



# ZYMUTEST Anti-PROTEINE S

## Isotype - IgM

Référence RK020B

Auto-anticorps Anti-Protéine S, d'isotype IgM par méthode ELISA.

POUR LA RECHERCHE UNIQUEMENT.

NE PAS UTILISER DANS LES PROCÉDURES DE DIAGNOSTIC

Dernière révision : 20/10/2022

### MÉTHODE :

La trousse ZYMUTEST Anti-Protéine S IgM est un dosage ELISA sandwich destiné à la recherche des autoanticorps anti-Protéine S d'isotype IgM, utilisable sur plasma humain ou sérum ou tout autre fluide biologique où ces anticorps doivent être mesurés.

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

### PRINCIPE :

La recherche des anticorps anti-Protéine S, avec le coffret ZYMUTEST anti-Protéine S, est réalisée à l'aide d'une plaque ELISA, sensibilisée par la Protéine S humaine, puis stabilisée.

Le plasma ou le sérum à tester sont introduits dans l'un des puits de la plaque sensibilisée. Les auto-anticorps anti-Protéine S d'isotype IgM, quand ils sont présents, se fixent sur la Protéine S immobilisée. Après lavage, les anticorps ainsi fixés sont révélés par l'immunoconjugué, anticorps polyclonal de chèvre spécifique de la partie  $\mu$  de l'IgM humaine et couplé à la peroxydase (HRP). Cet immunoconjugué réagit spécifiquement avec l'auto-anticorps anti-Protéine S d'isotype IgM. Après lavage, le substrat, 3,3',5,5' - Tetraméthylbenzidine (TMB) en présence d'eau oxygénée, est introduit dans les puits et une coloration bleue se développe. L'arrêt de la réaction par l'acide sulfurique fait virer la coloration au jaune. Cette coloration est proportionnelle à la quantité d'autoanticorps anti-Protéine S d'isotype IgM présente dans l'échantillon testé.

### ECHANTILLONS :

- Plasma humain prélevé sur anticoagulant citraté ou Na<sub>2</sub> EDTA ou sérum.
- Tout autre liquide biologique où la recherche d'auto-anticorps anti-Protéine S d'isotype IgM doit être effectuée.

### REACTIFS :

1. **COAT** : Microplaque ELISA (Micro ELISA plate), contenant 12 barrettes de 8 puits, sensibilisée avec de la Protéine S humaine, stabilisée, et emballée dans un sachet aluminium en présence d'un déshydratant.
2. **SD** : 2 flacons de 50 ml de diluant échantillon pour tests auto-immuns (Autoimmunity-Sample Diluent), prêt à l'emploi (contient de l'azide de sodium).
3. **CAL** : 3 flacons de calibrateur lyophilisé (Anti-Protein S, IgM calibrator). A reconstituer par 1 ml de diluant échantillon, afin d'obtenir le calibrateur prêt à l'emploi (déjà dilué au 1/100).  
Ce calibrateur a une concentration définie d'anti-protéine S, exprimée en Unités Arbitraires (UA) et indiquée sur le papillon fourni dans le coffret.
4. **C-** : 3 flacons de contrôle négatif lyophilisé, plasma humain normal dilué (negative control). A reconstituer par 1 ml de diluant échantillon, afin d'obtenir le contrôle négatif prêt à l'emploi (déjà dilué au 1/100).
5. **IC** : 3 flacons d'Immunoconjugué (Anti-IgM ( $\mu$ )-HRP immunoconjugate), anticorps polyclonal de chèvre, spécifique de la partie  $\mu$  de l'IgM humaine, couplé à la peroxydase, et lyophilisé.
6. **CD** : 1 flacon de 25 ml de diluant pour immunoconjugué (Conjugate Diluent), prêt à l'emploi.
7. **WS** : 1 flacon de 50 ml de solution de lavage (Wash Solution), 20 fois concentrée.
8. **TMB** : 1 flacon de 25 ml de substrat : 3,3',5,5' - Tetraméthylbenzidine, contenant de l'eau oxygénée.
9. **SA** : 1 flacon de 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 kit pour effectuer un dosage.

### MATERIEL NECESSAIRE ET NON FOURNI :

- Pipettes à 8 canaux permettant de distribuer des volumes de 50 à 300  $\mu$ l
- Pipettes à volume variable de 0 à 20  $\mu$ l, de 20  $\mu$ l à 200 et de 200  $\mu$ l à 1000  $\mu$ l
- Matériel de lavage pour microplaques et agitateur.
- Lecteur de microplaques ELISA réglé 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 quatre semaines dans leur emballage d'origine, hermétiquement fermé, en présence du déshydratant, à l'abri de l'humidité, à 2-8°C, dans le sachet plastique minigrp fourni.

2. **Autoimmunity-Sample-Diluent** : Le réactif est prêt à l'emploi. Après ouverture, il peut être conservé à 2-8°C, pendant quatre semaines, en prenant soin d'éviter toute contamination lors de l'utilisation.
3. **Calibrator** : Chaque flacon doit être reconstitué avec 1 ml de "Autoimmunity-Sample-Diluent". Le calibrateur ainsi reconstitué est prêt à l'emploi et correspond à un plasma contenant des auto-anticorps anti-Protéine S d'isotype IgM, déjà dilué au 1/100. Après reconstitution, ce flacon peut être conservé à 2-8°C, pendant cinq jours, en prenant soin d'éviter toute contamination lors de l'utilisation.
4. **Contrôle négatif** : Chaque flacon doit être reconstitué avec 1 ml de "Autoimmunity-Sample-Diluent". Le contrôle négatif ainsi reconstitué est prêt à l'emploi et correspond à un plasma négatif déjà dilué au 1/100. Après reconstitution, ce flacon peut être conservé à 2-8°C, pendant deux semaines, en prenant soin d'éviter toute contamination lors de l'utilisation.

**Précautions :** La protéine S humaine utilisée pour la sensibilisation des plaques est extraite de plasma humain. Le contrôle négatif est également préparé avec des 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.

5. **Anti-IgM ( $\mu$ )-HRP immunoconjugate** : 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.
6. **Conjugate Diluent** : Le réactif est prêt à l'emploi. Après ouverture, il peut être conservé à 2-8°C, pendant quatre semaines, en prenant soin d'éviter toute contamination lors de l'utilisation.
7. **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 quatre 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.
8. **TMB substrate** : Substrat TMB prêt à l'emploi. Après ouverture, il peut être conservé à 2-8°C, pendant quatre semaines, en prenant soin d'éviter toute contamination lors de l'utilisation.
9. **0,45 M Sulfuric Acid** : Solution contenant 0,45 M d'acide sulfurique, prête à l'emploi.

**Nota :** Sortir le coffret du réfrigérateur, au moins 30 min. avant de réaliser le dosage, afin que les divers réactifs s'équilibrent à température du laboratoire. Conserver les réactifs inutilisés à 2-8°C.

### 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 au moins, pendant 6 mois maximum. 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<sub>2</sub> EDTA est possible. Les conditions de conservation sont les mêmes que celles préconisées pour le plasma citraté.

L'utilisation de sérum est possible pour la recherche des auto-anticorps anti-Protéine S. Il est toutefois préférable d'effectuer les dosages sur plasma.

#### Plasma ou échantillon à tester :

Le plasma ou le sérum à tester sont analysés dilués au 1/100 dans le diluant échantillon (Sample-Diluent Autoimmunity). En présence d'échantillons avec un taux très élevé d'anticorps anti-Protéine S, diluer au 1/200 ou 1/400. Les résultats obtenus devront alors être multipliés par 2 ou 4.

Les calibrateurs et les contrôles négatifs sont prêts à l'emploi et correspondent à des plasmas déjà dilués au 1/100.

#### Réalisation du dosage :

**Courbe de calibration** : Une courbe de calibration peut être obtenue à partir du calibrateur inclus dans le coffret. La concentration (C) est donnée en Unités Arbitraires, (UA) et indiquée sur le papillon fourni dans le kit. Préparer les solutions standards en effectuant une série de dilutions de rythme 2 du calibrateur (gamme allant de C/1 à C/32) en diluant échantillon (Autoimmunity Sample Diluent).

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 micro-barrettes ELISA et réaliser le dosage comme indiqué dans le tableau ci-après :

Réactif	Volume	Procédure
Dilution du calibrateur anti-Protéine S IgM ou Contrôle Négatif ou Echantillon à doser dilué au 1/100 ou Diluant échantillon (blanc)	200 µl	Introduire le : – calibrateur ou – contrôle négatif ou – l'échantillon à doser ou – Diluant échantillon dans les puits.
<b>Incuber 30 minutes à température du laboratoire (18-25°C) (a, b).</b>		
Solution de lavage (diluée 20 fois en eau distillée avant utilisation)	300 µl par puits	Vider les puits et effectuer une série de 5 lavages (b).
Immunoconjugué (Anti-IgM (µ)-HRP conjugué) (reconstitué par 7.5 ml de diluant pour immunoconjugué)	200 µl	Introduire l'immunoconjugué dans les puits.
<b>Incuber 30 minutes à température du laboratoire (18-25°C) (a).</b>		
Solution de lavage (diluée 20 fois en eau distillée avant utilisation)	300 µl par puits	Vider les puits et effectuer une série de 5 lavages (b).
Substrat TMB/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	200 µl	Immédiatement, introduire cette solution dans les puits. <i>Nota</i> : la répartition du substrat, barrette par barrette, doit se faire très précisément (c)
<b>Laisser la coloration se développer pendant 5 minutes à température du laboratoire (18-25°C) (a).</b>		
Acide sulfurique 0,45 M	50 µl	Arrêter la réaction en introduisant 0,45 M d'acide sulfurique. Respecter le même temps de répartition, barrette par barrette, que celui utilisé pour le substrat (c).
<b>Attendre 10 minutes pour laisser stabiliser la coloration puis lire la DO obtenue à 450 nm (d). Soustraire les blancs</b>		

**Remarques :**

- 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 microplaque 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, la longueur d'onde de référence utilisée peut être à 620 nm ou à 690 nm.

**VALIDATION :**

- Le calibrateur et le contrôle négatif fournis dans le coffret, permettent de valider la bonne réalisation du dosage.
- Les DO attendues pour le calibrateur et le contrôle négatif peuvent varier de lot à lot mais, lorsque le dosage est réalisé à température du laboratoire, entre 18 et 25°C, ces DO sont toujours de :

**P = DO Calibrateur 1/1 : ≥ 1.5**

**N = DO Contrôle Négatif : ≤ 0.25**

Les valeurs obtenues pour P et N, à 18-25°C, sont indiquées pour chaque lot de réactif dans le papillon inclus dans le coffret.

**EXPRESSION DES RESULTATS :**

- Les résultats sont exprimés à l'aide des DO450 obtenues pour la gamme d'étalonnage, les échantillons, et le contrôle, et les taux sont déterminés à l'aide de la courbe de calibration.
- Sur papier millimétré, porter les concentrations d'anti-protéine S exprimées en UA sur l'axe des abscisses et les DO correspondantes en ordonnées. La concentration d'anti-protéine S, d'isotype IgM pour l'échantillon testé, à la dilution standard 1:100, et exprimé en UA, est directement déduite de la courbe d'étalonnage.
- Pour des dilutions plus importantes, (ex : D), la concentration mesurée doit être multipliée par le facteur de dilution complémentaire (soit : D:100 ; par exemple x2 pour 1:200 ou x4 pour 1:400).

Alternativement, un logiciel spécifique (ex: Dynex, Biolise, etc...) peut être utilisé pour le calcul des concentrations.

**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.**

**Interprétation des résultats**

Une courbe de calibration est utilisée pour calibrer le test, en utilisant une gamme de dilution de rythme 2. Ceci permet d'obtenir une meilleure reproductibilité et fiabilité du test, et une meilleure précision des mesures de lot à lot, ainsi qu'une meilleure définition de la valeur seuil.

**Zone négative:** Les unités arbitraires (UA) du calibrateur, sont définies par rapport à la limite supérieure de la zone normale, qui correspond à la valeur moyenne obtenue sur les plasmas normaux majorée de 2 écart types (SD). Par définition, cette valeur correspond à 10 UA. Ainsi, les valeurs normales sont :

**Zone négative : < 10 UA/ml**

**Zone douteuse:** Zone douteuse : ≥ 10 UA/ml et < 20 UA/ml

**Zone positive:** La zone positive est définie pour les concentrations suivantes d'autoanticorps anti-Protéine S :

**Zone positive : ≥ 20 UA/ml**

La positivité peut être classée de la façon suivante:

**Faible positivité:** ≥ 20 à < 50 UA/ml  
**Positivité modérée :** ≥ 50 à < 100 UA/ml  
**Forte positivité :** ≥ 100 UA/ml

**Limites de la méthode :**

Un lavage insuffisant de la plaque peut se traduire par un "bruit de fond" élevé et une valeur trop forte du contrôle négatif. Vérifier que le lavage est efficace et correctement effectué.

**Réactivité du test :**

Le coffret ZYMUTEST anti-Protein S, d'isotype IgM, mesure spécifiquement les autoanticorps anti-Protéine S d'isotype IgM, réactifs avec la Protéine S insolubilisée. Il ne mesure pas les isotypes IgG ou IgA.