



ZYMUTEST β_2 GPI

Référence RK022A

(Dosage ELISA de la β_2 GPI humaine)

POUR LA RECHERCHE UNIQUEMENT.

NE PAS UTILISER DANS LES PROCÉDURES DE DIAGNOSTIC

Dernière révision : 17/11/2022

MÉTHODE :

La trousse ZYMUTEST β_2 GPI est un dosage ELISA sandwich de la β_2 GPI Antigène (Beta 2 Glycoprotein I), utilisable sur plasma humain, ou tout autre milieu biologique où la β_2 GPI Antigène 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 β_2 GPI, est une technique ELISA sandwich, "en un temps", pour le dosage de la β_2 GPI humaine. L'immunoconjugué, anticorps polyclonal de chèvre couplé à la peroxidase, est d'abord introduit dans les puits d'une plaque ELISA sensibilisée par des anticorps polyclonaux purifiés, spécifiques de la β_2 GPI Antigène. Ensuite, l'échantillon à tester, dilué, est introduit dans la cupule réactionnelle, ce qui initie la réaction immunologique. Quand la β_2 GPI est présente dans l'échantillon à doser, elle réagit avec l'immunoconjugué et se fixe simultanément sur la plaque sensibilisée. Après lavage, le substrat, Tetraméthylbenzidine (TMB) en présence d'eau oxygénée (H_2O_2), est introduit dans les puits de la plaque et une coloration bleue se développe. L'arrêt de la coloration par l'acide sulfurique fait virer la coloration au jaune. Cette coloration est proportionnelle au taux de β_2 GPI Ag présent dans le plasma ou dans l'échantillon testé.

ECHANTILLONS :

- Plasma humain prélevé sur anticoagulant citraté, ou Na_2 EDTA.
- Le dosage peut être effectué sur sérum.
- Tout autre échantillon biologique où la β_2 GPI Antigène doit être mesurée.

REACTIFS :

1. **COAT** : Microplaque ELISA (Micro ELISA plate), contenant 12 barrettes de 8 puits, sensibilisée par des anticorps polyclonaux, spécifiques de la β_2 GPI humaine, et stabilisée, emballée dans un sachet aluminium en présence d'un déshydratant.
2. **SD** : 2 flacons de 60 ml de diluant échantillon (B2F-Sample Diluent), prêt à l'emploi.
3. **STD** : 3 flacons de **B₂GPI calibrator**, lyophilisé. Chaque flacon doit être reconstitué par 2 ml de diluant échantillon (B2F-Sample Diluent) afin d'obtenir un standard contenant « C » ng/ml de β_2 GPI humaine.
4. **CI** : 1 flacon de 1 ml de (h) **B₂GPI Control I** lyophilisé (contrôle haut).
5. **CII** : 1 flacon de 1 ml de (h) **B₂GPI Control II** lyophilisé (contrôle bas).

Nota : Les concentrations en B₂GPI du calibrateur et des contrôles, et les intervalles de confiance, peuvent varier de lot à lot. Les valeurs obtenues sont indiquées sur le papillon fourni dans le coffret.

6. **IC** : 3 flacons d'**immunoconjugué** (Anti-(h)- β_2 GPI-HRP immunoconjugué), anticorps polyclonaux, spécifiques de la β_2 GPI Ag et couplés à la peroxydase, lyophilisés.
7. **CD** : 1 flacon de 25 ml de diluant pour immunoconjugué B2F-Conjugate Diluent), prêt à l'emploi.
8. **WS** : 1 flacon de 50 ml de solution de lavage (Wash Solution), 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 provenant de différents lots de kits pour réaliser un dosage.

MATERIEL NECESSAIRE ET NON FOURNI :

- Pipettes à 8 canaux permettant de distribuer des volumes de 50 à 300 μ l.
- Pipettes à volume variable de 0 à 20 μ l, de 20 à 200 μ l et de 200 à 1000 μ l.
- Laveuse de microplaques et agitateur.
- Lecteur de microplaques ELISA réglée à une longueur d'ondes 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. **B2F-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. **β_2 GPI Calibrator** : Chaque flacon doit être reconstitué par 2 ml de diluant échantillon ("B2F-Sample Diluent", SD) afin d'obtenir un standard contenant « C » ng/ml de β_2 GPI. Après reconstitution, ce flacon est stable au moins 8 heures à température du laboratoire (18-25°C) ou 72 heures à 2-8°C.
4. **(h) β_2 GPI Control I (contrôle haut)** : reconstituer avec 1 ml de diluant échantillon (B2F-sample diluent, SD).
5. **(h) β_2 GPI Control II (contrôle bas)** : reconstituer avec 1 ml de diluant échantillon (B2F-sample diluent, SD).

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

Précautions : La B₂GPI humaine utilisée pour la préparation des calibrateur (3) et contrôles (4&5) est purifiée 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)- β_2 GPI-HRP immunoconjugué** : Chaque flacon d'immunoconjugué doit être reconstitué par 7.5 ml de "B2F-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 4 semaines à 2-8°C.
7. **B2F-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 0,45M, 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. Conserver les réactifs inutilisés à 2-8°C.

Les études de vieillissement, réalisées à 30°C pendant 3 semaines, montrent que les réactifs peuvent être expédiés à température ambiante, sans aucun dommage.

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 8 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 4 heures à température du laboratoire. L'utilisation de plasma provenant de sang prélevé sur Na_2 EDTA est possible. Les conditions de conservation sont les mêmes que celles préconisées pour le plasma citraté.

Plasma ou échantillon à tester et contrôles :

- L'échantillon à tester doit être dilué de façon à ce que le taux attendu de β_2 GPI dans la dilution testée soit **< 100 ng/ml**.

A titre d'exemple, un plasma humain doit être analysé dilué au **1/4000** dans le diluant échantillon (B2F-Sample Diluent).

Des dilutions importantes étant nécessaires, procéder par dilutions successives de la façon suivante pour une meilleure précision :

Ajouter 20 μ l de plasma à tester dans 180 μ l de B2F-Sample Diluent (D=1/10) ; bien mélanger.

Puis ajouter 20 μ l de cette dilution au 1/10^{ème} dans 180 μ l de B2F-Sample Diluent (D=1/10) ; bien mélanger (D=1/100 final).

Puis ajouter 20 μ l cette dilution au 1/100^{ème} dans 780 μ l de B2F-Sample Diluent (D=1/40). On obtient ainsi une dilution finale au **1/4000** pour l'échantillon à tester.

Les plasmas contrôles **CI** et **CII**, repris par **1ml** de «B2F-Sample Diluent», sont pré-dilués au 1/4000 et doivent être testés « purs ».

- Pour les échantillons à tester autres que le plasma, ajuster la dilution en fonction de la concentration attendue de β_2 GPI, de manière à ce que cette dernière soit comprise entre 5 et 100ng/ml. Pour éviter l'effet matrice, utiliser une dilution d'au moins 1/5 en diluant échantillon (SD).

Gamme d'étalonnage :

En utilisant le **Calibrateur β_2 GPI** à « **C** » **ng/ml** contenu dans le coffret, préparer la gamme d'étalonnage suivante selon le tableau ci-dessous :

Concentration de β_2 GPI Ag (en ng/ml)	C	C/2	C/4	C/10	C/20	0
Vol. de calibrateur β_2 GPI	1 ml	0.5 ml	0.25 ml	0.1 ml	0.05 ml	0 ml
Vol. de B2F-Sample Diluent	0 ml	0.5 ml	0.75 ml	0.9 ml	0.95 ml	1 ml

Agiter délicatement pour homogénéiser.

Les dilutions sont stables au moins **4 heures** à température ambiante.

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)-B2GPI-HRP reconstitué par 7.5 ml de diluant pour immunoconjugué	200 μ l	Introduire l'immunoconjugué dans les puits.
Calibrateur B2GPI, échantillons à doser dilués au 1/4000 ou contrôles, ou B2F-Sample Diluent (blanc)	50 μ l	Introduire la gamme d'étalonnage ou le plasma dilué dans les puits (a).
Incuber 1 heure à température du laboratoire (18-25°C) (b)		
Solution de lavage (diluée 20 fois en eau distillée avant utilisation)	300 μ l par puits	Effectuer une série de 5 lavages (b).
Substrat TMB / H ₂ O ₂	200 μ l	Immédiatement, introduire cette solution dans les puits (c, d). <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	50 μ l	Respecter le même temps de répartition, barrette par barrette, que celui utilisé pour le substrat.
Attendre 10 minutes pour laisser stabiliser la coloration puis lire la DO obtenue à 450 nm (e) . Soustraire la valeur des blancs.		

Remarques :

- Effectuer les dépôts de l'étalonnage, des contrôles et des tests, le plus rapidement possible (ne pas excéder 10 minutes), pour une cinétique homogène des divers dosages.
- 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 microplaques 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.
- Lors de la distribution 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.
- Pour une lecture bichromatique, le filtre 620 nm ou 690 nm peut être utilisé comme longueur d'onde de référence.

EXPRESSION DES RESULTATS :

- Sur du papier millimétré, porter en abscisses le taux de **β_2 GPI Ag**, en **ng/ml**, et en ordonnées les **DO 450** correspondantes (voir modèle présenté sur le papillon).
- Pour la mesure des taux de β_2 GPI:Ag, seule la courbe d'étalonnage effective réalisée pour la série de dosages doit être utilisée. Sur la courbe obtenue, déduire la concentration de β_2 GPI Ag dans l'échantillon testé. Pour obtenir la concentration en β_2 GPI de l'échantillon non dilué, **multiplier le taux obtenu par le facteur de dilution utilisé** (ex : x4000 pour une dilution « classique »).
- Pour les **contrôles I et II**, la concentration mesurée est lue directement sur la courbe.
- Les logiciels spécifiques pour test ELISA (DYNEX, BIOLISE, etc..) peuvent être utilisés pour déterminer directement la concentration de tPA Ag 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.

BIOCHIMIE :

La β_2 GPI (beta 2-glycoprotéine I, ou apolipoprotéine H) est une glycoprotéine d'environ 50kD, présentant une forte affinité pour les surfaces phospholipidiques chargées négativement.

Son rôle physiologique est encore mal connu ; cependant elle semblerait présenter des propriétés anticoagulantes en interférant avec les phospholipides anioniques où se produisent les réactions de coagulation.

La concentration de β_2 GPI Antigène dans le plasma humain normal est généralement d'environ 200 μ g/ml (environ 180 \pm 100 μ g/ml déterminée avec le kit Zymutest B2GPI)

CARACTERISTIQUES :

- Limite de détection \leq 5ng/ml (en lecture directe)
- CV intra-essai: 3-8%.
- CV inter-essais : 5-10%.
- Référentiel : Le calibrateur β_2 GPI de la trousse de dosage ZYMUTEST β_2 GPI est établi par rapport à un pool de plasmas humains normaux citratés, et par rapport à une préparation de référence de β_2 GPI humaine purifiée dont la concentration protéique a été très précisément déterminée par Lowry.

Changement par rapport à la précédente version.