

MOUSE ADIPONECTIN RIA
125 TUBES (Cat. N° MADP-60HK)

I. INTRODUCTION

L'adiponectine fait partie de la famille des adipocytokines et est également connue sous diverses appellations ACRP-30 (adipocyte complement related protein 30), Adipo Q et APM1 (adipose tissue most abundant gene transcript-1). L'adiponectine est la principale hormone secrétée par le tissu adipeux et circule dans le sang à des taux de l'ordre du microgramme par ml. Elle possède une homologie structurale avec le collagène de type VIII et avec le domaine globulaire de la protéine Cq1.

A l'inverse de la majorité des protéines secrétées par le tissu adipeux dont la concentration augmente chez les obèses, la production d'adiponectine est diminuée ou normale lorsque le niveau d'adiposité s'accroît. Plus curieux encore, l'adiponectine semble jouer un rôle protecteur vis-à-vis des facteurs de risque liés à l'obésité. En cela également, elle se distingue des autres adipocytokines qui ont-elles un effet aggravant sur ces facteurs de risque.

L'adiponectine est un important régulateur de la sensibilité de l'insuline, ce qui en fait un agent thérapeutique potentiel pour le traitement du diabète et de l'obésité.

Les taux circulants d'adiponectine paraissent constituer un excellent marqueur biologique d'une insulino-résistance accrue chez les obèses et les diabétiques.

Cette trousse est destinée à la recherche.

II. PRINCIPE DU DOSAGE

Dans un dosage radioimmunologique, une quantité fixe d'antigène marqué est incubée avec une dilution constante de l'antisérum calculée de telle sorte que le nombre de sites de liaison de l'antigène est limité, par exemple, seuls 50% de traceur seront liés à l'anticorps. Si de l'antigène non marqué est ajouté dans le milieu, il y a compétition entre le traceur marqué et l'antigène non marqué pour un nombre limité et constant de sites de liaison sur l'anticorps. De plus, la quantité de traceur lié à l'anticorps diminue quand la concentration de l'antigène non marqué augmente. On peut effectuer la mesure après avoir effectué la séparation de l'anticorps lié du traceur libre et après avoir compté la fraction libre, la fraction liée ou les deux.

On prépare une courbe standard à l'aide de quantités croissantes d'antigène non marqué et on calcule à partir de cette courbe la concentration des échantillons inconnus. On a ainsi les quatre conditions de base d'un dosage radioimmunologique : un antisérum spécifique de l'antigène à doser, l'antigène marqué par une substance radioactive, une méthode de séparation de l'antigène sous forme liée à l'antisérum, de l'antigène sous forme libre, et finalement l'instrument qui permet de compter la radioactivité.

Le dosage de l'Adiponectine de souris de Millipore utilise de l'Adiponectine murine marquée à l'iode 125 et un antisérum de lapin anti-Adiponectine (multi-espèces), afin de mesurer le taux d'Adiponectine dans le sérum, le plasma et les milieux de culture au moyen d'une technique de dosage par double anticorps/PEG. Les standards d'Adiponectine sont préparés à partir d'Adiponectine de souris recombinante et peuvent être utilisés pour le dosage des échantillons de sérum / plasma de souris ou de rat.

III. RÉACTIFS FOURNIS

Chaque trousse contient le matériel suffisant pour traiter 125 tubes :

1. Réactif A – Tampon de dosage 10x

1 flacon de 50 ml contenant après dilution du tampon phosphate 10mM, pH 7,6 avec de la BSA à 0,1% et de l'azoture de sodium à 0,08%.

Préparation : diluer le contenu du flacon avec 450 ml d'eau distillée ou désionisée.

2. Réactif B - Solution d'antisérum

1 flacon contenant 13 ml d'antisérum de lapin anti-adiponectine. Prêt à l'emploi.

3. Réactif C - ¹²⁵I Adiponectine

1 flacon contenant 13,5 ml après reconstitution d'une solution d'adiponectine murine marquée à l'iode 125 (activité spécifique 67,7 µCi/µg). Sous forme lyophilisée. Chaque flacon a une activité < 111 kBq (3 µCi).

Préparation : reconstituer en ajoutant 13,5 ml de tampon de dosage 1x. Laisser reposer à température ambiante pendant 30 minutes en agitant doucement le flacon à intervalles réguliers.

Remarque : au fur et à mesure que le traceur approche de sa date d'expiration, le pourcentage de liaison maximal (B₀) décroît. Ce phénomène n'altère pas les performances de la trousse puisque les valeurs des échantillons de contrôle restent dans les limites acceptables pendant toute la durée de vie du traceur.

4. Réactif D - Standard

1 flacon contenant 1 ml après reconstitution d'une solution d'adiponectine recombinante purifiée à 100 ng/ml :

Préparation : reconstituer avec 1 ml d'eau distillée ou désionisée.

5. Réactifs E - Contrôles 1 et 2

2 flacons contenant chacun après reconstitution 1 ml d'adiponectine recombinante purifiée. Sous forme lyophilisée.

Préparation : reconstituer avec 1 ml d'eau distillée ou désionisée.

6. Réactif F – Sérum de lapin

1 flacon de 2 ml contenant 30% de sérum normal de lapin. Prêt à l'emploi.

7. Réactif G - Réactif précipitant

1 flacon contenant 130 ml d'anticorps de chèvre anti-lapin en solution dans du tampon phosphate 0,05 M, qui contient du PEG à 3%, du Triton X-100 à 0,05%, de l'EDTA à 0,025 M et de l'azoture de sodium à 0,08%. Prêt à l'emploi, réfrigérer à 4 °C avant utilisation.

IV. CONSERVATION ET STABILITE DES REACTIFS

Conserver tous les réactifs à 2-8 °C pour une conservation à court terme. Pour une conservation prolongée (> à 2 semaines), conserver à -20 °C. Après reconstitution, les standards qui n'ont pas été utilisés doivent être stockés à -20 °C. Eviter les congélations/décongélations répétées (>5 fois). Se référer à la date d'expiration figurant sur l'étiquette pour connaître la date d'expiration pour une conservation à -20 °C. Ne pas mélanger les réactifs qui proviennent de différentes trousse, sauf s'ils proviennent du même lot.

V. PRECAUTIONS D'UTILISATION

A. Règles de base de radioprotection

1. Le matériel radioactif de cette trousse doit être manipulé en respectant les règles de sécurité concernant l'emploi des radionucléides en source non scellées.

2. Toute manipulation de substances radioactives doit s'effectuer dans une zone contrôlée, conformément à la réglementation en vigueur.

3. Ne pas pipeter les solutions radioactives à la bouche.

4. Ne pas manger, boire ou fumer en zone contrôlée.

5. Eviter tout contact direct avec les produits radioactif. Utiliser des blouses et des gants de protection.

6. Tout déchet radioactif solide ou liquide sera éliminé selon la réglementation en vigueur.

7. Dans le cas de contamination ou de perte de substance radioactive, observer les procédures établies.

B. Autres précautions

1. Les réactifs de cette trousse sont destinés exclusivement à l'analyse in vitro et ne doivent en aucun cas être administrés à l'homme ou à l'animal.

2. ATTENTION : Tous les réactifs de cette trousse contiennent de l'azoture de sodium en tant qu'agent conservateur à une concentration de 0,08%. Bien qu'il s'agisse d'une concentration très faible, il faut noter que l'azoture de sodium peut réagir avec le plomb et le cuivre des tuyauteries pour former des composés explosifs. Lors de l'élimination des réactifs dans l'évier, faire couler un grand volume d'eau pour éviter la formation d'azotures métalliques. Éviter toute contamination de la peau et des muqueuses.

VI. MATERIEL NECESSAIRE MAIS NON FOURNI

1. Tubes en verre borosilicaté, à usage unique, 12 x 75 mm (il est possible d'utiliser des tubes de polypropylène ou de polystyrène si l'utilisateur estime que le précipité est suffisamment stable)

2. Tubes en verre borosilicaté 12 x 100 mm pour les dilutions des échantillons et des standards

3. Pipettes de précision et pointes de 10, 20, et 100 µl

4. Distributeur automatique : 100 µl et 1,0 ml

5. Papier absorbant

6. Vortex

7. Réfrigérateur

8. Centrifugeuse réfrigérée capable de développer 2000 à 3000 xg

9. Compteur à scintillations gamma

VII. PRELEVEMENT ET CONSERVATION DES ECHANTILLONS

On utilisera un minimum de 5 µl de sérum ou de plasma par dosage. Pour les milieux de culture, on utilisera des volumes de 50 à 100 µl.

On conservera les échantillons à 4°C, si on doit les doser dans les 24 heures. Pour un stockage prolongé, il est préférable de les stocker à -20°C. Éviter les congélations/décongélations répétées (> 5 cycles). Éviter d'utiliser des échantillons hémolysés ou lipidiques.

VIII. DOSAGE

Il est important de suivre ce protocole et d'être précis dans les étapes de pipetage.

A- Diluer le tampon de dosage 10x avec ml d'eau distillée ou désionisée pour obtenir le tampon de dosage x à la concentration de travail.

B- Préparation des standards d'adiponectine de souris

1- Ouvrir avec précaution le flacon de standard lyophilisé. A l'aide d'une pipette Eppendorf, reconstituer le standard d'adiponectine de souris avec 1 ml d'eau distillée ou désionisée pour obtenir une concentration de 100 ng/ml. Bien mélanger.

2- Etiqueter 7 tubes en verre de la façon suivante : 50 – 25 - 12,5 – 6,25 – 3,125 – 1,56 – 0,78ng/ml. Ajouter 0,5 ml de tampon de dosage à chacun des 7 tubes. Préparer des dilutions en série de la façon suivante :

- ajouter 0,5 ml du standard 100 ng/ml au tube 50 ng/ml. Mélanger soigneusement et transférer 0,5 ml du standard 50 ng/ml au tube 25 ng/ml
- mélanger soigneusement et transférer 0,5 ml du standard 25 ng/ml au tube 12,5ng/ml
- mélanger soigneusement et transférer 0,5 ml du standard 12,5 ng/ml au tube 6,25ng/ml
- mélanger soigneusement et transférer 0,5 ml du standard 6,25 ng/ml au tube 3,125ng/ml
- mélanger soigneusement et transférer 0,5 ml du standard 3,125 ng/ml au tube 1,56ng/ml
- mélanger soigneusement et transférer 0,5 ml du standard 1,56 ng/ml au tube 0,78ng/ml
- mélanger soigneusement

Remarque : ne pas utiliser un distributeur. Changer de pointe pour chaque dilution. Mouiller la pointe avec le standard avant de pipeter. Les solutions de standard non utilisées doivent être stockées à -20°C. Eviter les congélations / décongélations répétées.

Concentration du standard (ng/ml)	Volume d'eau désionisée à ajouter	Volume de standard à ajouter
100	1 ml	0 ml

Concentration du standard (ng/ml)	Volume de tampon de dosage à ajouter	Volume de standard à ajouter
50	0,5 ml	0,5 ml de 100 ng/ml
25	0,5 ml	0,5 ml de 50 ng/ml
12,5	0,5 ml	0,5 ml de 25 ng/ml
6,25	0,5 ml	0,5 ml de 12,5 ng/ml
3,125	0,5 ml	0,5 ml de 6,25 ng/ml
1,56	0,5 ml	0,5 ml de 3,125 ng/ml
0,78	0,5 ml	0,5 ml de 1,56 ng/ml

B- Préparation des contrôles 1 et 2

Ouvrir avec précaution les flacons de contrôle. A l'aide d'une pipette Eppendorf, reconstituer les contrôles 1 et 2 avec 1 ml d'eau distillée ou désionisée. Bien mélanger.

C- Préparation des échantillons

1-Sérum et plasma de souris ou de rat

Les taux circulants d'adiponectine dans le sérum sont de l'ordre du µg/ml alors que la plage de mesure du dosage va de 1 à 100 ng/ml. Il est conseillé de diluer les échantillons de sérum ou de plasma 1/1000. Si les résultats obtenus sont en dehors de la courbe standard, il faudra répéter le dosage à une dilution plus appropriée.

Exemple : pipeter 10 µl de sérum ou de plasma dans 4990 µl de tampon de dosage pour obtenir une dilution 1/500.

Exemple : pipeter 5 µl de sérum ou de plasma dans 4995 µl de tampon de dosage pour

obtenir une dilution 1/1000.

Remarque : lors de l'analyse des résultats, multiplier la valeur obtenue par le facteur de dilution approprié.

2-Milieus de culture

Il est recommandé d'utiliser 50 à 100 µl de milieu de culture par tube. Toutefois, comme les taux d'adiponectine sont très variables selon les conditions de culture, il est recommandé de faire un dosage préliminaire sur quelques échantillons pour déterminer le volume d'échantillon le plus adéquat ou une éventuelle dilution. Utiliser du milieu de culture pur pour mesurer un éventuel bruit de fond.

D- Mise en place du dosage – Jour 1:

1. Pipeter 300 µl de tampon de dosage dans les tubes 3 et 4 correspondant à la liaison non spécifique (LNS) et 200 µl dans les tubes 5 et 6 correspondant au B₀ et 100 µl dans tous les autres tubes.
2. Pipeter 100 µl de standard et de contrôles en double (Voir le schéma du dosage).
3. Pipeter 100 µl d'échantillon dilué en double. Se reporter à la section calcul des résultats pour tenir compte des facteurs de dilution.
4. Pipeter 100 µl d'adiponectine marquée à l'iode 125 dans tous les tubes.
5. Ajouter 100 µl d'anticorps anti-adiponectine dans tous les tubes à l'exception des tubes correspondant à l'activité totale (1 et 2) et à la LNS (3 et 4).
6. Mélanger au vortex, couvrir et laisser incuber pendant 20 à 24 heures à température ambiante.

Le jour suivant :

7. Ajouter 10 µl de sérum de lapin dans tous les tubes à l'exception de ceux qui correspondent à l'activité totale.
8. Ajouter 1,0 ml de réactif précipitant froid (4 °C) à tous les tubes à l'exception de ceux qui correspondent à l'activité totale.
9. Mélanger au vortex et laisser incuber 20 minutes à 4 °C.
10. Centrifuger à 4 °C tous les tubes, à l'exception de ceux qui correspondent à l'activité totale pendant 20 minutes à 2000 - 3000 x g. Remarque : Si on utilise une vitesse inférieure à 2000 x g, ou si on a observé des précipités de mauvaise qualité au cours des dosages précédents, on augmentera le temps de centrifugation afin d'obtenir des précipités de bonne qualité (par exemple 40 minutes).

Conversion des tr/min.en xg

$$xg = (1,12 \times 10^{-5}) (r) (\text{tr/min.})^2$$

r = distance radiale en cm (depuis l'axe de rotation jusqu'au fond des tubes)

tr/min. = vitesse du rotor

11. Décanter immédiatement le surnageant de tous les tubes à l'exception des tubes correspondant à l'activité totale (tubes 1 et 2), laisser égoutter pendant au moins 15 à 60 secondes, et retirer l'excès de liquide au bord des tubes. Remarque : Ne retourner les tubes qu'une seule fois. Les culots sont fragiles et pourraient glisser.
12. Compter tous les tubes dans un compteur à scintillations gamma pendant 1 minute. Calculer la concentration en adiponectine de souris des échantillons en utilisant une procédure de calcul automatique.

Schéma de dosage de l'adiponectine

Jour 1						Jour 2			
Préparation	Étape 1	Étapes 2 et 3	Étape 4	Étape 5	Étape 6	Étape 7	Étape 8	Étape 9	Étapes 10-12
Numéroté les tubes	Ajouter Tampon de dosage	Ajouter Standard / Contrôle / Echantillon	Ajouter traceur	Ajouter anticorps	Vortexer, couvrir, et incuber 20-24 heures à température ambiante			Vortexer, couvrir, et incuber 20 min. à 4°C	Centrifuger 20 min. à 4°C, décanter et compter
1,2	-	-	100 µl	-		-			
3,4	300 µl	-	100 µl	-		10 µl	1,0 ml		
5,6	200 µl	-	100 µl	100 µl		10 µl	1,0 ml		
7,8	100 µl	100 µl de 0,78 ng/ml	100 µl	100 µl		10 µl	1,0 ml		
9,10	100 µl	100 µl de 1,56 ng/ml	100 µl	100 µl		10 µl	1,0 ml		
11,12	100 µl	100 µl de 3,125 ng/ml	100 µl	100 µl		10 µl	1,0 ml		
13,14	100 µl	100 µl de 6,25 ng/ml	100 µl	100 µl		10 µl	1,0 ml		
15,16	100 µl	100 µl de 12,5 ng/ml	100 µl	100 µl		10 µl	1,0 ml		
17,18	100 µl	100 µl de 25 ng/ml	100 µl	100 µl		10 µl	1,0 ml		
19,20	100 µl	100 µl de 50 ng/ml	100 µl	100 µl		10 µl	1,0 ml		
21,22	100 µl	100 µl de 100 ng/ml	100 µl	100 µl		10 µl	1,0 ml		
23,24	100 µl	100 µl de C1	100 µl	100 µl		10 µl	1,0 ml		
25,26	100 µl	100 µl de C2	100 µl	100 µl		10 µl	1,0 ml		
27,n	100 µl	100 µl d'échantillon	100 µl	100 µl	10 µl	1,0 ml			

IX. CALCUL DES RÉSULTATS

A. Explication

Les calculs des taux d'adiponectine de souris peuvent être faits automatiquement par la plupart des compteurs gamma qui possèdent des capacités de traitement des données ou par un traitement indépendant des données par un logiciel disponible dans le commerce². Choisir un système à 4 paramètres ou un log/logit pour le traitement mathématique des données (**Remarque :** S'assurer que la LNS est bien soustraite de la moyenne des cpm obtenus pour chaque duplicate à l'exception de l'activité totale, avant de finaliser les calculs).

B. Calcul manuel

1. Calculer la moyenne des coups par minute (CPM) obtenus pour les tubes correspondant à l'AT (tubes 1 et 2), à la LNS (tubes 3 et 4), Maximum de liaison (tubes 5 et 6), standards, contrôles et échantillons de malade.
2. Soustraire la moyenne des coups correspondant aux tubes LNS de la moyenne des coups obtenus pour les autres tubes, (à l'exception d' AT), pour obtenir la moyenne des coups corrigée.
3. Calculer le pourcentage maximum de liaison en divisant les CPM corrigés correspondant au standard zéro (B_0) par les CPM moyens correspondant à l'activité totale (AT). Ce pourcentage devrait être compris entre 25 et 55%.
4. Calculer le pourcentage de liaison ($B/B_0 \times 100$) correspondant à chaque standard et à chaque échantillon, en divisant la moyenne des coups corrigés de chacun des standards et de chacun des échantillons par la moyenne corrigée des coups correspondant au maximum de liaison (standard zéro).
5. Tracer la courbe standard en reportant le pourcentage de B/B_0 correspondant à chaque standard en ordonnée, et le logarithme de la concentration de chacun des standards en abscisse (l'utilisation d'un papier log-log permet d'obtenir une courbe presque droite).
6. Construire la courbe standard en joignant les points obtenus.

7. Calculer la concentration en ng/ml d'adiponectine de souris des échantillons inconnus et des contrôles par interpolation avec la courbe standard.

8. Lorsque l'on dose des milieux de culture le taux d'adiponectine dans le milieu de culture pur doit être soustrait de la concentration obtenue pour chaque échantillon afin d'obtenir le taux réel en adiponectine.

9. Une correction mathématique sera faite pour tenir compte du facteur de dilution dans le cas d'échantillons de sérum ou de plasma.

X. INTERPRÉTATION – CRITÈRES D'ACCEPTATION

1. Il faudra éliminer le dosage si l'un des 2 contrôles est en dehors des 2 déviations standards.

2. Si les CV observés entre les duplicates d'un même échantillon sont supérieurs à 10%, il faudra redoser l'échantillon.

3. La limite de sensibilité du dosage de l'adiponectine de souris est égale à 1 ng/ml (pour un échantillon de 100 µl).

4. La limite de linéarité du dosage de l'adiponectine est de 100 ng/ml (pour un échantillon de 100 µl). Tout résultat supérieur à 100 ng/ml devra être redosé après dilution à l'aide du tampon de dosage.

XI. CARACTÉRISTIQUES DU DOSAGE

A. Sensibilité

La plus petite quantité d'adiponectine de souris qui puisse être détectée dans ce dosage est égale à 1ng/ml quand on utilise un prélèvement de 100 µl.

B. Caractéristiques de la courbe standard

Les paramètres suivants sont indiqués sous forme de moyenne \pm 1 écart type.

$$ED_{80} = 1,0 \pm 0,17 \text{ ng/ml}$$

$$ED_{50} = 3,7 \pm 0,69 \text{ ng/ml}$$

$$ED_{20} = 14,4 \pm 3,17 \text{ ng/ml}$$

C. Spécificité

La spécificité permet de connaître la capacité du test à mesurer l'analyte de façon sélective en présence d'autres composants présents dans la matrice de l'échantillon.

Adiponectine humaine	20%
C1q humain	<0,01%
Adiponectine de rat	La spécificité exacte est inconnue ; toutefois, lorsque des plasmas de rat sont dilués en série et dosés avec cette trousse, les valeurs obtenues sont parallèles à celles de la courbe standard.

D. Précision

Variation Inter et Intra - essai :

Echantillon (dilué 1/1000)	Moyenne ($\mu\text{g/ml}$)	Répétabilité %	Reproductibilité %
1	3	3,73	8,24
2	8	4,11	6,56
3	12	4,43	7,13

3 sérums murins de concentrations variables en adiponectine ont été dosés avec cette trousse. Le % de répétabilité a été calculé à partir de la moyenne d'un seul dosage en 6 réplicats. Le % de reproductibilité a été calculé à partir de la moyenne de 27 résultats obtenus dans 3 dosages distincts en 9 réplicats.

E. Test de surcharge

Sérum murin (dilué 1/1000)	Adiponectine de souris ajoutée (ng/ml)	Récupération (%)
1	1	108
	5	105
	20	114
	50	109
2	1	102
	5	110
	20	96
	50	97

2 échantillons de sérum murin ont été dilués au 1/1000 dans le tampon de dosage. Le jour du dosage, on a ajouté à chacun de ces échantillons dilués des concentrations connues en adiponectine. Chaque groupe d'échantillons a été dosé de manière à obtenir 6 résultats exploitables à partir de 3 dosages différents en duplicat.

F. Test de parallélisme

Des aliquots de plasma de souris contenant des concentrations en adiponectine différentes ont été analysés dans les volumes indiqués ci-dessous. Les facteurs de dilution 1/4000 – 1/2000 – 1/1000 – 1/666 et 1/500, représentant respectivement les volumes 25, 50, 100, 150 et 200 μ l ont été utilisés dans le calcul des concentrations observées.

Echantillon de sérum murin dilué 1/1000	Volume échantillon (μ l)	Concentration observée (ng/ml)	Concentration attendue (ng/ml)	Pourcentage de concentration attendue (%)
1	25 μ l	1,57	7,35	85
	50 μ l	3,22		88
	100 μ l	7,35		100
	150 μ l	11,58		105
	200 μ l	15,30		104
2	25 μ l	1,62	7,15	91
	50 μ l	3,83		107
	100 μ l	7,15		100
	150 μ l	11,70		109
	200 μ l	17,04		119
3	25 μ l	3,48	15,38	91
	50 μ l	6,93		90
	100 μ l	15,38		100
	150 μ l	22,45		97
	200 μ l	29,87		97
4	25 μ l	7,12	29,24	97
	50 μ l	16,13		110
	100 μ l	29,24		100
	150 μ l	45,15		103
	200 μ l	60,44		103
5	25 μ l	3,07	12,20	101
	50 μ l	6,52		107
	100 μ l	12,20		100
	150 μ l	18,87		103
	200 μ l	23,36		96

XIII. CONTROLE DE QUALITE

Les bonnes pratiques de laboratoire recommandent que des contrôles soient inclus dans chaque série de dosages afin d'en vérifier les performances. Deux sérums de contrôles sont inclus dans la trousse dans ce but. Il est nécessaire de doser ces contrôles ainsi que d'autres propres au laboratoire de façon régulière, afin d'établir des valeurs moyennes et des fourchettes de valeurs acceptables. Les valeurs attendues pour les contrôles de la trousse figurent sur une carte incluse dans chaque coffret. La reproductibilité des paramètres de la courbe standard et des valeurs des contrôles doit se situer dans un intervalle de valeurs défini par le laboratoire.

1. Quand les 2 contrôles sont dans la fourchette des ± 2 DS : Dosage OK
2. L'un des contrôles est en dehors de la fourchette :
Vérifier les points suivants :
 - a) Erreur de calcul.
 - b) Duplicates des standards et des contrôles
 - c) Vérification des solutions de réactifs
 - d) Vérification du compteur gamma

XIV. BIBLIOGRAPHIE

1. Thorell J.I. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 31:187, 1973.
2. Feldman H. and Rodbard D. « Mathematical Theory of Radioimmunoassay », in W.D. Odell and Doughaday, W.H. (Ed), *Principles of Competitive Protein-Binding Assays*. Philadelphia : J.B : Leppincott Company ; pp 158-203, 1971.
3. Westgard, J.O., et al. A multi-rule Shewart chart for quality control in clinical chemistry. *Clin. Chem.* 27 :493-501, 1981.

Fabriqué par :
Millipore
6 Research Park Drive
St Charles, Missouri
63304 USA

Distribué en France par :
Labodia France
266 avenue Daumesnil
75012 Paris