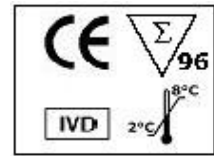




We Apply Science



IFU – Mode d'emploi

GPM02-96/p. 1 of 4

BlueWell

β₂-Glycoprotein I IgM ELISA

Dosage immunoenzymatique quantitatif - 96 tests

Référence : **GPM02-96**

1. INDICATIONS D'UTILISATION

La trousse BlueWell β₂-Glycoprotein I IgM ELISA permet la détection quantitative des anticorps IgM dirigés contre la cardiolipine dans le serum humain.

2. PRINCIPE DU TEST

La trousse BlueWell β₂-Glycoprotein I IgM ELISA utilise une méthode immunoenzymatique en phase solide avec des barrettes à micropuits revêtus sécables et un système de détection peroxydase-TMB. Les micropuits sont revêtus d'antigènes hautement spécifiques.

Dans la procédure de dosage, les échantillons sériques sont dilués au 1/51 et mis en incubation dans les micropuits. Les anticorps humains, s'ils sont présents dans l'échantillon, se lient à l'antigène spécifique. Les anticorps non liés ou en excès sont éliminés par lavage. Ensuite, des anticorps de lapin anti-IgM humaines conjugués à de la peroxydase de raifort sont ajoutés dans les puits. Le conjugué enzymatique se lie aux complexes antigène-anticorps. Après un second lavage pour éliminer le conjugué en excès, la solution TMB / substrat) est ajoutée. L'activité enzymatique, si elle est présente, génère une réaction colorimétrique (bleue). De l'acide dilué est ajouté pour arrêter la réaction. Ensuite la couleur vire du bleu au jaune et peut être mesurée à 450 nm sur un lecteur de microplaques. L'absorbance (densité optique) est directement proportionnelle à la concentration d'anticorps IgM liés à la surface des micropuits.

3. CONTENU DE LA TROUSSE

3.1 Matériel fourni dans la trousse

A reconstituer: 20x Tampon de lavage	1 flacon, 50 ml – concentré 20 x (bleu) <i>Contient: Tris, Tween, Méthylisothiazolone (conservateur)</i>
Prêts à l'emploi: Diluant pour échantillon	1 flacon, 50 ml (jaune) <i>Contient: Tris, Tween, sérum albumine bovine, Méthylisothiazolone (conservateur)</i>
TMB/Substrat	1 flacon, 20 ml (incolore) <i>Contient: mélange stabilisé de 3,3',5,5' Tétraméthylbenzidine (TMB) et de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), avec Méthylisothiazolone (conservateur)</i>
Contrôle négatif	1 flacon, 1 ml (vert) <i>Contient: sérum humain (dilué), avec Méthylisothiazolone (conservateur)</i>
Etalons	6 flacons, 1 ml chacun; 0, 25, 50, 100, 200, 400 U/ml. (couleur fonçant avec la concentration) <i>Contient: sérum humain (dilué), avec Méthylisothiazolone (conservateur)</i>
Contrôle positif	1 flacon, 1 ml (bleu) <i>Contient: sérum humain (dilué), avec Méthylisothiazolone (conservateur)</i>
Conjugué	1 flacon, 20 ml (bleu) <i>Contient: immunoglobulines de lapin anti-IgM humaines / peroxydase du raifort, avec Méthylisothiazolone (conservateur)</i>
Solution d'arrêt	1 flacon, 20 ml (incolore) <i>Contient : acide sulfurique 2,5 %</i>
Barrettes	12 barrettes avec, chacune, 8 puits sécables <i>Revêtues de β₂-glycoprotéine I (purifiée, humaine)</i>
Support pour barrettes	1 plaque

3.2 Matériel nécessaire mais non fourni

- Lecteur de microplaque (avec filtre à 450 nm + filtre de référence optionnel à 650 nm)
- Récipient en verre et tubes de dosage pour les dilutions.
- Eau distillée.
- Pipettes de précision (10, 100, 200, 500, 1000 µl) ou multipipette.
- Laveur des microplaques (micropipette multicanaux ou système automatique).
- Papier absorbant.

4. CONSERVATION ET STABILITE DES REACTIFS

- Conserver tous les réactifs et les micropuits à 2-8°C .
- Une fois préparée (cf. 7.2), la solution de lavage est stable pendant 1 mois à 4°C.
- Les réactifs et les micropuits doivent être utilisés avant la date de péremption indiquée sur l'étiquette de chaque récipient.

5. PRECAUTIONS D'UTILISATION

5.1 Risques pour la santé

CETTE TROUSSE EST DESTINEE UNIQUEMENT AU DIAGNOSTIC IN VITRO.

Bien que ce produit n'est pas considéré comme particulièrement toxique ou dangereux dans les conditions normales d'utilisation, il faut prendre des précautions pour avoir le maximum de sécurité lors des manipulations.

- La trousse contient des composants pouvant présenter des risques. Eviter le contact avec les yeux et la peau, puisque les réactifs peuvent être irritants. Ne pas fumer, manger ou boire pendant les manipulations.
- Toutes les unités de sérum et de plasma utilisées pour la fabrication des composants de cette trousse ont été analysées et ont été trouvées négatives en Ag HBs, en anticorps anti-VHC et en anticorps anti-VIH-1/2. Toutefois, puisqu'il n'existe aucune méthode garantissant l'absence totale d'agents pathogènes, on doit considérer tout matériau d'origine humaine comme étant potentiellement infectieux. C'est pourquoi il faudra le manipuler avec précaution.

5.2 Autres précautions

- Ne pas mélanger ou remplacer les réactifs ou les micropuits provenant de lots différents. Cela peut provoquer des variations dans les résultats.
- Amener tous les réactifs à température (18-24°C), avant utilisation et suivre le schéma d'incubation conseillé pour une performance optimale du test.
- Distribuer toujours les réactifs avec des embouts propres pour éviter la contamination avec des substances exogènes.
- La solution de chromogène / substrat est sensible à la lumière. Protéger de la lumière pour éviter une augmentation des valeurs du blanc.

6. PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS, MANIPULATION ET CONSERVATION

- Le test doit être utilisé de préférence sur des échantillons sériques prélevés récemment.
- Ne pas utiliser des échantillons ictériques, lipémiques, hémolysés ou contaminés par des bactéries. Les sérums présentant des particules devraient être centrifugés à faible vitesse.
- Les échantillons de sang doivent être recueillis sur des tubes secs. Après séparation, les échantillons sériques peuvent être utilisés immédiatement, conservés à 2-8°C pendant deux ou trois jours ou congelés à -20°C pour des plus longues périodes.

7. PROCEDURE DE DOSAGE

7.1 Echantillons

- Diluer au **1/51** les échantillons sériques avec le diluant pour échantillons (prêt à l'emploi).
→ **ex. 500 µl** diluant + **10 µl** sérum. **Mélanger**.

7.2 Tampon de lavage

- Diluer au **1/20** le tampon de lavage concentré avec de l'eau distillée

Lavage manuel :

Préparer un volume final de **10 ml** pour **8 puits** ou **120 ml** pour **96 puits**.

→ **ex. 9,5 ml** eau + **0,5 ml** tampon. Mélanger.

Lavage automatisé :

Prendre en considération le volume nécessaire pour amorcer l'appareil et le volume « mort » de la pipette automatique.

7.3 Micropuits

- Calculer le nombre de puits nécessaires pour le dosage. Retirer les puits non utilisés du support, et les conserver dans le sac en plastique fourni, soigneusement scellé.

7.4 Procédure

- Amener tous les réactifs à température ambiante (18-24°C), avant utilisation.

- **Distribuer 100 µl** de chaque **sérum dilué** de patient dans le micropuits approprié.
- **Distribuer 100 µl d'étalons ou des contrôles** dans les puits appropriés.
- **Incuber** pendant **30 minutes** à température ambiante (18-24°C).
- **Laver 3 fois** avec **200 µl de solution de lavage (diluée au 1/20)**.
- **Distribuer 100 µl de conjugué** dans chaque puits.
- **Incuber** pendant **30 minutes** à température ambiante (18-24°C).
- **Laver 3 fois** avec **200 µl de solution de lavage (diluée au 1/20)**.
- **Distribuer 100 µl de TMB / substrat** dans chaque puits.
- **Incuber** pendant **10 minutes** à température ambiante (18-24°C).
- **Distribuer 100 µl de solution s'arrêt** dans chaque puits, en suivant le même ordre que pour la distribution du substrat.
- **Lire l'absorbance à 450 nm** (en option 450/650 nm) dans les 30 minutes.

NOTE : Nous conseillons de doser un blanc en doublets, dans chaque série (du diluant pour échantillon uniquement, sans échantillon de patient).

Procédure manuelle de lavage : Eliminer le liquide des puits en retournant la plaque. Secouer vigoureusement le support retourné sur du papier absorbant. Distribuer 200 µl de solution de lavage diluée dans chaque puits. Laisser reposer 20 secondes. Retirer le liquide des puits en retournant la plaque. Répéter toute l'opération deux fois de plus.

8. CALCUL ET INTERPRETATION DES RESULTATS

8.1 Interprétation quantitative

Tracer la courbe d'étalonnage en reportant la densité optique de chaque étalon par rapport aux valeurs correspondantes en unités. Pour obtenir des meilleurs résultats, il est conseillé d'utiliser un algorithme lin/lin. A partir des valeurs d'absorbance, lire les concentrations correspondantes de chaque échantillon exprimées en U/ml.

Intervalle normal : IgM ≤ 25 U/ml

INTERPRETATION :

Résultat Négatif	Résultat Positif
< 25 U/ml	> 25 U/ml

NOTE : Des échantillons limites devraient être dosés de nouveau pour confirmation.

8.2 Interprétation semi-quantitative

Une interprétation semi-quantitative des résultats est possible en utilisant l'étalon à **25 U/ml** comme contrôle valeur seuil. Les résultats sont exprimés en indice de liaison (**Binding Index = B.I.**), défini comme le rapport entre les valeurs d'absorbance de l'échantillon et du contrôle seuil :

$$\text{B.I.} = \text{D.O. échantillon} / \text{D.O. contrôle seuil}$$

Un échantillon est **négatif** lorsque **B.I. ≤ 1.0**

Un échantillon est **positif** lorsque **B.I. > 1.0**

NOTE : Les échantillons limites devraient être dosés de nouveau pour confirmation.

8.3 Validation des résultats

Un dosage est considéré valide si les spécifications du contrôle d'assurance qualité (voir tableau ci-après) sont respectées. Si non, voir § 11, vérifier toute la procédure et refaire le dosage. Si le problème persiste contacter le fabricant ou le distributeur.

	Spécifications de l'Assurance Qualité	
	D.O.	U./ml
Blanc (diluant pour échantillon)	< 0.100	-
Contrôle Négatif	-	≤ 20
Étalon 25 U/ml	< 50 % of Standard 400 U/ml	-
Contrôle Positif	> 0.800	200 - 400

9. PERFORMANCES

9.1 Linéarité

Des sera sélectionnés ont été testés en dilution sériée. Les valeurs obtenues suivent une courbe linéaire. Cependant, du fait de la nature hétérogène des autoanticorps humains certains sera pourraient déroger à la règle. Les données détaillées et mises à jour sont disponibles sur demande.

9.2 Reproductibilité

Trois sera contrôles (fort, moyen, faible positifs) ont été testés pour l'évaluation de la précision intra et inter-essai. Les coefficients de variation sont <10% en intra-lot et <20% en inter-lot. Les données détaillées et mises à jour sont disponibles sur demande.

9.3 Sensibilité clinique et spécificité

La sensibilité est estimée > 99 %

La spécificité est estimée > 99 %

Des populations définies cliniquement ont été utilisées pour tester la sensibilité du test (populations confirmées positives selon des méthodes de références spécifiques pour la maladie). La spécificité a été testée avec des groupes de patients contrôles qui représentent une population normale saine, ainsi qu'avec des groupes de patients contrôles définis cliniquement. Les données détaillées sont disponibles sur demande.

9.4. Valeurs attendues

La valeur attendue pour des sujets sains est un résultat négatif. Le nombre de cas positifs et le degré de positivité est dépendant de paramètres tels que la population type testée, le traitement, etc. Chaque laboratoire doit par conséquent établir ses propres valeurs attendues. Ces valeurs seront basées sur les spécimens habituellement testés.

10. LIMITES DU TEST

1. Le diagnostic ne doit pas être établi uniquement sur la base des résultats du test.
2. Les résultats doivent être toujours interprétés en tenant compte de l'examen clinique et de l'historique du patient.
3. D-tek SA. et ses distributeurs autorisés ne peuvent pas être tenus responsables des dommages occasionnés indirectement ou consécutivement à un changement ou une modification dans le procédé indiqué. L'utilisation de cette trousse est destinée au personnel technique qualifié seulement.
4. L'utilisation de cette trousse doit être soumise aux procédés « GLP » en respectant tous les règlements généraux et différents à l'utilisation de ce kit.

11. CAUSES D'ERREUR

Densité optique trop basse	Densité optique trop élevé
Merci de vérifier les possibilités suivantes : <ul style="list-style-type: none">• Filtre de lecture inapproprié (utiliser 450 nm ou 450/650 nm)• Dilution incorrecte du tampon de lavage (pas assez dilué)• Dilution incorrecte des échantillons (trop dilués)• Inactivation du conjugué (ex. par des substances exogènes). Utiliser unique-ment des embouts propres.	Merci de vérifier les possibilités suivantes : <ul style="list-style-type: none">• Lavage insuffisant (voir procédure manuelle de lavage dans § 7.4)• Temps ou température d'incubation trop élevés• Dilution incorrecte des échantillons (pas assez dilués)• Contamination du substrat (ex. par le conjugué → couleur clairement bleue déjà dans le flacon). Utiliser uniquement des embouts propres.• Contamination des échantillons (ex. par des microorganismes). Utiliser de préférence des échantillons frais.

12. BIBLIOGRAPHIE

La littérature est disponible sur demande à info@d-tek.be.