

CE

REF BIO82
Plat De 96 Puits



ARGUTUS MEDICAL

Serum Collagen IV EIA

Test immunoenzymatique

Notice d'utilisation

Fabricant: Daiichi Fine Chemical Co., Ltd. Japan

TABLE DES MATIERES

OBJET	3
CONTEXTE CLINIQUE	3
PRINCIPE DU DOSAGE	3
COMPOSITION DU COFFRET	4
PRECAUTIONS D'EMPLOI	4
CONDITIONS DE CONSERVATION ET STABILITE	5
MATERIEL NECESSAIRE MAIS NON FOURNI	6
PREPARATION DES REACTIFS	6
PREPARATION ET CONSERVATION DES ENCHANTILLONS	6
MODE OPERATOIRE	7
CALCUL DES RESULTATS	7
LIMITES DU TEST	7
PERFORMANCES DU TEST	8
EXEMPLE DE LA COURBE D'ETALONNAGE	9
RESPONSABILITE	10
BIBLIOGRAPHIE	10

OBJET

La trousse Argutus Medical Serum Collagen IV EIA permet la détermination quantitative du collagène IV dans le sérum humain. Veuillez contacter Argutus Medical pour des informations supplémentaires concernant le dosage du collagène IV sur d'autres prélèvements.

CONTEXTE CLINIQUE

Les maladies chroniques du foie correspondent à un dysfonctionnement progressif qui aboutit à une cirrhose hépatique. Elles sont caractérisées par un dépôt excessif de collagène.

Même si la quantité de plusieurs types de collagène (type I, III, IV, V et VI) augmente dans le foie au fur et à mesure du développement de la fibrose, il apparaît que le collagène IV, constituant de la membrane basale, se distingue plus particulièrement des autres types. D'abord, le taux de collagène IV sérique est corrélé avec le taux hépatique. Ensuite, le taux sérique de collagène IV diminue en réponse à une thérapie efficace¹. Enfin, le collagène IV est le premier type synthétisé lors d'une lésion expérimentale du foie^{2,3}.

Le taux de collagène IV sérique est élevé dans plusieurs cas de maladies du foie⁴⁻⁶. Mais, plus particulièrement, il permet de prédire la réponse thérapeutique dans le cas d'infection par l'hépatite C⁷ et chez les personnes anciennement alcooliques, il est un indicateur sensible d'une réponse au traitement¹.

PRINCIPE DU DOSAGE

La trousse Argutus Medical Serum Collagen IV EIA permet de tester le collagène IV sérique. Il s'agit d'un test EIA en phase solide de type "one-step sandwich". Le Collagène IV présent dans l'échantillon se lie simultanément à un anticorps monoclonal fixé au fond des micropuits et à un anticorps monoclonal conjugué à l'enzyme dirigé contre les différents sites antigéniques. La molécule du Collagène IV est alors prise "en sandwich" entre la phase solide et les anticorps marqués par l'enzyme. Les éléments non fixés sont éliminés par lavage. La plaque est ensuite incubée avec du substrat de l'enzyme. Il se développe alors une coloration. L'intensité de la coloration est directement proportionnelle à la quantité de collagène IV dans l'échantillon.

COMPOSITION DU COFFRET

1. Microplaque enduite d'anticorps: 12 barrettes de 8 puits sensibilisés avec des IgG dirigées contre le collagène IV humain. PRET A L'EMPLOI

PLA

2. Standards: Collagène IV purifié dans du tampon phosphate (pH 7.0) avec du sérum albumine bovin. Solution stock de 1000 µg/L (1 mL) Contient 0,015% de Genetecin comme conservateur. SOLUTION STOCK

CAL


3. Tampon de Dilution: Tampon phosphate (pH 7.0) contenant du sérum albumine bovin et du sérum de cheval (10 mL). Contient 30 mg/L de Procline 300 comme conservateur. PRET A L'EMPLOI

BUF	DIL	1X
-----	-----	----
4. Conjugué: Anti-Collagène IV de souris conjugué à la peroxydase de Raidort (20 mL). Contient 30 mg/L de Procline 300 comme conservateur. PRET A L'EMPLOI

CONJ	1X
------	----
5. Solution de Lavage Concentrée: tampon phosphate concentré 10X avec du Tween 20 PBT (2 flacons de 50 mL). Contient 30 mg/L de Procline 300 comme conservateur. CONCENTRE

BUF	WASH	10X
-----	------	-----
6. Substrat: solution stabilisée de TMB (15 mL). PRET A L'EMPLOI

SUBS	TMB
------	-----
7. Solution d'Arrêt: Acide sulfurique 1M (15 mL). PRET A L'EMPLOI

SOLN	STP
------	-----
8. Couvercle
9. Microplaque vierge
10. Notice d'utilisation 

PRECAUTIONS D'EMPLOI

SECURITE

- La trousse Argutus Medical Serum Collagen IV EIA est à utiliser pour le diagnostic *in vitro* seulement.
- Ce coffret doit être uniquement utilisé par un personnel de laboratoire qualifié.
- Le coffret contient des produits d'origine humaine qui ont été testés négatifs pour l'antigène de surface Hépatite B, Hépatite C et anticorps VIH. Toutefois, comme aucun test ne peut certifier l'absence d'agents infectieux, tous ces réactifs doivent être considérés comme potentiellement infectieux.

- La Solution d'Arrêt contient de l'acide sulfurique qui est corrosif. Eviter tout contact avec la peau et les yeux. En cas de contact, rincer immédiatement avec de l'eau et consulter un médecin.
- Le Substrat contient du TMB qui peut irriter la peau et les membranes muqueuses. En cas de contact avec la peau, rincer avec de l'eau.
- L'élimination des échantillons, produits infectieux ou potentiellement infectieux doit se faire en accord avec les Bonnes Pratiques de Laboratoire. Tous ces produits doivent être manipulés et éliminés comme des produits potentiellement infectieux.
- Tous les résidus de réactifs, préparations ou produits chimiques, doivent être considérés comme dangereux. Il est indispensable de les éliminer selon les procédures standard de sécurité.
- Porter des vêtements protecteurs, des gants jetables stériles en latex et des lunettes de protection lors de la manipulation des échantillons et de la réalisation du test. Se laver les mains minutieusement à l'issue du test.
- Ne pas pipeter avec la bouche et ne jamais manger ou boire sur la paillasse de laboratoire.

PROCEDURE

- Ne pas utiliser le kit ou les réactifs après la date de péremption.
- Ne pas mélanger ou remplacer des réactifs provenant de lots différents.
- Le non-respect du protocole peut conduire à des résultats erronés.
- La réalisation du test sans le respect des températures et des temps indiqués peut conduire à des résultats erronés. Dans ce cas, le dosage devra impérativement être répété.
- L'ajout de réactif doit se faire au centre du puits, en prenant soin de ne pas érafler les côtés du puits avec la pipette ou le cône.
- Ne pas laisser sécher les puits pendant toute la durée du dosage.
- Eviter toute contamination inter-réactifs et inter-puits et changer de cône à usage unique pour chaque échantillon et composant.
- Ne pas utiliser une solution trouble ou présentant un précipité.
- S'assurer que la Solution de Lavage Concentrée soit bien mélangée et qu'il ne reste plus aucuns cristaux avant la dilution.
- De l'eau distillée ou désionisée de qualité supérieure est nécessaire pour la reconstitution du Tampon de Lavage. L'utilisation d'eau de mauvaise qualité ou contaminée peut entraîner un bruit de fond à la lecture des résultats.
- Attendre que tous les réactifs soient à température ambiante (20-27°C) et bien les mélanger avant utilisation.
- Eviter de laisser les réactifs à la lumière directe du soleil et/ou à des températures dépassant 2-8°C de façon prolongée.
- Toujours utiliser du matériel en verre propre, de préférence à usage unique, pour la préparation de tous les réactifs.
- S'assurer que le fond de la plaque est propre et sec avant lecture des résultats.
- Etablir un plan d'identification et de distribution avant de commencer la manipulation.

CONDITIONS DE CONSERVATION ET STABILITE

1. Tous les réactifs doivent être conservés entre 2-8°C. Ils sont stables jusqu'à la date de péremption figurant sur l'étiquette de l'emballage.
2. La Solution de Lavage préparée (PBT) est stable 1 mois à condition d'être conservée à 2-8°C.
3. La solution de standard préparée ne doit pas être conservée.

4. Les micropuits doivent toujours être conservés dans le sachet fermé hermétiquement, avec le dessicatif et ce entre 2 et 8°C. Remettre rapidement au réfrigérateur les micropuits non utilisés dans le sachet de conservation avec le dessicatif.

MATERIEL NECESSAIRE MAIS NON FOURNI

1. Micropipettes de 20 µL et 150 µL et pipette multicanaux de 100-150 µL.
2. Laveur de microplaques automatique.
3. Lecteur de plaque ELISA avec filtre à 450 nm avec longueur d'onde de référence à 630 nm si disponible.
4. Bécher de 1 litre.
5. Chronomètre.
6. Bain-Marie.
7. Eau désionisée ou distillée.
8. Eprouvette graduée 500 mL.

PREPARATION DES REACTIFS

SOLUTION DE LAVAGE (PBT)

Diluer le Concentré de Lavage au 1/10 ème en ajoutant, par exemple, 10 mL de la Solution de Lavage Concentrée avec 90 mL d'eau désionisée. Préparer uniquement le volume de Solution de Lavage nécessaire pour le dosage. Chaque étape de lavage nécessite 15 mL de Solution de Lavage.

S'assurer que les cristaux de sel sont dissous avant de procéder à la dilution.

Si nécessaire, chauffer doucement le Concentré de Lavage à 37°C pendant 30 minutes pour dissoudre les cristaux de sel.

STANDARDS

Les standards seront préparés dans des tubes étiquetés de la manière suivante:

Concentration (µg/L) en Collagène IV	Solution Standard (µL)	Tampon de dilution (µL)
1 000 (A)	150 (A) (Solution stock)	-
500 (B)	150 (A)	150
250 (C)	150 (B)	150
125 (D)	150 (C)	150
62,5 (E)	150 (D)	150
31,2 (F)	150 (E)	150
15,6 (G)	150 (F)	150
0 (H)	-	150

Les standards doivent être préparés juste avant leur utilisation. Ils ne peuvent pas être conservés. Les standards dilués sont stables uniquement 6 heures à 2-8 °C.

PREPARATION ET CONSERVATION DES ECHANTILLONS

Conserver les échantillons à 2-8°C pour un dosage réalisé la semaine qui suit. Pour une conservation prolongée, les échantillons doivent être congelés à -20°C et ce jusqu'à 12 mois. Eviter la répétition des cycles de congélation-décongélation.

MODE OPERATOIRE

Remarque: Attendre que tous les réactifs soient à température ambiante avant de démarrer le dosage.

1. CONTACT AVEC LE CONJUGUE

- 1.1 Préparer la solution de lavage et les standards : voir paragraphe "préparation des réactifs".
- 1.2 Déposer en double sur la microplaque vierge (Vinyl), les standards (**H - A : de 0 à 1000 µg/L**) et les échantillons (**20 µL/puits**).
- 1.3 Ajouter **150 µL** de conjugué dans chaque puits.

2. IMMUNOREACTION

- 2.1 Placer le nombre nécessaire de micropuits enduits sur la plaque (16 pour les standards et 2 pour chaque échantillon).
- 2.2 Transférer **100 µL** des solutions préparées ci-dessus dans les puits correspondants de la microplaque enduite d'anti-Collagène IV.
- 2.3 Couvrir la microplaque avec le couvercle et incuber à température ambiante (20-27°C) pendant exactement **30 minutes**.
- 2.4 Enlever le couvercle et laver chaque puits 3 fois avec la solution de lavage (**350 µL/puits**). Après lavage, bien sécher la plaque en tapotant celle-ci sur du papier absorbant de manière à vider complètement le liquide de lavage.

3. DEVELOPPEMENT DE LA COLORATION

- 3.1 Déposer **100 µL** de substrat dans chacun des puits en utilisant une pipette multicanaux. Incuber à température ambiante (20-27°C) pendant exactement **30 minutes**.

4. ARRET DE LA REACTION

- 4.1 Ajouter **100 µL** de la solution d'arrêt dans chacun des puits à l'aide d'une pipette multicanaux. S'assurer du parfait mélange du substrat avec la solution d'arrêt.
- 4.2 Lire **immédiatement** la densité optique à 450 nm en utilisant 630 nm comme longueur d'onde de référence (si disponible).

CALCUL DES RESULTATS

1. Calculer l'absorbance moyenne de chaque standard et échantillon.
2. A partir d'une échelle log-log, tracer la courbe standard des absorbances obtenues ($A_{450/630nm}$) en fonction de la concentration en Collagène IV (15,6 - 1000 µg/L).
3. En utilisant la moyenne des absorbances de chaque échantillon, lire sur la courbe de calibration la concentration en Collagène IV µg/L.
4. Si les échantillons ont été dilués, multiplier la concentration de Collagène IV obtenue par le facteur de dilution correspondant afin d'obtenir la réelle concentration en Collagène IV.

LIMITES DU TEST

Les résultats du test doivent être confrontés aux données cliniques du patient et aux résultats des autres tests biologiques.

PERFORMANCES DU TEST

VALEURS DE REFERENCE

Basées sur des volontaires japonais sains, les valeurs de référence normales en Collagène IV sont de $99 \pm 23 \mu\text{g/L}$, Moyenne $\pm 1\text{SD}$, (N=180).

LIMITE DE DETECTION

La limite de détection de la trousse Argutus Medical Serum Collagène IV EIA est $15,6 \mu\text{g/L}$.

GAMME DE MESURE

La courbe de calibration va de $15,6$ à $1000\mu\text{g/L}$. Cette gamme peut être étendue par dilution croissante des échantillons.

SPECIFICITE

La trousse Argutus Medical Serum Collagène IV EIA est hautement spécifique dans la détection du collagène IV. Une réaction croisée est inférieure à 2 % avec le collagène II et inférieure à 0,5 % avec d'autres types de collagène.

SENSIBILITE

Au moment de la lecture sur la courbe d'étalonnage $A_{450\text{nm}}$ la DO du standard $1000 \mu\text{g/L}$ doit être supérieure à 0,6

INTERFERENCE

Pour ce dosage, aucune interférence significative n'a été observée avec des échantillons lipémiques, hémolytiques ou ictériques.

- Echantillons lipémiques: moins de 10% d'interférence avec un échantillon contenant jusqu'à 1200 unités de Formazine.
- Echantillons hémolytiques: moins de 10% d'interférence avec un échantillon contenant jusqu'à 3 g/L d'hémoglobine.
- Echantillons ictériques: moins de 10% d'interférence avec un échantillon contenant jusqu'à 0,2 g/L de bilirubine.

RECOUVREMENT PAR DILUTION

Ci-après les résultats des dilutions d'échantillons contenant un taux élevé en Collagène IV :

Echantillon	Dilution au :								
	1/2			1/4			1/8		
	Attendu $\mu\text{g/L}$	Obtenu $\mu\text{g/L}$	Recouvrement %	Attendu $\mu\text{g/L}$	Obtenu $\mu\text{g/L}$	Recouvrement %	Attendu $\mu\text{g/L}$	Obtenu $\mu\text{g/L}$	Recouvrement %
A	57	61	107	28	32	114	14	16	114
B	107	110	103	53	58	109	27	28	104
C	259	270	104	130	139	107	65	67	103

REPRODUCTIVITE

Variation intra-dosages de la trousse Argutus Medical Serum Collagen IV EIA

Echantillon	\bar{X} [Collagène IV] µg/L	SD	% CV	N
Faible	119	7,4	6,2	8
Moyen	218	7,8	3,6	8
Fort	520	12	2,3	8

Variation inter-dosages de la trousse Argutus Medical Serum Collagen IV EIA

Echantillon	\bar{X} [Collagène IV] µg/L	SD	% CV	N
Faible	115	11	9,6	6
Moyen	291	13	4,5	6
Fort	370	31	8,2	6

Variation inter-lots de la trousse Argutus Medical Serum Collagen IV EIA calculé sur 3 lots différents

Echantillon	\bar{X} [Collagène IV] µg/L	SD	% CV	N
Faible	115	5	4,3	3
Moyen	270	6	2,2	3
Fort	386	16	4,1	3

EXEMPLE DE LA COURBE D'ETALONNAGE

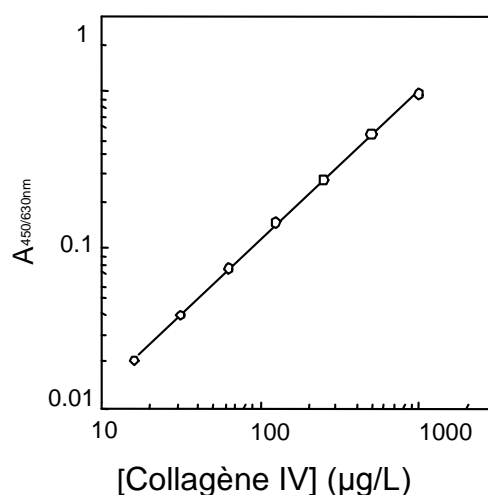


Figure 2: Courbe d'étalonnage type obtenue avec la trousse Argutus Medical Serum Collagen IV EIA.
Tracé de A_{450nm/630nm} en fonction de [Collagène IV] µg/L.
La gamme de mesure est comprise entre 15.6 - 1000 µg/L.

RESPONSABILITE

Les performances présentées ici ont été obtenues en suivant la procédure décrite. Toute modification de procédure non recommandée par Argutus Medical peut affecter les résultats obtenus. Dans ce cas, Argutus Medical décline toute responsabilité expresse, tacite ou statutaire. Argutus Medical ne peut, alors, pas être tenu pour responsable des dommages, directs ou indirects, subis par l'utilisateur.

BIBLIOGRAPHIE

- 1) **Tsutsumi, M. et al.** (1996). Serum biomarkers for hepatic fibrosis in alcoholic liver disease: which is the better biomarker, type III procollagen, type IV collagen, laminin, tissue inhibitor of metalloprotease or prolyl hydroxylase? *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. **20(9)**, 1512-1517.
- 2) **Gay, S. and Miller, E.J.** (1983). What is collagen, what is not. *Ultrastruct. Pathol.* **4**, 365-377.
- 3) **Dingleman, R.F. et al.** (1983). Collagen formation by the hepatocyte in primary monolayer culture and *in vivo*. *Science*. **219**, 1343-1345.
- 4) **Obata, K. et al.** (1989). One step sandwich enzyme immunoassay for human type IV collagen using monoclonal antibodies. *Clin. Chim. Acta.* **181**, 293- 304.
- 5) **Yokoya, Y. et al.** (1992). Concentration of serum laminin and type IV collagen in liver diseases assayed by a sandwich enzyme-immunoassay using monoclonal antibodies. *Clin. Chim. Acta.* **210**, 109-118,
- 6) **Ueno, T. et al.** (1992). Significance of serum type-IV collagen levels in various liver diseases. *Scandinavian Journal of Gastroenterology.* **27**, 513-520.
- 7) **Yabu, K. et al.** (1994). Serum collagen IV for the assessment of fibrosis and resistance to Interferon therapy in chronic hepatitis C. *Scandinavian Journal of Gastroenterology.* **29**, 474-479.



ARGUTUS MEDICAL

**Argutus Medical Ltd.
Unit 9 Trinity Technology & Enterprise Campus,
Pearse Street,
Dublin 2,
Ireland**

Tel: +353 1 670 8576

Fax: +353 1 670 8575

info@argutusmed.com

<http://www.argutusmed.com>

Fabricant : Daiichi Fine Chemical Co., Ltd., Japan.

Colls-278-07 03/09FR