

## ZYMUTEST CRP

### Référence RK010A

Dosage sensible de la Protéine C-Réactive  
(coffret pour le dosage ELISA de la CRP)

POUR LA RECHERCHE UNIQUEMENT.

NE PAS UTILISER DANS LES PROCÉDURES DE DIAGNOSTIC

Dernière révision : 17/11/2022

#### MÉTHODE :

La trousse ZYMUTEST CRP est un dosage ELISA sandwich (en un temps) de la CRP, utilisable sur plasma humain, sérum, ou tout autre milieu où la CRP doit être mesurée.

**Ce coffret est à usage de recherche uniquement et ne doit pas être utilisé pour le diagnostic ou le traitement du patient.**

#### PRINCIPE :

La méthode sensible ZYMUTEST CRP, est une technique ELISA sandwich, "en un temps", pour le dosage de la CRP (Protéine C-Réactive) humaine. L'immunoconjugué, anticorps polyclonal de chèvre couplé à la peroxidase, est d'abord introduit dans les puits d'une plaque sensibilisée par un anticorps polyclonal de chèvre (fragments F(ab')<sub>2</sub>), anti-CRP. Ensuite, l'échantillon à tester, dilué, est introduit dans la cupule réactionnelle, ce qui initie la réaction immunologique. Quand la CRP est présente, elle réagit avec l'immunoconjugué et se fixe simultanément sur la plaque sensibilisée. Après lavage, le substrat de la peroxidase, tetraméthylbenzidine (TMB) en présence d'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), est introduit et une coloration bleue se développe. L'arrêt de la coloration par l'acide sulfurique fait virer la coloration au jaune. Cette coloration, mesurée à 450 nm, est proportionnelle à la concentration de CRP dans l'échantillon testé.

#### ECHANTILLONS :

- Plasma humain prélevé sur anticoagulant citraté ou Na<sub>2</sub> EDTA.
- Sérum humain.
- Tout autre échantillon biologique où la CRP doit être mesurée.

#### REACTIFS :

1. **COAT** : Microplaque ELISA (Micro-ELISA plate), contenant 12 barrettes de 8 puits, sensibilisée par les fragments F(ab')<sub>2</sub> d'un anticorps polyclonal de chèvre spécifique de la CRP, et stabilisée, emballée dans un sachet aluminium en présence d'un déshydratant.
2. **SD** : 2 flacons de 50 ml de diluant échantillon, prêt à l'emploi.
3. **Cal** : 3 flacons de Plasma calibrateur CRP (plasma normal calibré par rapport au standard international du NIBSC pour la CRP), titré en CRP antigène, lyophilisé, pré-dilué. Chaque flacon doit être reconstitué par 2 ml de diluant échantillon (Sample Diluent) afin d'obtenir un calibrateur contenant une concentration « C » exprimée en ng/ml de CRP, indiquée pour chaque lot sur le papillon fourni dans le coffret. Cette concentration de CRP est d'environ 100ng/ml, ce qui correspond à 10µg/ml dans le plasma non dilué.
4. **CI** : 1 flacon de 0,5ml de plasma Contrôle I, lyophilisé.
5. **CII** : 1 flacon de 0,5ml de plasma Contrôle II, lyophilisé.

La concentration de CRP et les intervalles de confiance sont indiqués sur le papillon fourni dans le coffret.

6. **IC** : 3 flacons d'Immunoconjugué (Anti-(H)-CRP-HRP immunoconjugué), anticorps polyclonal de chèvre, spécifique de la CRP et couplé à la peroxydase, lyophilisé.
7. **CD** : 1 flacon de 25 ml de diluant pour immunoconjugué, prêt à l'emploi.
8. **WS** : 1 flacon de 50 ml de solution de lavage, 20 fois concentrée.
9. **TMB** : 1 flacon de 25 ml de substrat de la peroxydase: 3,3',5,5' – Tetraméthylbenzidine, contenant de l'eau oxygénée, prêt à l'emploi.
10. **SA** : 1 flacon contenant 6 ml d'Acide Sulfurique 0,45 M (Stop Solution), prêt à l'emploi.

**Nota**: Utiliser uniquement les réactifs provenant de coffrets d'un même lot. Ne pas mélanger les réactifs de différents lots de kits pour effectuer un dosage. La concentration en CRP et l'intervalle de confiance du calibrateur et des contrôles sont indiqués sur le papillon fourni dans la trousse.

**\*NOTA** : L'utilisation de fragments F(ab')<sub>2</sub> anti-CRP pour la préparation de la plaque pré-coatée permet d'éviter l'interférence du Facteur rhumatoïde; lorsqu'il est présent.

#### MATERIEL NECESSAIRE ET NON FOURNI :

- Pipettes à 8 canaux permettant de distribuer des volumes de 50 à 300 µl.
- Pipettes à volume variable de 0 à 20 µl, de 20 à 200µl et de 200 à 1000 µl.
- Laveuse de microplaques et agitateur.
- Lecteur de microplaques ELISA réglé à une longueur d'onde de 450 nm.
- Eau distillée.

#### PREPARATION, CONSERVATION ET STABILITE DES REACTIFS :

Dans leur emballage d'origine, avant toute utilisation et conservés à 2-8°C, les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur le coffret.

1. **Micro ELISA plate** : Ouvrir le sachet aluminium et sortir le nombre de barrettes de 8 puits nécessaire pour la série de dosages à effectuer. Les barrettes sorties du sachet aluminium doivent être utilisées dans les 30 minutes. Les barrettes non utilisées peuvent être conservées jusqu'à 4 semaines dans leur emballage d'origine, hermétiquement refermé, en présence du déshydratant, à l'abri de l'humidité, à 2-8°C, dans le sachet plastique minigrip fourni.
2. **Sample-Diluent** : Le réactif est prêt à l'emploi. Après ouverture, il peut être conservé à 2-8°C, pendant 4 semaines, en prenant soin d'éviter toute contamination lors de l'utilisation. Ce réactif contient 0.05% de Kathon CG.
3. **Plasma CRP Calibrator** : Chaque flacon doit être reconstitué par 2 ml de "Sample-Diluent" afin d'obtenir le plasma étalon, titré en CRP, pré-dilué au 1/100. Le taux de CRP est de « C » ng/ml dans le flacon reconstitué. Après reconstitution, ce flacon est stable au moins 24 heures à température du laboratoire, ou au moins 72 heures à 2-8°C.
4. **Plasma Contrôle I lyophilisé (haut)** : reconstituer avec 0,5 ml d'eau distillée.
5. **Plasma Contrôle II lyophilisé (bas)** : reconstituer avec 0,5 ml d'eau distillée.

**Nota** : Après reconstitution, les plasmas contrôles I et II sont stables au moins 24 heures à température du laboratoire, 72 heures à 2-8°C, ou 2 mois congelés à -20°C ou en dessous.

**Précautions** : Le Plasma CRP calibrator (3) et les contrôles I et II (4,5) sont préparés à partir de plasmas humains. Ces derniers ont été testés par des méthodes enregistrées et sont certifiés exempts pour l'anticorps VIH, le Hbs Ag et l'anticorps VCH. Toutefois, aucune méthode ne permettant d'exclure totalement le risque d'agent pathogène, ces produits doivent être manipulés avec toutes les précautions requises pour l'utilisation de produits potentiellement infectés.

6. **Anti-(H)-CRP-HRP immunoconjugué** : Chaque flacon d'immunoconjugué doit être reconstitué par 7.5 ml de "Conjugate Diluent" au moins 15 minutes avant utilisation. Laisser la galette se dissoudre et agiter délicatement pour homogénéiser. L'immunoconjugué reconstitué est stable au moins 24 heures à la température du laboratoire et au moins 4 semaines à 2-8°C.
7. **Conjugate Diluent** : Le réactif est prêt à l'emploi. Après ouverture, il peut être conservé à 2-8°C, pendant 4 semaines, en prenant soin d'éviter toute contamination lors de l'utilisation. Ce réactif contient 0.05% de Kathon CG.
8. **Wash Solution** : Incuber, si nécessaire, le flacon de solution de lavage dans un bain-marie à 37°C jusqu'à totale dissolution des cristaux. Agiter le flacon et diluer la solution de lavage au 1/20 en eau distillée. Les 50 ml de solution concentrée permettent de préparer 1 litre de solution de lavage après dilution. Après ouverture, le flacon est stable 4 semaines à 2-8°C, à l'abri de toute contamination. La solution de lavage diluée peut être utilisée jusqu'à 7 jours après préparation, lorsqu'elle est protégée de toute contamination, et conservée à 2-8°C. Ce réactif contient 0.05% de Kathon CG.
9. **Substrat TMB** : Prêt à l'emploi. A utiliser dans un délai de 4 semaines après ouverture, conservé à 2-8°C, sous réserve de contamination bactériologique lors de l'utilisation.
10. **Solution d'arrêt** : Acide sulfurique 0,45 M, prêt à l'emploi.

**Nota** : Sortir le coffret du réfrigérateur, au moins 30 min avant le dosage, afin que les divers réactifs s'équilibrent à température du laboratoire.

#### MODE OPERATOIRE :

##### Préparation de l'échantillon :

Le sang (9 volumes) doit être collecté sur du citrate trisodique 0.109 M (1 volume) ; le plasma est obtenu après 20 minutes de centrifugation à 2500 g ; le plasma citraté doit être utilisé dans les 24 heures ou conservé congelé, à -20°C ou moins, jusqu'à 6 mois. Juste avant utilisation, décongeler le plasma pendant 15 minutes dans un bain-marie à 37°C. Le plasma décongelé est stable pendant au moins 8 heures à température du laboratoire.

L'utilisation de plasma provenant de sang prélevé sur Na<sub>2</sub> EDTA est possible. Les conditions de conservation sont les mêmes que celles préconisées pour le plasma citraté.

Le dosage peut être également réalisé sur sérum.

##### Plasma ou échantillon à tester, ou contrôles :

Le plasma ou l'échantillon à tester sont analysés dilués au 1/100 dans le diluant échantillon (SD). Pour des taux de CRP > 10µg/ml, diluer au 1/200 ou au 1/400, ou davantage selon le cas. Pour de faibles concentrations de CRP, il est possible d'utiliser des dilutions plus faibles (1/50, 1/20 ou 1/10 par exemple).

Les contrôles I et II doivent être testés dilués au 1/100.

### Gamme d'étalonnage :

Les taux de CRP sont exprimés en µg/ml (ou mg/L).

En utilisant le **Plasma calibrator CRP** (2 ml de plasma pré-dilué au 1/100), de concentration « C » (comprise entre environ 85 et 115 ng/ml suivant les lots), préparer la gamme à d'étalonnage suivante :

Concentration de CRP en ng/ml	C	C/2	C/4	C/10	C/20	0
Vol. de Plasma calibrator "C" ng/ml de CRP	1 ml	0.5 ml	0.25 ml	0.1 ml	0.05 ml	0 ml
Vol. de Sample-Diluent	0 ml	0.5 ml	0.75 ml	0.9 ml	0.95 ml	1 ml

Agiter délicatement pour homogénéiser.

Les dilutions d'étalonnages sont stables au moins **8 heures** à température du laboratoire, ou **24 heures** à 2-8°C.

### Réalisation du dosage :

Sortir la quantité nécessaire de barrettes de 8 puits du sachet aluminium et les placer dans le cadre fourni. Introduire les réactifs dans les puits des microbarrettes ELISA et réaliser le dosage comme indiqué dans le tableau ci-après :

Réactif	Volume	Procédure
Immunoconjugué Anti-(H)-CRP-HRP reconstitué par 7.5 ml de diluant pour immunoconjugué	200 µl	Introduire l'immunoconjugué, anti-(H)-CRP-HRP dans les puits de la plaque ELISA
Gamme d'étalonnage ou échantillon à doser dilué au 1/100	50µl	Introduire la gamme d'étalonnage ou le plasma dilué dans les puits (a)
<b>Agiter délicatement pour homogénéisation</b>		
<b>Incuber 1 heure à TA (b)</b>		
Solution de lavage (diluée 20 fois en eau distillée avant utilisation)	300 µl par puits	Effectuer une série de 5 lavages (c).
Substrat TMB/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	200 µl	Immédiatement après le lavage, introduire cette solution dans les puits (a, c). <i>Nota</i> : la répartition du substrat, barrette par barrette, doit se faire très précisément.
Laisser la coloration se développer pendant 5 minutes à température du laboratoire (b)		
Acide sulfurique 0.45 M (4)	50 µl	Respecter le même temps de répartition, barrette par barrette, que celui utilisé pour le substrat (a).
Attendre 10 minutes pour laisser stabiliser la coloration puis lire la DO obtenue à 450 nm		

### Remarques :

- Lors de la distribution des échantillons et du substrat TMB, l'intervalle de temps entre chaque rangée doit être défini et respecté avec précision. Il doit être le même lors de l'arrêt de la réaction par l'acide sulfurique.
- Eviter de laisser la plaque en pleine lumière lors des incubations et plus particulièrement lors du développement de la coloration. L'utilisation d'un agitateur pour micro-plaques ELISA est possible.
- Ne jamais laisser les puits de la plaque ELISA vides entre l'addition des réactifs ou après les étapes de lavage, afin de préserver les protéines insolubilisées. Le réactif suivant doit être ajouté dans les trois minutes afin d'éviter l'assèchement de la plaque. Si nécessaire, garder les puits remplis de solution de lavage et les vider juste avant distribution du réactif suivant. Régler le laveur de manière à effectuer un lavage doux. Une vidange trop violente des puits, lors de l'aspiration, peut endommager le coating et réduire la réactivité.
- Pour une lecture bichromatique, le filtre 620 nm peut être utilisé comme longueur d'onde de référence.

### EXPRESSION DES RESULTATS :

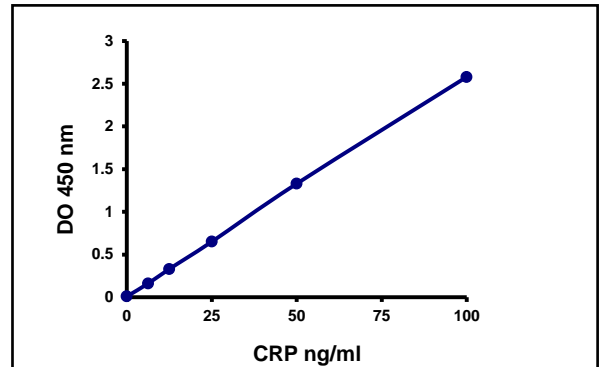
- Sur du papier millimétré, porter en abscisses le **taux de CRP, en ng/ml**, et en ordonnées les **DO 450** correspondantes.
- Sur la courbe obtenue, en déduire la concentration de CRP dans la dilution testée. Le taux de CRP de l'échantillon analysé est obtenu en multipliant cette valeur par le facteur de dilution (**en règle générale x100** quand les échantillons sont testés à la dilution 1/100).

Les logiciels spécifiques pour test ELISA (DYNEX, BIOLISE, etc..) peuvent être utilisés pour déterminer directement la concentration de CRP à partir de la courbe d'étalonnage.

**Les résultats obtenus doivent être utilisés à des fins de recherche uniquement et ne sont pas utilisables pour le diagnostic ou le traitement du patient.**

### EXEMPLE DE COURBE D'ETALONNAGE

La courbe d'étalonnage ci-dessous n'est qu'un exemple. Pour la mesure des taux de CRP, seule la courbe d'étalonnage effective réalisée pour la série de dosages doit être utilisée.



### Caractéristiques du dosage :

- Le dosage est standardisé avec le Standard International du NIBSC pour la CRP (1st International Standard for C-Reactive Protein, Human, 1986, Ref : 85/506) exprimé en "milli International Units" (mIU). Une mIU/ml correspond à environ 1 µg/ml.
- Il n'y a pas d'interférence du facteur Rhumatoïde, grâce à l'utilisation de fragments F(ab)<sub>2</sub> pour la sensibilisation de la plaque ELISA.
- Aucun effet de zone n'a été observé pour des concentrations de CRP jusqu'à 100 µg/ml, lorsque le protocole préconisé est utilisé.

### Biochimie :

La Protéine C-Réactive (CRP) est une molécule pentamérique, composée de 5 sous-unités identiques. Son poids moléculaire est de 110 Kd. Elle est produite par les hépatocytes. Sa fonction biologique est encore mal comprise. Toutefois, on sait que cette protéine peut stimuler les cellules mononucléées et induire la libération de facteur tissulaire, ce qui active les processus de coagulation. Elle active le complément (3) et neutralise le Facteur Activateur des Plaquettes (PAF). Le taux de CRP dans le plasma humain normal est habituellement compris entre 0,2 et 10 µg/ml (1). La CRP est une protéine de la phase inflammatoire aiguë et est fortement augmentée dans ce contexte.

Changement par rapport à la précédente version.