

CE

REF BIO83
Plat De 96 Puits



ARGUTUS MEDICAL

Urinary 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	4
COMPOSITION DU COFFRET	4
PRECAUTIONS D'EMPLOI	5
CONDITIONS DE CONSERVATION ET STABILITE	6
MATERIEL NECESSAIRE MAIS NON FOURNI	6
PREPARATION DES REACTIFS	6
PREPARATION ET CONSERVATION DES ENCHANTILLONS	7
MODE OPERATOIRE	7
CALCUL DES RESULTATS	8
LIMITES DU TEST	8
PERFORMANCES DU TEST	8
EXEMPLE DE LA COURBE D'ETALONNAGE	10
RESPONSABILITE	11
BIBLIOGRAPHIE	11

OBJET

La trousse Argutus Medical Urinary Collagen IV EIA permet la détermination quantitative du collagène IV dans l'urine humaine. Veuillez contacter Argutus Medical pour des informations supplémentaires concernant le dosage du collagène IV sur d'autres tissus liquides.

CONTEXTE CLINIQUE

Le collagène de type IV (IV.C) est le principal composant de la membrane basale (MB). Il est considéré comme sa structure de base. Le taux de collagène IV urinaire (uIV.C) est élevé dans le cas de plusieurs pathologies rénales,¹ et particulièrement en néphropathie diabétique.²⁻⁸ Le collagène IV urinaire est élevé de manière significative chez les patients avec un diabète sucré non insulino-dépendant par rapport aux sujets normaux. Le taux de collagène IV urinaire est corrélé avec le dépôt du collagène IV au niveau du rein.² Chez les sujets diabétiques, le collagène IV urinaire augmente significativement chez les patients atteints de microalbuminurie ou de protéinurie déclarée par rapport aux sujets à albuminurie normale³ (Fig. 1). De plus, les diabétiques à albuminurie normale ayant un taux élevé de collagène IV urinaire ont un risque important d'évoluer vers une microalbuminurie.⁴ En néphrologie diabétique, une thérapie intensive peut ralentir l'augmentation temporelle en collagène IV urinaire chez les diabétiques. Ce qui met en évidence le potentiel du collagène IV pour l'étude des effets au niveau rénal de nouvelles thérapies.⁵ Ces résultats montrent que le collagène IV urinaire est un bon biomarqueur pour les études sur les diabétiques néphrologiques. Dans le domaine de la transplantation rénale, le taux de collagène IV augmente au niveau du rein⁹ et, en cas de rejet aigu rénal, la concentration urinaire augmente considérablement.¹⁰ Ceci montre l'intérêt du dosage du collagène IV dans ces conditions.

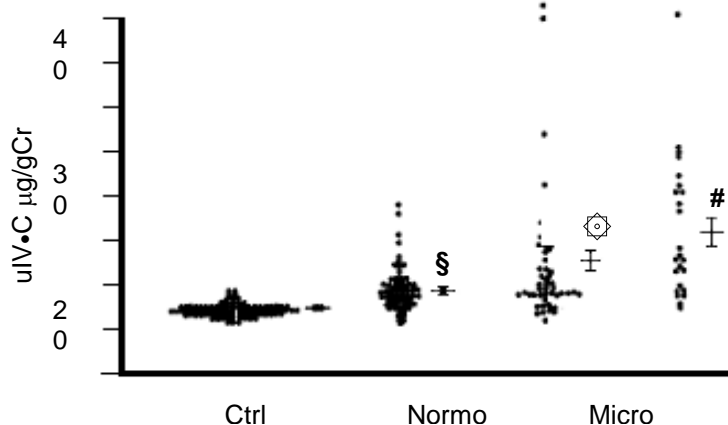


Fig.1 Excrétion urinaire de uIV.C chez des sujets diabétiques à différents stades de la maladie³.

Ctrl (Contrôle), n=89; Normo (albuminurie normale), n=62;

Micro (microalbuminurie), n=53; Overt (protéinurie déclarée), n=24

Moyenne ± écart type § p<0,01 vs Ctrl, ⊕ p<0,05 vs Normo, # p<0,05 vs Micro

PRINCIPE DU DOSAGE

La trousse Argutus Medical Urinary Collagen IV EIA permet de tester le collagène IV urinaire. Il s'agit d'un test Elisa 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.

PLA

PRET A L'EMPLOI

2. Standards: Collagène IV purifié dans du tampon phosphate (pH 6.0) et du sérum albumine bovin. Concentrations : 0,8 – 3,2 – 12,5 et 50 µg/L (1 mL de chaque). Contient 30 mg/L de Procline 300 comme conservateur.

CAL	0.8	1X
CAL	3.2	1X
CAL	12.5	1X
CAL	50	1X

PRET A L'EMPLOI

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.

BUF	DIL	1X
-----	-----	----

PRET A L'EMPLOI

4. Conjugué: Anti-Collagène IV de souris conjugué à la peroxydase de Raidort (20 mL). Contient 30 mg/L de Procline 300 comme conservateur.

CONJ	1X
------	----

PRET A L'EMPLOI

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.

BUF	WASH	10X
-----	------	-----

CONCENTRE

6. Substrat: solution stabilisée de TMB (15 mL).

SUBS	TMB	1X
------	-----	----

PRET A L'EMPLOI

7. Solution d'Arrêt: Acide sulfurique 1M (15 mL).

SOLN	STP	1X
------	-----	----

PRET A L'EMPLOI

8. Film plastique : x 1

9. Notice d'utilisation

INS

FOURNIS SEPARÉMENT

Argutus Medical Urinary Collagen IV EIA Tubes pour la collecte d'échantillons d'urine contenant du tampon stabilisant le collagène IV urinaire (45 tubes).

PRÉT À L'EMPLOI

PRECAUTIONS D'EMPLOI

SECURITE

- La trousse Argutus Medical Urinary 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. Éviter 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.
- Éviter 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. Les micropuits doivent toujours être conservés dans le sachet fermé hermétiquement, avec le dessicatif et entre 2-8°C. Remettre rapidement au réfrigérateur les micropuits non utilisés dans le sachet de conservation avec le dessicatif.
4. Les Tubes Argutus Medical Urinary Collagen IV EIA pour la collecte d'échantillons d'urine sont stables à température ambiante jusqu'à la date de péremption indiquée. Remettre les tubes inutilisés dans le sachet de conservation.

MATERIEL NECESSAIRE MAIS NON FOURNI

1. Pipette Pasteur.
2. Micropipettes de 50 µL et pipette multicanaux de 100-150 µL.
3. Laveur de microplaques automatique.
4. Lecteur de plaque ELISA avec filtre à 450 nm avec longueur d'onde de référence à 630 nm si disponible.
5. Bêcher de 1 litre.
6. Chronomètre.
7. Bain-marie.
8. Eau désionisée ou distillée.
9. Eprouvette graduée 500mL.

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.

PREPARATION ET CONSERVATION DES ECHANTILLONS

Les précipités de collagène IV se forment lors de la conservation ce qui provoque des résultats faussement bas. Pour éviter cela, ajouter un tampon stabilisant à l'urine qui permet en plus la conservation de l'échantillon¹¹. Les Tubes Argutus Medical Urinary Collagen IV EIA pour la collecte d'échantillons d'urine sont un moyen simple et reproductible de collecter les urines pour le dosage du collagène IV.

Transférer l'urine dans le tube de collecte en utilisant une pipette Pasteur. Remplir le tube jusqu'à la ligne indiquée, puis mélanger énergiquement. Comme le collagène IV est absorbé dans les précipités d'urine qui se forment au cours de la conservation, prélever l'urine fraîche directement dans les tubes de collecte fournis avec le kit Argutus Medical Urinary Collagen IV EIA. Sinon, les échantillons d'urine doivent être transférés dans ces tubes le jour même de la collecte. Même si les urines ne sont pas destinées à être conservées, utiliser les tubes fournis pour la collecte. Pour faciliter la conversion par rapport à la diurèse, il est recommandé de collecter simultanément un échantillon pour le dosage de la créatinine urinaire.

Après la collecte dans les tubes urinaires, les échantillons peuvent être stockés entre +2°C et +8°C pendant une semaine ou à -20°C pendant 9 mois. Si les échantillons ont été congelés, il est nécessaire de les mélanger énergiquement pour dissoudre tous les précipités. Eviter de congeler les échantillons de manière répétée.

MODE OPERATOIRE

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

1. IMMUNOREACTION:

- 1.1 Préparer la Solution de Lavage : voir paragraphe "préparation des réactifs".
- 1.2 Prendre le nombre nécessaire de micropuits sur la plaque de dosage (10 pour les standards et 2 pour chacun des échantillons).
- 1.3 Ajouter **150 µL** de Conjugué dans chaque puits en utilisant une pipette multicanaux.
- 1.4 Déposer en double les Standards (**0 (Tampon de Dilution), 0,8 , 3,2 , 12,5 et 50 µg/L**) et les échantillons (**50 µL/puits**).
- 1.5 Couvrir la Microplaque avec le Film Plastique et incuber à température ambiante (20 - 27°C) pendant 24 heures.
- 1.6 Enlever le Film Plastique et laver chaque puits 5 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.

2. DEVELOPPEMENT DE LA COLORATION

- 2.1 Ajouter **100 µL** de Substrat dans chaque puits en utilisant une pipette multicanaux. Incuber à température ambiante (20-27°C) pendant exactement une heure.

3. ARRET DE LA REACTION:

- 3.1 Ajouter **100 µL** de la Solution d'Arrêt dans chaque puits à l'aide d'une pipette multicanaux. S'assurer du parfait mélange du Substrat avec la Solution d'Arrêt.
- 3.2 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 en fonction de la concentration en collagène IV ($\mu\text{g/L}$).
3. En utilisant la valeur de l'absorbance de chaque échantillon, lire sur la courbe de calibration sa concentration en collagène IV.
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 limites à 95% de confiance pour les valeurs normales de collagène IV urinaire sont:

		Collagène IV $\mu\text{g/g}$ créatinine	N
Urine rélevéet rès tôt dans la matinée	Age de 30 à 39 ans	<4,0	122
	Age > 40 ans	<4,9	64
Miction	Age < 21 ans	<7,3	390

LIMITE DE DETECTION

La limite de détection de la trousse Argutus Medical Urinary Collagen IV EIA est $0,8 \mu\text{g/L}$.

GAMME DE MESURE

La courbe de calibration est comprise entre $0,8$ et $50 \mu\text{g/L}$. Cette gamme peut être étendue par dilution croissante des échantillons.

SPECIFICITE

Le Argutus Medical Urinary Collagen 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 $0,8 \mu\text{g/L}$ est comprise entre 0,01 et 0,06 et supérieure à 0,8 pour le standard $50 \mu\text{g/L}$.

INTERFERENCE

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

- Créatinine: moins de 10% d'interférence avec un échantillon contenant jusqu'à 3 g/L.
- Echantillons hémolytiques: moins de 10% d'interférence avec un échantillon contenant jusqu'à 4.8 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 d'échantillons dilués contenant un taux élevé en collagène IV:

Echantillon	Dilution aux								
	1 / 2			1 / 4			1 / 8		
	Attendu µg/L	Obtenu µg/L	Recouvrement %	Attendu µg/L	Obtenu µg/L	Recouvrement %	Attendu µg/L	Obtenu µg/L	Recouvrement %
A	11,6	11,0	95	5,8	5,2	90	2,9	2,6	90
B	13,4	12,7	95	6,7	6,4	96	3,3	3,1	94
C	5,1	5,4	106	2,6	2,5	96	1,3	1,3	100

REPRODUCTIVITE

Echantillon	\bar{X} [Collagène IV] µg/L	SD	% CV	N
Faible	2,5	0,07	2,8	8
Moyen	6,2	0,13	2,1	8
Fort	10,8	0,29	2,7	8

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

Echantillon	\bar{X} [Collagène IV] µg/L	SD	% CV	N
Faible	2,4	0,05	2,1	4
Moyen	6,0	0,15	2,5	4
Fort	20,8	1,52	7,3	4

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

Echantillon	\bar{X} [Collagène IV] µg/L	SD	% CV	N
Faible	3,2	0,18	5,6	4
Moyen	5,8	0,11	1,9	4
Fort	17,0	0,52	3,1	4

Variation inter-lots de la trousse Argutus Medical Urinary Collagen IV EIA calculée sur 4 lots différents

EXEMPLE DE LA COURBE D'ETALONNAGE

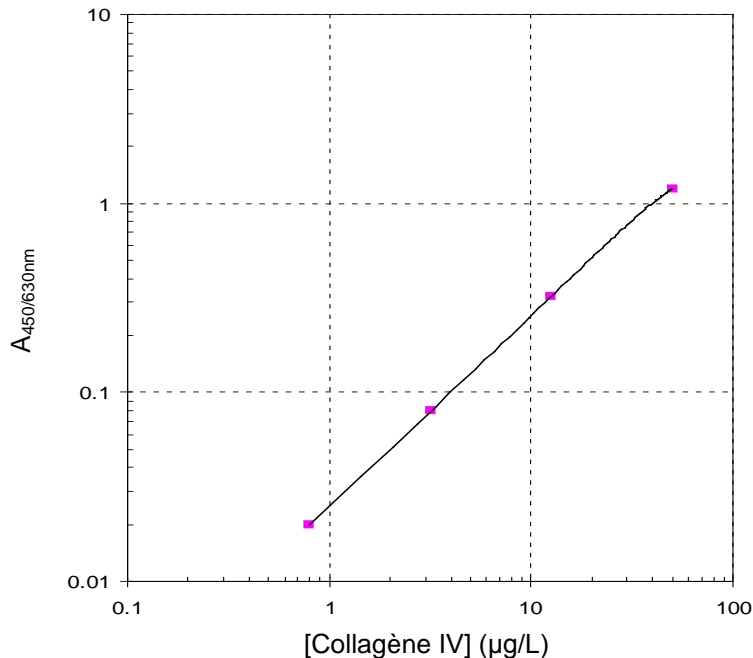


Figure 2: Courbe d'étalonnage type obtenue avec la trousse Argutus Medical Urinary Collagen IV EIA.
Tracé de $A_{450nm/630nm}$ en fonction de [Collagène IV] µg/L.
La gamme de mesure est comprise entre 0,8 - 50 µg/L.

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) **Makino, H. et al. (1995).** Urinary detection of type IV collagen and its increase in glomerulonephritis. Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology. 88(2), 215-223.
- 2) **Okonogi, H. et al. (2001).** Urinary type IV collagen excretion reflects renal morphological alterations and type IV collagen expression in patients with type II diabetes mellitus. Clinical Nephrology. 55, 357-364.
- 3) **Isono, M. et al. (1996).** Analysis of urinary type IV collagen in NIDDM subjects as a marker for diabetic nephropathy. J. Japan. Diab. Soc. 39, 599-604.
- 4) **Ieki, Y. and Takazakura, E. (1999).** Analysis of urinary excretion of type IV collagen as a predictor of progression of early diabetic nephropathy. Two year follow up study. J. Japan. Diab. Soc. 42(10), 859-862.
- 5) **Nishimura, M. et al. (2001).** Angiotensin converting enzyme inhibitors and ProbucoI suppress the time-dependent increase in urinary type IV collagen excretion of type II diabetes mellitus patients with early diabetic nephropathy. Clinical Nephrology. 55(2) 96-103.
- 6) **Ohgaku, S. et al. (1996).** Direct determination of concentrations of urinary type IV collagen in normal and diabetic subjects with a sensitive enzyme immunoassay (EIA). J. Japan. Diab. Soc., 39, 523-526.
- 7) **Iijima, T. et al. (1998).** Follow-up study on urinary type IV collagen in patients with early stage diabetic nephropathy. Journal of Clinical and Laboratory Analysis. 12 378-382.
- 8) **Yagame, M. et al. (1997).** Significance of urinary type IV collagen in patients with diabetic nephropathy using a highly sensitive one-step sandwich enzyme immunoassay. J. Clin. Lab. Anal. 11, 110-116.
- 9) **Kawase, T. et al. (2001).** Collagen IV is upregulated in chronic transplant nephropathy. Transplantation Proceedings. 33, 1207-1208.
- 10) **Haddad, C. et al. (1996).** Elevated urine collagen IV levels (UC.IV) correlate with the severity of acute renal transplant (TX) rejection (AR). Poster 196 presented at the 1996 ATSP meeting.
- 11) **Obata, K. (1997).** Trials at Fuji Chemical Industries Ltd, Japan. (Now Daiichi Fine Chemicals Co., Ltd., Japan).



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.

Collu-278-07 03/09FR