

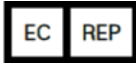
Coffret ELISA pour le dosage des auto-anticorps anti-transporteur de zinc 8 (ZnT8) – Notice d'utilisation**RSR Limited**

Parc Ty Glas, Llanishen, Cardiff

CF14 5DU Royaume-Uni

Tél. : +44 29 2068 9299

Fax : +44 29 2075 7770

Courrier électronique : info@rsrltd.comSite Internet : www.rsrltd.comAdvena Ltd. Tower Business Centre, 2nd Flr.,
Tower Street. Swatar. BKR 4013 Malta.**INDICATION**

Le coffret ELISA pour le dosage des auto-anticorps anti-transporteur de zinc 8 (ZnT8) de RSR est exclusivement destiné aux professionnels effectuant la détermination quantitative des auto-anticorps anti-ZnT8 dans le sérum humain. Les auto-anticorps dirigés contre les antigènes des cellules pancréatiques bêta constituent des marqueurs sérologiques importants du diabète sucré de type 1 (DS1). Les antigènes reconnus par ces anticorps comprennent l'insuline, l'acide glutamique décarboxylase (isoforme GAD₆₅ kDa), l'antigène des cellules des îlots de Langerhans IA-2 ou ICA-512 et le transporteur de zinc 8 (ZnT8). Les auto-anticorps anti-ZnT8 sont dirigés principalement contre le domaine C terminal du ZnT8 (résidus 268 – 369). Un polymorphisme génétique dans la population humaine du codon correspondant au 325^e acide aminé conduit à l'expression de trois variants protéiques : arginine (R) 325, tryptophane (W) 325 et très rarement glutamine (Q) 325. Les auto-anticorps anti-ZnT8 peuvent être spécifiques des variants R 325 ou W 325, ou peuvent être non spécifiques du résidu 325. Les sérums qui réagissent uniquement avec l'allèle Q sont extrêmement rares. Le coffret ZnT8 Ab ELISA de RSR est en mesure de détecter et de quantifier des auto-anticorps spécifiques des variants R 325 ou de W 325, ou non spécifiques des variants du résidu 325.

RÉFÉRENCES

J. M. Wenzlau et al

"The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes."

PNAS 2007 104 :17040-17045

P. Achenbach et al

"Autoantibodies to zinc transporter 8 and SLC30A8 genotype stratify type 1 diabetes risk."

Diabetologia 2009 52 :1881-1888

J. M. Wenzlau et al

"Kinetics of the post-onset decline in zinc transporter 8 autoantibodies in type 1 diabetic human subjects."

J Clin Endocrinol Metab 2010 95 :4712 - 4719

L. Petruzelkova et al

"The dynamic changes of zinc transporter 8 autoantibodies in Czech children for the onset of type 1 diabetes mellitus."

Diabet Med 2014 31 :165 - 71

G. Dunseath et al

"Bridging-type enzyme-linked immunoassay for zinc transporter 8 autoantibody measurements in adult patients with diabetes mellitus." Clin. Chim. Acta. 2015 447:90 - 95

BREVETS

Les brevets suivants s'appliquent :

Brevets européens EP 1 563 071 B1 et EP 2 118 309 B1, brevets américains 7 851 164 B2 et 9 023 984 B2, brevets chinois CN 1738900 B et ZL 200780051859.3, brevet indien 279741 et brevets japonais 4498144 et 5694668.

PRINCIPE DU DOSAGE












Dans le coffret ELISA ZnT8 Ab de RSR, les auto-anticorps anti-ZnT8 présents dans les sérums des patients à examiner, les calibrateurs, et les contrôles interagissent avec le ZnT8 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-ZnT8 liés aux puits revêtus de ZnT8. Du ZnT8-biotine est ajouté pendant une deuxième étape d'incubation au cours de laquelle, grâce à la capacité des auto-anticorps anti-ZnT8 présents dans les échantillons d'agir de manière divalente (ou polyvalente), un pont est formé entre le ZnT8 lié aux puits et le ZnT8-biotine. Le ZnT8-biotine non lié est ensuite éliminé au cours d'une étape de lavage et la quantité de ZnT8-biotine lié est déterminée (au cours d'une troisième étape d'incubation) 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 405 nm et 450 nm est ensuite lue en utilisant un lecteur de plaques ELISA. Une absorbance plus élevée indique la présence d'auto-anticorps anti-ZnT8 dans l'échantillon à examiner. La lecture à 405 nm permet la quantification de valeurs élevées d'absorbance et doit être utilisée lorsque la DO à 450 est supérieure à 3.0. 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 15 et 2 000 U/mL (unités arbitraires de RSR).

CONSERVATION ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS DE SÉRUM À EXAMINER

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. 50 µl sont suffisants pour un dosage (doubles déterminations de 25 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. Le plasma prélevé sur citrate et héparine peut être utilisé dans le dosage. Des études au cours desquelles des échantillons de plasma prélevés sur EDTA ont été chargés avec des sérums positifs aux auto-anticorps anti-ZnT8 ont montré une diminution des signaux par rapport à un sérum chargé du même donneur. Plus particulièrement, les valeurs de la DO₄₅₀ obtenues avec un plasma chargé, prélevé sur EDTA, ont atteint 33 % à 65 % des concentrations obtenues avec un sérum chargé ou 37 % à 64 % si elles sont exprimées en U/mL (19 échantillons avec des concentrations sériques chargées comprises entre 11 U/ml et 326 U/ml). Le cas échéant, amener les sérums à examiner à température ambiante et mélanger doucement pour assurer leur homogénéité. Centrifuger les sérums 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 UTILISÉS DANS LE MODE D'EMPLOI

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 et 100 µl.

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

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

Conserver les coffrets non ouverts et ses composants entre 2 et 8 °C.

A	Puits revêtus de ZnT8 12 barrettes détachables de 8 puits (96 puits au total) dans un cadre et scellées dans un sachet. Laisser reposer à la température ambiante (20-25°C) pendant au moins 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 avec le dessiccant fourni et le sceller avec une bande adhésive. Placer le sachet dans un sac en plastique autorefermable et le conserver entre 2 et 8 °C pendant une durée maximale de 1 mois.

B1-5	Calibrateurs 10, 20, 75, 500, 2 000 U/mL (les unités ont été définies de manière arbitraire par 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	ZnT8-biotine 3 flacons Lyophilisé
	Reconstituer chaque flacon avec 5,5 mL de tampon de reconstitution pour ZnT8-biotine (F). Lorsque plusieurs flacons sont utilisés, regrouper les flacons et mélanger doucement avant utilisation. Conserver entre 2 et 8 °C pendant une durée maximale de 3 jours après la reconstitution.
F	Tampon de reconstitution pour ZnT8-biotine 2 × 15 mL, coloration rouge Prêt à l'emploi
G	Streptavidine peroxydase (SA-POD) 0,7 mL Concentrée
	Diluer au 20 ^e avec le diluant pour SA-POD (H) avant utilisation. 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
I	Substrat peroxydase (TMB) 15 mL Prêt à l'emploi
J	Solution de lavage concentrée 125 mL Concentrée
	Diluer au 10 ^e avec de l'eau purifiée avant utilisation. Par exemple, 100 mL (J) + 900 mL d'eau purifiée. Conserver entre 2 et 8 °C jusqu'à la date de péremption du coffret.
K	Solution d'arrêt 12 mL Prête à l'emploi

PROCÉDURE DU DOSAGE

Amener tous les réactifs à température ambiante (20 à 25 °C) le jour de leur utilisation, à l'exception du ZnT8-biotine et du tampon de reconstitution du ZnT8-biotine. Une pipette de type Eppendorf à répétition est recommandée pour les étapes 4, 7, 10 et 11.

1er JOUR	1.	Pipetter 25 µl de calibrateurs (B1-5), de contrôles (C1-2 et D) et de sérums de patients dans les puits respectifs, en double, en laissant deux puits vides pour les blancs (voir étape 12).
	2.	Couvrir le cadre, agiter pendant environ 5 secondes sur un agitateur de plaques et mettre en incubation pendant une nuit, c'est-à-dire 16 à 20 heures, entre 2 et 8 °C sans agitation.
2e JOUR	3.	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.
	4.	Pipetter 100 µL de ZnT8-biotine reconstitué froid (E) dans chaque puits (à l'exception des blancs). Éviter d'éclabousser l'environnement des puits en ajoutant le produit.
	5.	Couvrir le cadre, et mettre en incubation entre 2 et 8 °C pendant une heure sans agitation
	6.	Répéter l'étape de lavage 3.
	7.	Pipetter 100 µl de SA-POD diluée (G) dans chaque puits (à l'exception des blancs).
	8.	Couvrir le cadre et mettre en incubation à température ambiante pendant 20 minutes sur un agitateur de plaques ELISA (500 oscillations par minute).
	9.	Répéter l'étape de lavage 3. Si un lavage manuel est effectué, utiliser une étape de lavage supplémentaire avec de l'eau purifiée (pour retirer toute trace de mousse) avant l'étape consistant à sécher les puits renversés en les tapotant.
	10.	Pipetter 100 µL de TMB (I) dans chaque puits (y compris les blancs) et mettre en incubation dans l'obscurité à température ambiante pendant 20 minutes sans agiter.
	11.	Pipetter 100 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.
	12.	Dans un délai de 30 minutes, lire l'absorbance de chaque puits à 405 nm, puis à 450 nm, en utilisant un lecteur de plaques ELISA, en la comparant avec celle des puits des blancs contenant 100 µL de TMB (I) et 100 µL de solution d'arrêt (K) uniquement .

ANALYSE DES RÉSULTATS

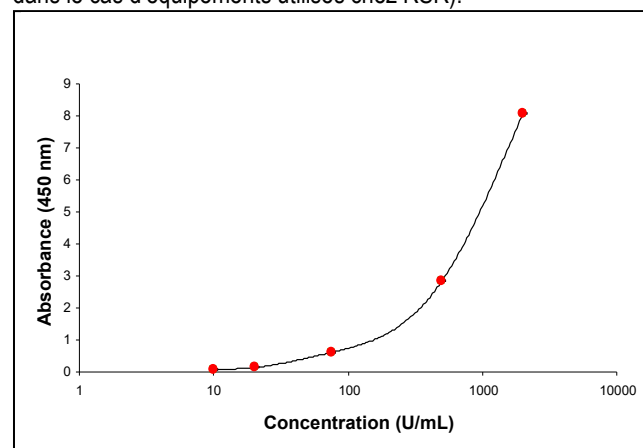
Une courbe d'étalonnage peut être établie avec la concentration des calibrateurs sur l'axe des abscisses (x) (échelle logarithmique) et l'absorbance des calibrateurs sur l'axe des ordonnées (y) (échelle linéaire). Les concentrations des auto-anticorps anti-ZnT8 dans les sérums des patients peuvent ensuite 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. Le contrôle négatif (D) a une concentration de 0 U/mL, mais il est possible de lui assigner une valeur de 1 U/mL pour faciliter le traitement informatique des données. Les échantillons présentant des

concentrations élevées d'anticorps anti-ZnT8 peuvent être dilués dans le contrôle négatif du coffret (D). Par exemple, 15 µL d'échantillon plus 135 µL de contrôle négatif 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.

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

Calibrateur	A450 nm	Conc. u/ml	A405 nm	Conc. u/ml
B1	0,068	10	0,023	10
B2	0,138	20	0,043	20
B3	0,610	75	0,184	75
B4	2,838	500	0,853	500
B5	8,089	2000	2,379	2000
Contrôle négatif D	0,015	0	0,008	0
Contrôle positif C1	0,402	46	0,121	46
Contrôle positif C2	1,221	200	0,367	196

Pour les lectures d'absorbance à 450 nm supérieures à 3,0, la lecture d'absorbance à 405 nm doit être convertie 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

Seuil	U/mL
Négatif	< 15 U/mL
Positif	≥ 15 U/mL

Ce seuil a été validé chez RSR. Cependant, il est recommandé que chaque laboratoire établisse ses propres intervalles de référence normaux et pathologiques pour les concentrations d'auto-anticorps anti-ZnT8. Chaque laboratoire doit aussi inclure son propre ensemble d'échantillons de contrôle dans le dosage.

ÉVALUATION CLINIQUE

Spécificité et sensibilité cliniques

Dans l'étude IASP de 2016, le coffret ELISA ZnT8 Ab de RSR a atteint une spécificité de 99 % (n = 90) et une sensibilité de 72 % (n = 50).

Le dosage sur sérum de 297 donneurs de sang sains a donné une valeur moyenne de 1,9 ± 3,84 u/mL. 3 échantillons (1 %) étaient au-dessus du seuil, avec des valeurs de 45, 41 et 19 u/ml.

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 1,2 U/mL quand le contrôle négatif avait une valeur de 1u/mL.

Précision interdosage

Échantillon	Moyenne U/mL (n = 20)	CV (%)
A	102	9,3
B	64	7,5
C	26,6	8,7

Précision intradosage

Échantillon	Moyenne U/mL (n = 25)	CV (%)
1	160	6,2
2	63	6,2
3	24,5	3,5

Précision clinique

Les sérums contenant du facteur rhumatoïde (n = 26) et des auto-anticorps dirigés contre la thyroglobuline (n = 20), la thyroïde peroxydase (n = 24), l'aquaporine-4 (n = 3) et le récepteur de l'acétylcholine (n = 9) ont été négatifs aux auto-anticorps anti-ZnT8. Quatre pour cent (4 %) (n = 24) de sérums positifs aux anticorps anti-récepteur de la TSH, et 9 % (n = 23) des sérums positifs aux auto-anticorps anti-21-hydroxylase ont été positifs aux auto-anticorps anti-ZnT8 avec le coffret ZnT8 Ab ELISA de RSR.

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



Substrat peroxydase (TMB)

Mention d'avertissement : Danger

Mention(s) de danger

H360 : Peut nuire à la fertilité ou au fœtus

Conseil(s) de prudence

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

P308 + P313 : EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée : consulter un médecin

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'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

Amener tous les réactifs et les échantillons à température ambiante (20 à 25 °C) le jour de leur utilisation, à l'exception du ZnT8-biotine et du tampon de reconstitution du ZnT8-biotine.		
1 ^{er} JOUR	Pipetter :	25 µl des calibrateurs, des contrôles et des sérums de patients dans les puits (à l'exception des blancs) et agiter pendant 5 secondes
	Mettre en incubation :	Une nuit (16 à 20 heures) entre 2 et 8 °C, sans agitation
2 ^e JOUR	Aspirer / décanter :	Plaque
	Laver :	La plaque à trois reprises et tapoter sur un matériel absorbant pour la sécher ¹
	Pipetter :	100 µl de ZnT8-biotine froid (reconstitué) dans chaque puits (à l'exception des blancs)
	Mettre en incubation :	Une heure entre 2 et 8 °C, sans agitation
	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 des blancs)
	Mettre en incubation :	20 minutes à température ambiante (20 à 25 °C) sur un agitateur de plaques ELISA à 500 oscillations par minute
	Aspirer / décanter :	Plaque
	Laver :	La plaque à trois reprises, rincer à l'eau purifiée et tapoter sur un matériel absorbant pour la sécher ¹
Pipetter :	100 µl de TMB dans chaque puits (y compris les blancs)	

	Mettre en incubation :	20 minutes à température ambiante (20 à 25 °C) dans l'obscurité
	Pipetter :	100 µl de solution d'arrêt dans chaque puits (y compris les blancs) et agiter pendant 5 secondes
Lire l'absorbance à 405 nm, puis à 450 nm, dans un délai de 30 minutes après l'addition de la solution d'arrêt.		
¹ Il n'est pas nécessaire de sécher les plaques en les tapotant après le lavage si un laveur de plaques automatique est utilisé. L'étape du lavage à l'eau purifiée peut aussi être supprimée si un laveur automatique est utilisé.		