomb et de cuivre pour former des azotures de métaux fortement explosifs. Lors de l'évacuation des déchets, les diluer abondamment pour éviter la formation de ces produits.

5.2. Règles de base de radioprotection

Ce produit radioactif ne peut être reçu, acheté, détenu ou utilisé que par des personnes autorisées à cette fin et dans des laboratoires couverts par cette autorisation. Cette solution ne peut en aucun cas être administrée ni à l'homme ni aux animaux.

L'achat, la détention, l'utilisation et l'échange de produits radioactifs sont soumis aux réglementations en vigueur dans le pays de l'utilisateur.

L'application des règles de base de radioprotection assure une sécurité adéquate.

Un aperçu en est donné ci-dessous :

Les produits radioactifs seront stockés dans leur conteneur d'origine dans un local approprié.

Un cahier de réception et de stockage de produits radioactifs sera tenu à jour.

La manipulation de produits radioactifs se fera dans un local approprié dont l'accès doit être réglementé (zone contrôlée).

Ne pas manger, ni boire, ni fumer, ni appliquer des cosmétiques en zone contrôlée. Ne pas pipeter des solutions radioactives avec la bouche.

Eviter le contact direct avec tout produit radioactif en utilisant des blouses et des gants de protection.

Le matériel de laboratoire et la verrerie qui ont été contaminés doivent être éliminés au fur et à mesure afin d'éviter une contamination croisée de plusieurs isotopes.

Chaque cas de contamination ou perte de substance radioactive devra être résolu selon les procédures établies.

Toute élimination de déchets radioactifs se fera conformément aux réglementations en vigueur.

5.3. Précautions d'utilisation

Ne pas utiliser les composants de la trousse au-delà de la date de péremption.

Ne pas mélanger les réactifs provenant de lots différents.

Eviter la contamination microbienne des réactifs.

Respecter le temps d'incubation et la température au cours de la manipulation.

6. PREPARATION ET CONSERVATION DES ECHANTILLONS

Le dosage s'effectue sur sérum uniquement ou sur plasma EDTA. Les échantillons présentant un trouble, une hémolyse, une hyperlipémie ou contenant de la fibrine peuvent donner des résultats inexacts.. Le dosage est effectué rapidement après séparation ou à partir d'aliquotes qui seront conservées congelées immédiatement après séparation à une température au moins égale à -20°C.

Un stockage incorrect peut conduire à une perte d'activité AChR-Ab.

Ils seront décongelés à température ambiante juste avant utilisation et homogénéisés (vortex).

Centrifuger le sérum avant dosage afin d'éliminer les agrégats ; cette étape de centrifugation ne doit pas être omise. Ne pas recongeler les échantillons pour une utilisation ultérieure.

7. MODE OPERATOIRE

7.1. Matériel nécessaire

Micropipettes de précision ou matériel similaire à embouts jetables permettant la distribution de 5 µl, 50 µl et 1 ml (ou multipipette de 1 ml). Leur calibration doit être vérifiée régulièrement.

Eau distillée.

Tubes jetables.

Mélangeur de type vortex.

Centrifugeuse multitube réfrigérée à 2-8°C (1500 g).

Portoirs pour tubes permettant leur retournement.

Scintillateur gamma réglé pour la mesure de l'iode 125.

7.2. Reconstitution du traceur

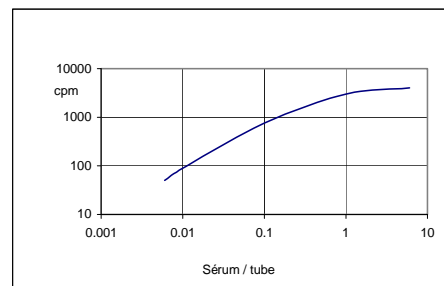
Reconstituer le flacon de traceur avec 1,3 ml de tampon. Reboucher le flacon et mélanger par retournement pour assurer la complète dissolution du produit lyophilisé. La solution doit être claire. Utiliser dans les 30 minutes après la reconstitution. La solution ainsi obtenue peut être conservée 2 semaines maximum à 4°C.

Ne pas congeler la préparation reconstituée.

7.3. Dosage de sérums à concentration élevée

La relation entre la concentration en auto-anticorps antirécepteur de l'acétylcholine et les cpm liés n'est pas linéaire dans les hautes concentrations, de plus, la portion linéaire varie d'un échantillon à l'autre. Afin de résoudre ce problème, on dose plusieurs dilutions dans du sérum humain normal pour obtenir la zone linéaire. Les concentrations en anticorps sont alors calculées en utilisant les résultats obtenus dans la zone linéaire. Les valeurs obtenues sont multipliées par le facteur de dilution pour déterminer la concentration du sérum pur.

Un sérum humain normal (diluant) est fourni dans la trousse pour permettre ce type d'analyse.



7.4. Protocole

Le dosage nécessite les groupes de tubes suivants :

Groupe T pour la détermination de l'activité totale,

Groupe Contrôles,

Groupe Sx pour les échantillons à doser,

Il est conseillé d'effectuer les essais en double pour les contrôles et les échantillons.

Respecter l'ordre d'addition des réactifs :

Distribuer 5 µl de contrôle négatif, de contrôle positif et d'échantillons dans les groupes de tubes correspondants.

Ajouter 50 µl de ¹²⁵I-récepteurs de l'acétylcholine dans chaque tube, ainsi que dans 2 tubes vides pour la mesure de l'activité totale (tubes T).

Mélanger le contenu de chaque tube avec un appareil de type vortex après les avoir bouchés.

Incuber 2 heures à température ambiante (18-25°C).

Ajouter 50 µl d'antisérum (sauf dans les tubes T).

Mélanger le contenu de chaque tube avec un appareil de type vortex après les avoir bouchés.

Incuber 2 heures ou une nuit à 2-8°C.

Ajouter 1 ml de solution de lavage dans chaque tube, (sauf dans les tubes T).

Mélanger le contenu de chaque tube avec un appareil de type vortex.

Centrifuger à 3000 g pendant 20 mn à 2-8°C (sauf les tubes T).

Eliminer la solution par retournement en évitant de décrocher le culot (sauf les tubes T).

Ajouter 1 ml de solution de lavage dans chaque tube (sauf dans les tubes T).

Mélanger le contenu de chaque tube avec un appareil de type vortex pour remettre en suspension le culot.

Centrifuger à 3000 g pendant 20 mn à 2-8°C (sauf les tubes T).

Eliminer la solution par retournement en évitant de décrocher le culot (sauf les tubes T).

Mesurer la radioactivité à l'aide d'un scintillateur gamma. Un comptage de 5 minutes est recommandé.

8. CONTROLE DE QUALITE

Les bonnes pratiques de laboratoire impliquent que des échantillons de contrôle soient utilisés dans chaque série de dosages pour s'assurer de la qualité des résultats obtenus. Ces échantillons devront être traités de la même façon que les prélèvements à doser et il est recommandé d'en analyser les résultats à l'aide de méthodes statistiques appropriées.

9. RESULTATS**9.1. Calcul des résultats**

La radioactivité dans le culot représente la quantité du complexe récepteur-toxine liée à l'anticorps anti-récepteurs. Le résultat est souvent exprimé en nanomoles de toxine liée par litre de sérum testé et la relation entre ce paramètre et la radioactivité du culot peut être calculée à partir des données suivantes :

L'activité spécifique (K en Ci/mmol) de la ¹²⁵I-toxine au moment du marquage.

La décroissance de l' ¹²⁵I dans le complexe ¹²⁵I-toxine-récepteur pendant la période entre le marquage et le jour du dosage (facteur de décroissance A).

Le volume de sérum utilisé dans le dosage (C µl)

L'efficacité du compteur (B).

La formule se présente comme ci-dessous :

$$\text{nmol/litre de toxine liée} = \frac{(\text{échantillon à tester en cpm} - \text{contrôle négatif en cpm}) \times A}{C \times K \times B \times 2,22}$$

Facteur de décroissance (A) :

Semaines après marquage	Facteur de décroissance (A)
Jusqu'à 1 semaine	1,0
1 à 2 semaines	1,1
2 à 3 semaines	1,2
3 à 4 semaines	1,3
4 à 5 semaines	1,4
5 à 6 semaines	1,5
6 à 7 semaines	1,6
7 à 8 semaines	1,75

9.2. Exemple de calcul

Si l'échantillon compté donne 2756 cpm et le contrôle négatif 140 cpm et si le test a été pratiqué sur 5 µl (C = 5) 2 semaines après le marquage (facteur de décroissance A = 1,2) en utilisant une ¹²⁵I-toxine avec une activité spécifique de K = 216 Ci/mmol et un compteur avec un rendement de B = 0,7 on obtient alors le résultat suivant :

$$\text{nmol/litre de toxine liée} = \frac{(2756 \text{ cpm} - 140 \text{ cpm}) \times 1,2}{5 \mu\text{l} \times 216 \text{ Ci/mmol} \times 0,7 \times 2,22} = 1,9$$

9.3. Résultat type (exemple seulement). Ces données ne doivent en aucun cas être substituées aux résultats obtenus dans le laboratoire. Dosage sur 5 µl. Les échantillons sont dilués dans le diluant.

Tubes	Contenu	Comptage moyen en cpm	Toxine liée en nmol/l
T	Activité totale	78000	
Contrôle négatif	Contrôle négatif	224	0
Contrôle positif	Contrôle positif	10043	4,9
Echantillon A	Echantillon A	3962	1,9
A/2	Echantillon A + diluant	2120	0,95
Echantillon B	Echantillon B	1607	0,69
B/2	Echantillon B + diluant	853	0,31
Echantillon C	Echantillon C	12249	6,0
C/2	Echantillon C + diluant	6096	2,9
Echantillon D	Echantillon D	38513	19
D/10	Echantillon D + diluant	13194	6,5

10. LIMITATIONS DE LA METHODE

Afin d'obtenir des résultats fiables, nous vous conseillons la stricte application de la procédure décrite. Il faut toujours conserver les échantillons congelés.

11. EVALUATION CLINIQUE

Chaque laboratoire doit établir ses propres valeurs normales. Les valeurs données ci-dessous ne sont qu'indicatives.

Myasthéniques	0 - 1500 nmol/l
Donneurs normaux	0 - 0,2 nmol/l
Autres maladies auto-immunes	0 - 0,5 nmol/l

Des valeurs > 0,5 nmol/l peuvent être considérées comme positives en anticorps anti-récepteur de l'acétylcholine.

11.1. Sensibilité clinique

Des échantillons provenant de 53 patients souffrant de myasthénie ont été dosés par la trousse ACHR-AB. Tous les échantillons ont bien été identifiés comme étant positifs.

Dans une série plus large, K. Ohta et al (Autoimmunity 2003 ;36 :151-154) ont établi que 82% des échantillons provenant de 1740 patients atteints de myasthénie avaient des résultats positifs avec la trousse ACHR-AB.

12. CARACTERISTIQUES SPECIFIQUES DU DOSAGE

12.1. Imprécision

Echantillon	Intra-essai		Echantillon	Inter-essai	
	nmol/l n=20	CV %		nmol/l n=20	CV %
1	2,2	5	3	3,3	1,9
2	0,5	5,9	4	1,8	1,7

12.2. Spécificité

Le dosage est spécifique pour les anticorps anti-récepteur de l'acétylcholine. On n'a trouvé aucune interférence avec les autres auto-anticorps et en particulier les auto anticorps anti-thyroglobuline, anti-thyropéroxydase et les anti-récepteurs de la TSH ainsi que les facteurs rhumatoïdes, les auto-anticorps anti-DNA et anti-mitochondries.

12.3. Limite de détection

La limite de détection est définie comme étant la plus petite concentration mesurable. Elle est calculée comme étant la concentration en cpm à 2 écart-types de la valeur du sérum négatif. Elle a été évaluée à 0,02 nmol/l.

12.4. Interférence

Aucune interférence n'a été observée lors des essais de surcharge avec de l'hémoglobine jusqu'à 5 mg/ml, de la bilirubine jusqu'à 20 mg/dl et de l'intralipid jusqu'à 30mg/dl.

SCHEMA OPERATOIRE

Groupes de tubes	Contrôles Echantillons µl	¹²⁵ I- récepteur µl		Antisérum (anti- IgG humaines) µl		Solution de lavage µl		Solution de lavage µl	
T	-	50		-		-		-	
Contrôle négatif	5	50	Agiter ---- Incuber 2 h à 18-25°C	50	Agiter ---- Incuber 2 h à 2-8°C ou 18-24h à 2-8°C	1000	Agiter ---- Centrifuger 20 mn à 2-8°C à 3000g	1000	Agiter ---- Centrifuger 20 mn à 2-8°C à 3000g
Contrôle Positif	5	50		50		1000		1000	Eliminer le surnageant ----
Echantillons	5	50		50		1000	Eliminer le surnageant	1000	Compter 5 mn