








# Anti- $\beta$ -2 GP-I MODE D'EMPLOI

96 déterminations

**REF** 4041



Test immunoenzymatique (ELISA) pour le dosage des auto-anticorps anti- $\beta$ -2 GP-I dans le sérum ou le plasma humain.

<b>REF</b>	N° de catalogue	<b>LOT</b>	N° de lot
	Se référer aux documents		Fabriqué par
	A stocker à		Date de péremption
	Consulter le mode d'emploi	<b>D</b>	Risque biologique

## INTRODUCTION

La trousse anti- $\beta$ -2 GP-I est destinée au dosage des anticorps anti- $\beta$ -2 glycoprotéine I IgG et/ou IgM dans le sérum ou le plasma humain en vue du diagnostic biologique du syndrome des anti-phospholipides (SAPL).

Le SAPL est une pathologie auto-immune définie cliniquement par des thromboses artérielles ou veineuses, une thrombocytopénie et des avortements spontanés à répétition. Le SAPL primaire et le lupus érythémateux disséminé (LED) sont caractérisés par l'apparition d'anticorps reconnaissant des phospholipides anioniques dont la  $\beta$ -2 GP-I (1). Même si le rôle pathologique de ces anticorps reste mal connu, la recherche au laboratoire de différents types d'anticorps anti-phospholipides est aujourd'hui une étape importante du diagnostic différentiel des maladies auto-immunes systémiques.

A l'inverse des anticorps anti-phospholipides indépendants d'un cofacteur que l'on retrouve dans les infections et les néoplasies, les anticorps présents dans le SAPL reconnaissent les phospholipides associés entre autres à la  $\beta$ -2 glycoprotéine ( $\beta$ -2 GP-I ou apolipoprotéine H) (2,3). La  $\beta$ -2 GP-I est une protéine sérique de 50 kDa qui joue un rôle complexe dans l'agrégation des plaquettes et de la coagulation.

La structure de la  $\beta$ -2 GP-I comprend une séquence d'acides aminés chargée positivement (282-287) qui interagit avec des phospholipides anioniques ou le polystyrène des cupules de la plaque ELISA. Cette interaction induit un changement conformationnel de la protéine et la formation de nouveaux épitopes probablement reconnus par les auto-anticorps anti-phospholipides .

(1) Harris EN, Gharavi AE, Boey ML, Patel BM, Mackworth-Young GG, Loizou S and Hughes GRV: Anti $\beta$ -2 GP-I antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. Lancet 1983 11:1211

(2) Galli M, Comfurius P, Maassen C, Hemker HC, DeBaets MHVan Breda-Vriesman PJC, Barbui T, Zwaal RFA, Bevers EM: Anti $\beta$ -2 GP-I antibodies (ACA) directed not to  $\beta$ -2 GP-I but to a plasma protein factor. Lancet 1990 335:1544-1547

(3) McNeil HP, Simpson RJ, Chesterman CN, Krilis SA: Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding factor of coagulation: beta 2-glycoprotein I (apolipoprotein H). Proc Natl Acad Sci USA 1990 87:4120-4124

## PRINCIPE DU DOSAGE

La trousse anti- $\beta$ -2 GP-I est un dosage immuno-enzymatique pour la détermination quantitative des IgG et/ou IgM contre la  $\beta$ -2 GP-I dans le sérum ou le plasma humain..

Les anticorps présents dans les calibrateurs, le contrôle et les échantillons dilués réagissent avec la  $\beta$ -2 GP-I humaine immobilisée sur des microcupules en polystyrène. L'utilisation de la  $\beta$ -2 GP-I hautement purifiée garantit la spécificité du dosage.

Au cours d'une première incubation de 60 minutes à température ambiante, les anticorps anti $\beta$ -2 GP-I, s'ils sont présents, se fixent spécifiquement aux cupules.

Après lavage, un anticorps anti-IgG humaines ou anti-IgM humaines conjugué à la peroxydase de raifort se lie aux immunoglobulines précédemment retenues sur la phase solide.

Au terme d'une seconde incubation de 30 minutes à température ambiante, l'excès de conjugué est éliminé par lavage, puis la présence de l'enzyme est révélée par un substrat chromogène (TMB). La densité optique de l'échantillon est déterminée par lecture à 450 nm sur un lecteur de microplaques après addition d'une solution d'arrêt : la valeur obtenue est comparée à la densité optique fournie par des calibrateurs de concentrations connues en anticorps anti- $\beta$ -2 GP-I. La trousse permet également une détermination semi-quantitative en utilisant un calibrateur seuil.

## ECHANTILLONS DES PATIENTS

### **Prélèvement et conservation des échantillons**

Le sang est prélevé par ponction veineuse. Après coagulation, le sérum est récupéré par centrifugation.

Le plasma peut aussi être utilisé avec le kit ELISA anti-β-2 GP-I. Les échantillons hémolysés ou lipidiques ne peuvent pas être utilisés avec cette trousse de dosage.

Eviter les congélations/décongélations répétées. Dans le cas d'utilisations multiples, aliquoter les échantillons et les stocker à -20 °C.

### **Préparation avant utilisation**

Laisser les échantillons atteindre la température ambiante. Prendre soin d'agiter les échantillons de sérum pour obtenir une certaine homogénéité.

**Note : Les échantillons doivent être dilués au 1/101 (v/v) avant de débiter le dosage, soit 10 µl d'échantillon + 1 ml de diluant (C).**

Les échantillons peuvent être conservés à 2 – 8 °C jusqu'à 3 jours. Pour un stockage prolongé, il est préférable de les stocker à -20 °C.

## Composition du kit pour 96 déterminations

<b>A</b>	<b>Microplaque</b> , 12 barrettes sécables de 8 puits revêtus 1 plaque scellée sous avec de la $\beta$ -2 GP-I humaine hautement purifiée.	1 plaque scellée sous vide avec dessiccant Prête à l'emploi
	Ag 96	
<b>B</b>	<b>Tampon de lavage 10x</b> Concentré pour l'obtention de 1000 ml de solution de lavage.	1 flacon, 100 ml Bouchon blanc
	BUF WASH	
<b>C</b>	<b>Diluant</b>	100 ml Prêt à l'emploi Bouchon noir
	DIL	
<b>D</b>	<b>Conjugué</b> Contient des anti-IgG humaines (mouton) couplés à la peroxydase HRP.	15 ml Prêt à l'emploi Bouchon rouge
	CONJ G	
<b>E</b>	<b>Conjugué</b> Contient des anti-IgM humaines (mouton) couplés à la peroxydase HRP.	15 ml Prêt à l'emploi Bouchon vert
	CONJ M	
<b>F</b>	<b>Substrat</b> 3,3', 5,5'-tétraméthylbenzidine dans du tampon citrate contenant du peroxyde d'hydrogène	15 ml Prêt à l'emploi Bouchon bleu
	SOLN TMB	
<b>G</b>	<b>Solution d'arrêt</b> 0,25 M d'acide sulfurique	15 ml Prêt à l'emploi Bouchon jaune
	H2SO4	
<b>0 - 4</b>	<b>Calibrateurs</b> (sérum dilués) Concentrations : 1, 10, 30, 100, 300 U/ml	1 ml chacun Prêts à l'emploi Bouchons blancs
	CAL	
<b>P</b>	<b>Contrôle positif</b> (sérum dilué) Concentration : voir feuillet dans le coffret	1 ml chacun Prêt à l'emploi Bouchon rouge
	CONTROL	

## Matériel non fourni

- micropipette 100 - 1000  $\mu$ l
- micropipette 10 - 100  $\mu$ l
- pipette multicanaux 50 – 200  $\mu$ l et réservoir
- peigne de lavage à 8 canaux avec pompe à vide ou laveur de microplaques
- lecteur de microplaque avec filtres optiques 450 nm, 620 nm ou 690 nm
- eau distillée ou déionisée

## Format et conservation

La trousse anti- $\beta$ -2 GP-I a été conçue pour 96 déterminations.

La date de validité de chaque réactif est indiquée sur l'étiquette correspondante et rapportée sur l'étiquette du coffret.

A réception du coffret, tous les composants de la trousse doivent être conservés à 2 – 8 °C, de préférence dans l'emballage d'origine.

## Préparation avant l'emploi

Porter tous les composants du coffret à température du laboratoire avant utilisation pour le dosage.

La plaque de microtitration est scellée sous vide avec un dessicant. La plaque est composée d'un cadre et de barrettes de cupules sécables. Porter la plaque à température ambiante avant d'ouvrir son emballage. Les cupules inutilisées doivent être conservées à 2-8°C et replacées dans l'emballage d'origine pour les protéger de l'humidité.

Préparer une quantité suffisante de solution de lavage en diluant le tampon concentré 10x (1+9) avec de l'eau déionisée ou de l'eau distillée. La solution de lavage diluée est stable à 2-8°C pendant 30 jours. Veiller à ce que le temps de contact de la solution de lavage dans les cupules soit d'au moins 5 secondes par cycle de lavage.

Eviter d'exposer le substrat à la lumière.

<h2>PROTOCOLE DE DOSAGE</h2>
------------------------------

- **Diluer les sérums des patients avec le diluant des échantillons (C) au 1/101 (v/v) ; exemple 10  $\mu$ l + 1,0 ml de diluant des échantillons (C).**
- **Une fois l'analyse commencée, toutes les étapes doivent être menées à leur terme sans interruption, en respectant les temps d'incubation prescrits.**

1. Porter tous les réactifs à température ambiante (20 à 25°C) et mélanger doucement en évitant la formation de mousse.
2. Pipeter
  - 100 µl de calibrateurs 0 – 4 (quantitatif) ou 100 µl de calibrateur 1 (semi-quantitatif)
  - 100 µl sérum de contrôle positif **P**
  - 100 µl des échantillons sériques des patients
3. Incuber 60 minutes à température du laboratoire.
4. Décanter. Laver chaque cupule **3 fois** avec 300 µl de solution de lavage (préparée à partir de **B**).
5. Ajouter 100 µl de conjugué (**D ou E**) à chaque cupule.
6. Incuber 30 minutes à température ambiante.
7. Décanter. Laver chaque cupule **3 fois** avec 300 µl de solution de lavage (préparée à partir de **B**).
8. Ajouter 100 µl de substrat (**F**) à chaque cupule.
9. Incuber 15 minutes à l'abri de la lumière à température ambiante.
10. Ajouter 100 µl de solution d'arrêt (**G**) à chaque cupule et mélanger doucement.
11. Lire les densités optiques à 450 nm dans les 30 minutes suivant l'étape 10.

## CALCUL DES RÉSULTATS

La trousse permet d'évaluer les résultats de manière quantitative (5 calibrateurs) ou semi-quantitative (calibrateur 1).

Les logiciels des lecteurs de microplaque permettent habituellement les 2 modes de calcul.

### **Dosage semi-quantitatif**

Calculer l'indice de liaison **IL** en utilisant la densité optique du calibrateur 1 (10 U/ml) comme valeur seuil. L'indice de liaison est obtenu en divisant la densité optique de l'échantillon par la densité optique du calibrateur 1.

$$\mathbf{IL = DO \text{ échantillon} / DO \text{ calibrateur 1}}$$

### **Dosage quantitatif**

Calculer la moyenne des DO pour chaque paire de cupules (calibrateurs, contrôle et échantillons).

Construire sur du papier semi-logarithmique une courbe d'étalonnage en portant en ordonnée les DO des calibrateurs et leurs concentrations en abscisse.

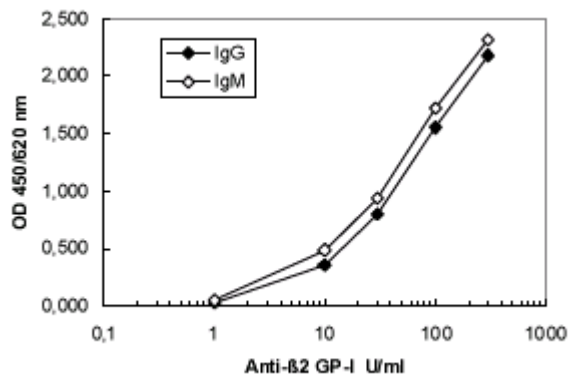
En fonction de la DO de chaque échantillon, lire directement la concentration **sans appliquer de facteur de dilution**.

### Exemples de courbe d'étalonnage

**A ne pas utiliser lors des tests !**

IgG	DO1	DO2	DO Moyenne	U/ml
Calibrateur 0	0,028	0,026	0,027	<b>1</b>
Calibrateur 1	0,353	0,367	0,355	<b>10</b>
Calibrateur 2	0,871	0,816	0,804	<b>30</b>
Calibrateur 3	1,541	1,567	1,554	<b>100</b>
Calibrateur 4	2,175	2,199	2,187	<b>300</b>
Patient 1	0,661	0,677	0,669	<b>23</b>

IgM	DO1	DO2	DO Moyenne	U/ml
Calibrateur 0	0,048	0,053	0,050	<b>1</b>
Calibrateur 1	0,481	0,497	0,489	<b>10</b>
Calibrateur 2	0,936	0,948	0,942	<b>30</b>
Calibrateur 3	1,712	1,739	1,725	<b>100</b>
Calibrateur 4	2,302	2,334	2,318	<b>300</b>
Patient 1	1,061	1,077	1,069	<b>36</b>



Les échantillons dont la densité optique est supérieure à celle du calibrateur 4 doivent être dilués avec un plus grand volume de diluant des échantillons et redosés. Les résultats obtenus seront multipliés par le facteur de dilution approprié.

## CONTRÔLE DE QUALITÉ

Afin de valider la manipulation, le calibrateur 1 doit impérativement avoir une densité optique moyenne inférieure ou égale à 0,7. Le calibrateur 4 doit impérativement avoir une densité optique moyenne supérieure ou égale à 1,2.

Le contrôle positif de la trousse doit fournir une valeur comprise dans les limites acceptables mentionnées sur le certificat inclus dans le coffret.

Si ces critères ne sont pas remplis, répéter le dosage en vérifiant que toutes les étapes de la procédure ont été scrupuleusement respectées (temps et températures d'incubation, dilution du tampon de lavage, étapes de lavage...). En cas de nouvel échec, contacter votre fournisseur.

## VALEURS DE REFERENCE

Anti-β-2 GP-I	U/ml	IL
Positif	≥ 10	≥ 1,0
Négatif	< 10	< 1,0

Il est recommandé que chaque laboratoire établisse ses propres valeurs normales et pathologiques. De ce fait, les valeurs ci-dessus sont données uniquement à titre indicatif.

### Limites du test

Les patients sains doivent être négatifs en utilisant le coffret anti-β-2 GP-I. Toutefois, on peut observer un résultat positif chez certaines personnes apparemment saines.

Tout diagnostic ne doit pas être basé sur le seul résultat de la biologie, le médecin devant prendre en compte l'ensemble des aspects cliniques et biologiques.

## DONNEES ANALYTIQUES

### Calibration

En l'absence de standard international, la trousse anti-β-2 GP-I est calibrée en unités arbitraires.

### Sensibilité (limite de détection)

La sensibilité analytique de la trousse est de 3 U/ml pour les anti-β-2 GP-I IgG et IgM.

## Précision

### Répétabilité

Echantillon n°	IgG		IgM	
	Concentration moyenne (U/ml)	CV (%)	Concentration moyenne (U/ml)	CV (%)
1	185,8	4,6	260,4	4,5
2	116,7	6,8	143,4	5,9
3	71,6	3,9	114,6	5,1
4	34,3	4,5	37,9	3,3

### Reproductibilité



Echantillon n°	IgG		IgM	
	Concentration moyenne (U/ml)	CV (%)	Concentration moyenne (U/ml)	CV (%)
1	257,6	9,2	139,6	11,7
2	148,7	7,1	89,5	10,3
3	89,8	5,7	68,8	6,2
4	41,0	5,2	23,4	6,1

## PROTOCOLE RESUME

Diluer les échantillons des patients: 10 µl + 1,0 ml de diluant des échantillons (C)

1	Amener tous les réactifs à température ambiante (20 à 25°C)			
		Calibrateurs 0 - 4	Contrôle	Patient 1 etc.
2	Pipeter Calibrateurs 0-4 ou calibrateur 1 Contrôle P Sérum Patient 1 etc.	100 µl	100 µl	100 µl
3	Incuber	60 minutes à température ambiante		
4	Laver et décanter	3 x 300 µl (à partir de B)		
5	Pipeter le conjugué (D ou E)	100 µl	100 µl	100 µl
6	Incuber	30 minutes à température ambiante		
7	Laver et décanter	3 x 300 µl (à partir de B)		
8	Pipeter le substrat (F)	100 µl	100 µl	100 µl
9	Incuber à l'abri de la lumière	15 minutes à température ambiante		
10	Pipeter la solution d'arrêt (G)	100 µl	100 µl	100 µl
11	Mesurer la DO à 450 nm dans les 30 minutes			


## PRECAUTIONS D'EMPLOI

- Ce coffret est destiné uniquement à un usage *in vitro*. Suivre attentivement les instructions d'utilisation.
- Les dates d'expiration sur les différentes étiquettes doivent être respectées, ainsi que les délais de conservation des réactifs après reconstitution.
- Ne pas utiliser ou mélanger des réactifs de différents lots.
- Ne pas utiliser des réactifs d'autres fabricants.
- Eviter les temps morts durant la distribution des réactifs.
- Tous les réactifs doivent être stockés à 2 – 8 °C dans l'emballage d'origine avant toute utilisation.
- Eviter tout contact de l'acide sulfurique (solution d'arrêt) avec la peau et les muqueuses. En cas d'éclaboussures, laver immédiatement à l'eau.
-  • Certains des réactifs contiennent de faibles quantités de thimérosal (< 0,1%) et de kathon (1% v/v). Ils ne doivent pas être avalés ou mis en contact avec la peau ou les muqueuses.
-  • Les produits d'origine humaine ont subi un dépistage négatif vis-à-vis des anticorps anti-VIH, anti-VHC et de l'antigène HBS. Toutefois, aucun test de laboratoire ne peut garantir l'absence de ces agents viraux. Les réactifs comme les échantillons doivent donc être manipulés comme des produits potentiellement infectieux.

Distribution en France :

**LABODIA**

LABODIA France  
266 avenue Daumesnil  
75012 PARIS

 N° Vert 0800 114 700

Fax : 03.21.49.59.56

E-mail : [info@labodia.com](mailto:info@labodia.com)

Website : [www.labodia.com](http://www.labodia.com)