

1. NOM ET DESTINATION

TR-AB-CT est une trousse de dosage radiorécepteur (RRA) des auto-anticorps anti-récepteurs de la TSH dans le sérum.

2. INTRODUCTION

Les anticorps anti-récepteurs de la TSH sont un marqueur fiable de la maladie de Basedow.

Le taux d'anticorps diminue progressivement lors du traitement par antithyroïdiens de synthèse ou après thyroïdectomie. La valeur prédictive du taux des anticorps anti-récepteurs de la TSH est diversement appréciée. Cependant la majorité des études s'accorde pour dire que la présence d'un taux élevé d'anticorps anti-récepteurs laisse présager une rechute. Le passage transplacentaire de ces anticorps explique les cas d'hyperthyroïdie observés chez les nouveau-nés de mères ayant la maladie de Basedow.

Ces anticorps sont présents dans certains cas de thyroïdites de Hashimoto, de thyroïdites subaiguës ou de thyroïdites silencieuses à phase de thyrotoxicose.

3. PRINCIPE

La trousse TR-AB-CT utilise le principe de la compétition : les auto-anticorps anti-récepteurs de la TSH présents dans le sérum du patient réagissent avec des récepteurs de la TSH coatés sur des tubes. Les auto-anticorps liés inhibent alors la liaison de la TSH marquée à l'iode 125, avec les récepteurs de la TSH. Ensuite, les taux d'anticorps sont lus sur une courbe d'étalonnage.

Les résultats peuvent aussi être exprimés en pourcentage d'inhibition.

4. REACTIFS

Chaque trousse contient les réactifs suffisants pour 60 tests. La date de péremption est indiquée sur l'étiquette extérieure.

	REACTIFS	QUANTITE	CONSERVATION
A	Tubes revêtus: prêts à l'emploi. Récepteurs de la TSH porcine	3 X 20 tubes	2° - 8°C jusqu'à la date de péremption. 1 semaine à 2° - 8°C après ouverture. Voir paragraphe 5.3
B	Tampon d'incubation : prêt à l'emploi. Tampon, sérum albumine bovine, colorant jaune, azoture de sodium, Ig G de souris.	1 flacon de 10 mL	2° - 8°C jusqu'à la date de péremption
C	Contrôle négatif : prêt à l'emploi. Azoture de sodium, sérum humain normal.	1 flacon de 0,7 mL	2° - 8°C jusqu'à la date de péremption
D	Calibrators 1 à 4: prêts à l'emploi. 1-2-8-40 U/L *anticorps humains anti-récepteurs de la TSH, azoture de sodium, sérum humain normal.	4 flacons de 0,7 mL	2° - 8°C jusqu'à la date de péremption
E	Contrôle positif : prêt à l'emploi. Anticorps humains anti-récepteur de la TSH, azoture de sodium, sérum humain normal. La concentration est indiquée sur chaque étiquette.	1 flacon de 0,7 mL	2° - 8°C jusqu'à la date de péremption
F	¹²⁵ I – TSH: prêt à l'emploi. 100 kBq TSH porcine marquée à ¹²⁵ I, tampon, sérum albumine bovine, azoture de sodium, colorant rouge.	1 flacon de 6,5 mL	2° - 8°C jusqu'à la date de péremption
G	Solution de lavage concentrée: à diluer avec de l'eau distillée pour obtenir un volume final de 500 ml.	1 flacon de 50 mL	2° - 8°C jusqu'à la date de péremption
	Sac en polyéthylène et dessicant pour stockage des sachets de tubes revêtus ouverts.		

* La standardisation a été réalisée contre le standard international NIBSC 08/204.

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 troussees agréées 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. Ne pas mélanger au cours d'une même série, des tubes stockés après ouverture des sacs avec des tubes provenant d'un sac qui vient d'être ouvert.

6. PREPARATION ET CONSERVATION DES ECHANTILLONS

Le dosage s'effectue sur du sérum uniquement. Ne pas utiliser de plasma. Les échantillons hémolysés ou hyperlipémiques doivent être écartés. Le dosage est effectué rapidement après séparation 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 TR-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 50µL, 100µL, et 1 mL (ou multipipette de 1 mL et de 50 µL.) Leur calibration doit être vérifiée régulièrement. Eau distillée. Papier absorbant. Mélangeur de type vortex. Agitateur à mouvement orbital horizontal. Portoirs pour vider les tubes par retournement. Scintillateur gamma réglé pour la mesure de l'Iode 125.

7.2. Reconstitution du tampon de lavage

Le tampon pour le lavage des tubes revêtus doit au préalable être dilué avec de l'eau distillée jusqu'à un volume final de 500 ml.

7.3. Protocole

Le dosage nécessite les groupes de tubes suivants : Groupe T pour la détermination de l'activité Totale. Groupe standards 1 à 4 pour l'établissement de la courbe d'étalonnage. Groupe Contrôles. Groupe Sx (Echantillons à doser). Il est conseillé d'effectuer les essais en double pour les standards, les contrôles et les échantillons.

Respecter l'ordre d'addition des réactifs.

- Calculer le nombre de tubes revêtus nécessaires. Laisser les sachets de tubes à température ambiante pendant 30 minutes puis sortir les tubes des sachets. Tous les tubes revêtus inutilisés devront être conservés dans leur sachet d'origine, refermé avec de l'adhésif puis placés dans le sac de polyéthylène fourni dans la trousse. Le stockage se fera alors à 2-8°C pendant une semaine maximum. Cependant, il est recommandé d'utiliser les tubes revêtus dans la journée dès lors que le sachet a été ouvert.
- Laisser tous les réactifs à température ambiante pendant 30 minutes au moins, avant l'utilisation.
- Numéroté les tubes, à raison de 2 tubes pour chaque échantillon, chaque calibrateur et chaque contrôle. Ajouter 2 tubes non-revêtus pour mesurer les coups totaux. Les tubes de calibrateur ne seront pas utilisés si les résultats sont rendus en pourcentage d'inhibition.
- Ajouter 50µL de tampon d'incubation à chaque tube (utiliser de préférence une pipette à répétition type Eppendorff).
- Ajouter 100 µL de calibrateur, de contrôle ou d'échantillon à tester dans les tubes correspondants.
Couvrir les tubes et incubé 2 heures à température ambiante (20-25°C) sur un agitateur de type orbital (environ 200 rpm)
- Ajouter 1 mL de solution de lavage diluée à chaque tube (sauf dans les tubes de coups totaux) puis aspirer ou décanter par retournement. Répéter ce lavage.
- Ajouter 100µL de traceur ¹²⁵I – TSH à chaque tube, y compris les tubes de coups totaux (utiliser une pipette à répétition type Eppendorff), couvrir les tubes et incubé 60 minutes à température ambiante (20-25°C) sur un agitateur de type orbital (environ 200 rpm).
- Ajouter 1 mL de tampon de lavage à chaque tube (sauf dans les tubes de coups totaux) puis aspirer ou décanter par retournement. Répéter ce lavage.
- Mesurer la radioactivité de chaque tube (y compris les coups totaux) pendant 1 minute chacun, à l'aide d'un scintillateur gamma.
- Etablir la courbe standard en B/Bo, par rapport au log de la concentration des standards (exprimée en U/L de standard international 08/204). Bo étant les CPM du contrôle négatif. Lire les concentrations des échantillons et du contrôle positif sur la courbe standard. Les résultats peuvent aussi être exprimés en inhibition de liaison (%) en utilisant la formule suivante :

$$\%I = (1 - B/Bo) \times 100$$

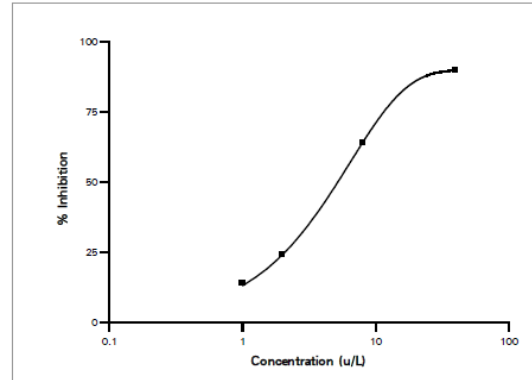
8. CONTROLE DE QUALITE

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

Exemple seulement : ces données ne doivent en aucun cas être substituées aux résultats obtenus dans le laboratoire.

	% B	% I	Units/L
Activité totale	84 530		
Contrôle C	16.34	0	
D1	14.07	14	1
D2	12.36	24	2
D3	5.93	64	8
D4	1.63	90	40
Contrôle E	9.36	43	3.9



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 et éviter une augmentation de la température au-delà de -20°C. Un stockage incorrect peut conduire à une perte de l'activité TR-AB.

11. VALEURS ATTENDUES

Les valeurs inférieures à 1 U/L seront considérées comme négatives, entre 1,1 et 1,5 U/L comme indéterminées et supérieures à 1,5 U/L comme positives, quant à la présence de TRAb. Cependant, chaque laboratoire devra établir ses propres valeurs de référence.

242 échantillons de donneurs sains ont été dosés avec le kit TRAb-CT. 242 (soit 100%) ont été identifiés comme étant négatifs pour les autoanticorps anti récepteurs de la TSH.

50 échantillons de patients diagnostiqués comme étant atteints de la maladie de Graves ont été dosées avec le kit TRAb-CT. 46 (soit 92%) ont été identifiés comme étant positifs pour les autoanticorps anti récepteurs de TSH.

12. CARACTERISTIQUES SPECIFIQUES DU DOSAGE

12.1. Imprécision

INTER-ESSAI (n=20)

Echantillon	Units /L	CV (%)	%I	CV (%)
1	0.9	17	12	13
2	2.2	13	27	7.9
3	5.2	7.1	57	5.2
4	13	15	74	1.9
5	24	16	84	2.1

INTRA-ESSAI (n=25)

Echantillon	Units/L	CV (%)	%I	CV(%)
6	1.7	5.3	21	5.5
7	4.5	4.7	45	2.8

12.2. Spécificité

Le dosage est spécifique pour les anticorps anti-récepteurs de la TSH. Il n'y a aucune interférence avec les autres auto-anticorps et en particulier les auto-anticorps anti-thyroglobuline, anti-thyropéroxydase, les facteurs rhumatoïdes, les anticorps anti-récepteurs à l'acétylcholine, les anticorps anti- DNA double brins.

De plus, aucune interférence n'a été observée avec des concentrations très élevées en LH (10 UI/mL), TSH (0.3 UI/L), FSH (15 UI/mL). HCG (160 UI/mL)

12.3. Test de récupération

Les pourcentages du test de récupération s'échelonnent de 94 à 112%. La méthode utilisée consiste à prendre des sérums humains positif en TRAb (11 échantillons de concentration connue), et les surcharger avec une quantité connue de TRAb.

Les concentrations théoriques et mesurées ont été comparées afin d'obtenir les valeurs en pourcentage de récupération.

12.4. Test de dilution

Les échantillons ayant des concentrations en TRAB élevées peuvent être dilués dans le contrôle négatif du kit. Certains sérums ne se diluent pas d'une façon linéaire et nous conseillons que les dilutions donnant des valeurs proches de 50% d'inhibition soient utilisées pour le calcul des concentrations de TRAB. Le contrôle négatif a une concentration de 0 U/L, mais peut être attribué à une valeur de 0,1 U/L pour faciliter le traitement informatique des données.

12.5. Sensibilité

La limite de détection est définie comme étant la plus petite concentration mesurable. Elle est calculée comme étant la concentration correspondant à la valeur du sérum négatif +2 écart types. Elle a été évaluée à 0,3 U/L.

12.6. Interférence

La présence d'hémoglobine, de bilirubine et d'intralipides à des concentrations jusqu'à 0,5 mg/mL, 0,2 mg/ml et 1000mg/dL n'a pas d'effet sur les résultats du dosage.

SCHEMA OPERATOIRE

Tubes	Tampon d'incubation μ l	Calibrateur contrôles échantillons μ l	Incuber 2 heures à 20-25°C sous agitation continue (200 rpm)	Solution de lavage ml	Aspirer X2	Traceur μ l	Incuber 60 min à 20-25°C sous agitation continue (200 rpm)	Solution de lavage ml	Aspirer X2	Compter	
T	/	/		/		100		100			/
Contrôle négatif, calibrateurs 1-4	50	100		1X2		100		1X2			
Contrôle positif, échantillons	50	100		1X2		100		1X2			