








Anti-CCP Ref MODE D'EMPLOI

96 déterminations

REF 3860



Test immunoenzymatique (ELISA) pour le dosage des auto-anticorps IgG anti-peptides cycliques citrullinés (CCP) dans le sérum humain.

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

INTRODUCTION

La trousse anti-CCP Ref est destinée au dosage des anticorps anti-CCP IgG dans le sérum ou le plasma humain en vue du diagnostic biologique de la polyarthrite rhumatoïde.

Classiquement, le diagnostic de la polyarthrite rhumatoïde (PR) est obtenu en recherchant les facteurs rhumatoïdes (FR). Le FR est un anticorps anti-IgG dirigé contre la partie constante. Il appartient le plus souvent à la classe des IgM mais il peut être aussi de type IgA, IgG ou IgE. Il n'y a pas donc un mais des facteurs rhumatoïdes. Ces facteurs sont mis en évidence dans le sérum de 70 à 80 % des patients atteints de PR. Mais ces tests sont peu spécifiques car les FR peuvent également être présents chez les sujets normaux. La fréquence de détection chez les sujets normaux varie en fonction de l'âge et de la méthode utilisée : de 1 à 4 % chez les sujets jeunes et jusqu'à 25 % chez les sujets âgés.

Par rapport aux FR, la recherche des anti-CCP offre une meilleure spécificité et sensibilité vis-à-vis de la PR. Les anticorps anti-CCP sont souvent présents à un stade très précoce de la PR et ont une valeur prédictive élevée par rapport au développement de la maladie.

Conrad K, et al, Profiling of rheumatoid arthritis associated auto-antibodies, Autoimmun Rev (2009), doi: 10.1016/j. autrev.2009.11.017

PRINCIPE DU DOSAGE

La trousse anti-CCP est un dosage immuno-enzymatique pour la détermination quantitative des IgG contre les peptides cycliques citrullinés (CCP) dans le sérum humain.

Les anticorps présents dans les calibrateurs, le contrôle et les échantillons dilués réagissent avec des peptides synthétiques citrullinés immobilisés sur des microcupules en polystyrène.

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

Après lavage, un anticorps anti-IgG 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-CCP.

ECHANTILLONS DES PATIENTS

Prélèvement et conservation des échantillons

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

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 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

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 5 μl d'échantillon + 500 μl de diluant (C).

Les échantillons peuvent être conservés à $2 - 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ jusqu'à 3 jours. Pour un stockage prolongé, il est préférable de les stocker à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Composition du kit pour 96 déterminations

A	Microplaque , 12 barrettes sécables de 8 cupules revêtues de peptides synthétiques citrullinés	1 plaque scellée sous vide avec dessiccant Prête à l'emploi
MP		
B	Tampon de lavage Concentré pour l'obtention de 1000 ml de solution de lavage.	1 flacon, 100 ml Bouchon blanc
WASHB		
G	Diluant	100 ml Prêt à l'emploi Bouchon noir
DIL		
D	Conjugué Contient des anti-IgG humaines (mouton) couplés à la peroxydase HRP.	15 ml Prêt à l'emploi Bouchon rouge
CONJ		
E	Substrat 3,3', 5,5'-tétraméthylbenzidine dans du tampon citrate contenant du peroxyde d'hydrogène	15 ml Prêt à l'emploi Bouchon bleu
SUB		
F	Solution d'arrêt 0,25 M d'acide sulfurique	15 ml Prêt à l'emploi Bouchon jaune
STOP		
1 - 5	Calibrateurs (sérum dilués) Concentrations : voir certificat d'analyse joint	1 ml chacun Prêts à l'emploi Bouchons blancs
CAL		
C	Contrôle positif (sérum dilué) Concentration : voir certificat d'analyse joint	1 ml Prêt à l'emploi Bouchon rouge
CONTROL		

Matériel non fourni

- micropipettes 5 - 1000 µl
- pipette multicanaux 50 – 200 µl 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
- papier absorbant
- cylindres gradués
- tubes de 2 ml pour la dilution des échantillons

Format et conservation

La trousse anti-CCP a été conçue pour 96 déterminations, ce qui correspond à 42 échantillons de patients dosés en double.

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.

A- 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.

B- 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.

D- Après ouverture du flacon le conjugué est stable 8 semaines à 2-8°C.

E- Eviter d'exposer le substrat à la lumière.

PROTOCOLE DE DOSAGE

- **Diluer les sérums des patients avec le diluant des échantillons (C) au 1/101 (v/v) ; exemple 5 µl + 500 µl 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. Pipeter

- 100 µl de calibrateurs 1 – 5
- 100 µl de contrôle positif C
- 100 µl des échantillons sériques dilués des patients

2. Couvrir la plaque et incuber 60 minutes à température du laboratoire.

3. Aspirer ou vider les cupules par inversion suivie d'un séchage obtenu par en tapotant la plaque sur du papier absorbant. Laver chaque cupule **3 fois** avec 300 µl de solution de lavage (préparée à partir de **B**). Temps de contact de la solution de lavage : 5 secondes.
4. Ajouter 100 µl de conjugué (**D**) à chaque cupule.
5. Couvrir et incuber 30 minutes à température ambiante.
6. Aspirer ou vider les cupules par inversion suivie d'un séchage obtenu par en tapotant la plaque sur du papier absorbant. Laver chaque cupule **3 fois** avec 300 µl de solution de lavage (préparée à partir de **B**). Temps de contact de la solution de lavage : 5 secondes.
7. Ajouter 100 µl de substrat (**E**) à chaque cupule. Agiter brièvement.
8. Incuber 15 minutes à l'abri de la lumière à température ambiante.
9. Ajouter 100 µl de solution d'arrêt (**F**) à chaque cupule et mélanger doucement.
10. Lire les densités optiques à 450 nm dans les 30 minutes suivant l'étape 9.

Remarques : les étapes de lavage sont essentielles pour garantir de bons résultats. Les lavages insuffisants entraînent une mauvaise précision et des DO faussement élevées.

CALCUL DES RÉSULTATS

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.

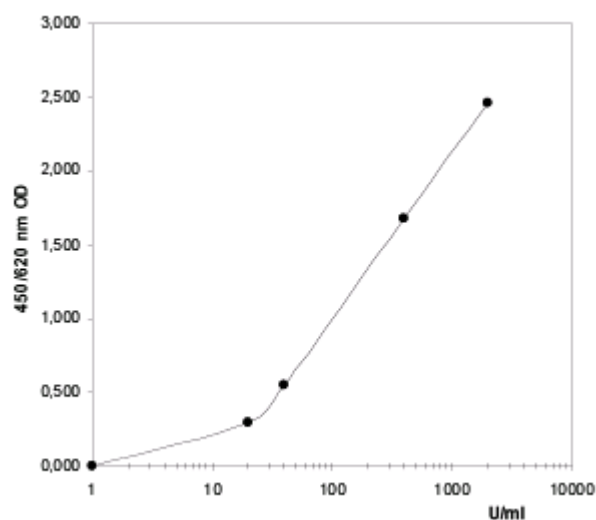
En fonction de la DO de chaque échantillon, lire directement la concentration **sans appliquer de facteur de dilution**.

En cas d'utilisation d'un logiciel de calcul, il est recommandé d'utiliser un modèle à 4 paramètres.

Exemples de courbe d'étalonnage

A ne pas utiliser lors des tests !

IgG	DO1	DO2	DO Moyenne	U/ml
Calibrateur 1	0,037	0,043	0,040	1
Calibrateur 2	0,304	0,285	0,295	20
Calibrateur 3	0,514	0,551	0,533	40
Calibrateur 4	1,771	1,589	1,680	400
Calibrateur 5	2,631	2,284	2,458	2000
Patient 1	1,024	1,019	1,022	103



Les échantillons dont la densité optique est supérieure à celle du calibrateur 5 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.

VALEURS DE REFERENCE

Anti-CCP	U/ml
Positif	≥ 30
Négatif	< 30

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-CCP. 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

La trousse anti-CCP est calibrée de manière arbitraire et les résultats sont donc exprimés en U/ml. Toutefois, la courbe de calibration est parallèle à celle obtenue avec le standard de l'OMS W1066 pour le facteur rhumatoïde avec un facteur constant de 1/12.

Linéarité

En raison de la nature hétérogène des auto-anticorps anti-CCP, les tests de parallélisme réalisés en diluant des échantillons positifs dans un sérum négatif en anti-CCP donnent le plus souvent des résultats satisfaisants.

Spécificité et sensibilité

En utilisant un seuil de 30 U/ml, la trousse Medizym anti-CCP possède une sensibilité de 79% et une spécificité clinique de 97% pour le diagnostic de la PR.

Limites de détection

La sensibilité analytique (limite de détection basse, 0 +/- 3SD) est de 1,2 U/ml.

La sensibilité fonctionnelle pour un coefficient de variation (reproductibilité) de 20% est de 2 U/ml.

Précision

Répétabilité

Echantillon n°	Concentration moyenne (U/ml)	CV (%)
1	29	7
2	39	3
3	147	7
4	572	5
5	870	6

Reproductibilité



Echantillon n°	Concentration moyenne (U/ml)	CV (%)
6	2,5	8
7	91	6
8	209	8
9	1140	11
10	1737	9

PROTOCOLE RESUME

Diluer les échantillons des patients: 5 µl + 500 µl de diluant des échantillons (C)

1	Amener tous les réactifs à température ambiante (20 à 25°C)			
		CAL	Contrôle	Patient 1 etc.
2	Pipeter	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)	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 (E)	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 (F)	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

Website : www.labodia.com