

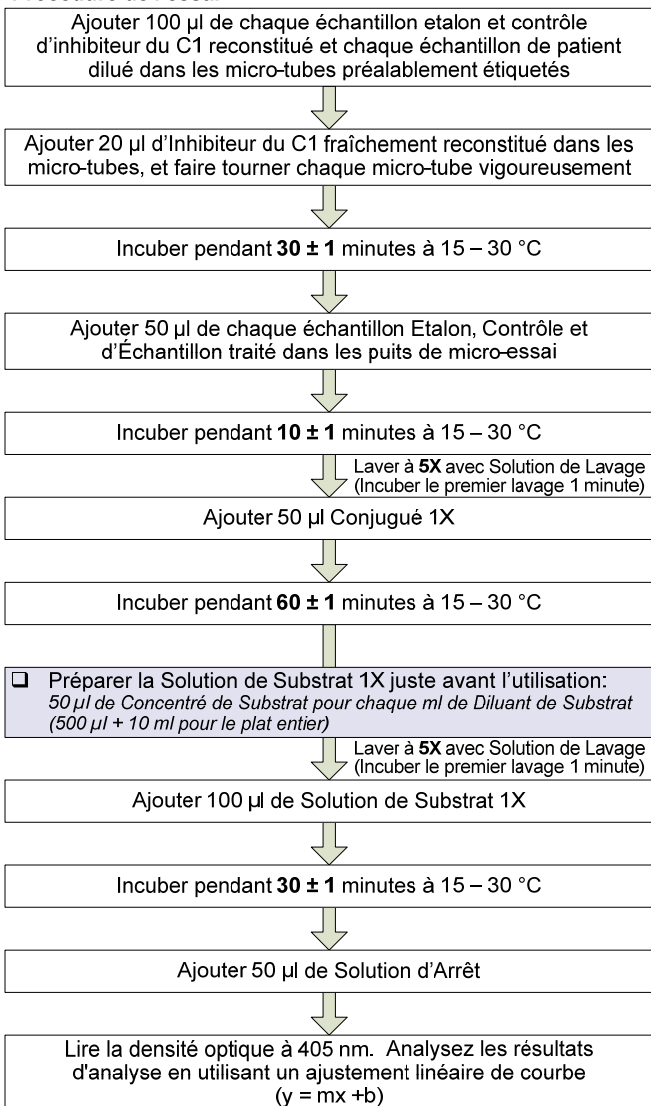
### Essai immunoenzymatique servant à mesurer la quantité de protéine fonctionnelle d'inhibiteur du C1 dans le plasma ou le sérum humains

#### C1-Inhibitor EIA Sommaire

##### Préparation de Réactif et d'Échantillon

- Diluer Concentré de Solution de Lavage 1:20 avec de l'eau désionisée
- Diluer Concentré Diluant d'Échantillon 1:5 avec de l'eau désionisée
- Diluer Conjugué d'Inhibiteur du C1 (100X) 1:100 avec de diluant de conjugué
- Réhydratez chaque flacon d'échantillon Étalon et de Contrôle avec 1,0 ml de Solution de Réhydratation (réhydrater pendant 15 minutes, puis bien mélanger)
- Réhydratez chaque flacon d'Inhibiteur du C1 requis avec 0,5 ml de Solution de Réhydratation (réhydrater pendant 15 minutes, puis bien mélanger) (un flacon permet de traiter environ 25 échantillons à analyser)
- Diluer l'Échantillon 1:101 avec Diluant d'Échantillon 1X (10 µl + 1 ml)

##### Procédure de l'essai



#### APPLICATION

L'essai immunoenzymatique de MicroVue portant sur l'inhibiteur du C1 mesure la quantité de protéine fonctionnelle d'inhibiteur du C1 dans le plasma ou le sérum humains.

#### RÉSUMÉ ET EXPLICATION

L'inhibiteur du C1 est un inhibiteur de protéases multi-spécifique présent dans le sérum et le plasma humains sains, et qui régule les enzymes des systèmes coagulation/fibrinolyse, complément et kinine.<sup>1</sup> Parmi les enzymes (ou protéases) régulées par cette protéine, on trouve notamment les sous-unités C1r et C1s du premier composant activé du complément, le facteur de Hageman (facteur XIIa), des fragments du facteur de Hageman, le précurseur de la thromboplastine plasmatique activée (facteur XIa), la kallikréine (facteur de Fletcher) et la plasmine.<sup>2</sup>

Un déficit en inhibiteur du C1 fonctionnellement actif peut entraîner un œdème de Quincke mettant en jeu le pronostic vital. On connaît deux formes principales de déficit en inhibiteur du C1 : la forme congénitale, que l'on appelle œdème angioneurotique héréditaire (OAH),<sup>3,4</sup> et la forme acquise, qui est associée à différentes maladies, notamment aux malignités lymphoïdes.<sup>5</sup> L'œdème angioneurotique héréditaire se caractérise par des crises transitoires mais récurrentes entraînant un gonflement non prurigineux de divers tissus du corps humain. Les symptômes dépendent des organes concernés. S'il s'agit des intestins, les symptômes incluent notamment des douleurs, des crampes, des vomissements et des diarrhées. C'est l'obstruction des voies aériennes, provoquée par un œdème du larynx, qui cause le plus souvent la mort du patient. On peut distinguer biochimiquement deux types d'œdème angioneurotique héréditaire. Les patients atteints de la forme la plus répandue (85 % des patients) présentent des taux faibles d'inhibiteur du C1 fonctionnel et de l'antigène de l'inhibiteur du C1. Ceux qui sont atteints de la seconde forme d'OAH (15 % des patients) présentent de faibles taux d'inhibiteur du C1 fonctionnel, mais des taux normaux, voire élevés de l'antigène de l'inhibiteur du C1, associé à une protéine dysfonctionnelle.<sup>6</sup>

Du fait de la variabilité des symptômes au cours des différentes phases de la maladie, il est impossible de poser un diagnostic définitif en se fondant uniquement sur les observations cliniques. On ne peut déterminer avec certitude le caractère héréditaire ou acquis d'un angioœdème qu'au moyen d'analyses de laboratoire mettant en évidence une réduction sensible des taux d'inhibiteur du C1 fonctionnel dans le plasma ou le sérum d'un patient.

Plusieurs méthodes permettent de mesurer les taux d'inhibiteur du C1 et de son antigène. Ces méthodes comprennent notamment les tests d'inhibition enzymatique,<sup>7,8</sup> l'immunodiffusion radiale,<sup>9</sup> l'immuno-électrophorèse, et l'inhibition de l'immunohémolyse.<sup>10</sup> Chacune de ces méthodes présente des inconvénients. Les tests d'inhibition enzymatique<sup>7</sup> sont difficiles à mettre au point et à réaliser de façon systématique, les méthodes immunochimiques qui mesurent la quantité totale d'antigène ne permettent pas d'établir la distinction entre les protéines fonctionnelles et non fonctionnelles de l'inhibiteur du C1, et la méthode d'immunodiffusion anti-C1r,<sup>9</sup> qui a été développée pour mesurer l'activité de l'inhibiteur du C1 fonctionnel, ne donne pas d'indication d'ordre quantitatif. L'essai mis au point par Quidel permet de mesurer le taux de protéine de l'inhibiteur du C1 fonctionnellement active présente dans le plasma ou le sérum d'un patient grâce à un procédé immuno-enzymatique pratique, standardisé et reproductible.

## PRINCIPE DU PROCÉDÉ

L'essai immunoenzymatique de MicroVue portant sur la quantification de la protéine fonctionnelle de l'inhibiteur du C1 (un inhibiteur de protéases) dans le sérum ou le plasma humains comporte quatre étapes. Au cours de la première étape, les échantillons étalon, de contrôle et à analyser sont mis à incuber avec de l'inhibiteur du C1 (C1<sub>s</sub> biotinylé et activé). Pendant cette incubation, l'inhibiteur de C1 fonctionnel actif présent dans les échantillons étalon, de contrôle et à tester, se lie à l'inhibiteur de C1 pour former des complexes.

Lors de la deuxième étape, une aliquote des mélanges en incubation contenant du réactif à l'inhibiteur de C1 est ajoutée dans des puits de microtitrage enduits d'avidine. Inhibiteur de C1 : les complexes d'inhibiteur du C1 qui contiennent les échantillons étalon, de contrôle et à analyser se lient aux puits de test enduits d'avidine. Après incubation, les matériaux non liés sont éliminés au cours d'un cycle de lavage.

Lors de la troisième étape, de la peroxydase de raifort (HRP) et de l'inhibiteur du C1 antihumain de chèvre conjugué sont ajoutés dans chacun des puits de test. Pendant cette étape, la HRP et l'anti-inhibiteur du C1 conjugué se lient à l'inhibiteur du C1 : les complexes d'inhibiteurs du C1 qui ont été capturés sur la surface des puits de test enduite d'avidine. Après incubation, un cycle de lavage permet d'éliminer l'excès de conjugué.

Au cours de la quatrième étape, un substrat enzymatique chromogénique est ajouté dans chacun des puits de micro-essai. La réaction de la HRP et du conjugué liés avec le substrat se traduit par une coloration verte. Après incubation, la réaction enzymatique est interrompue chimiquement et l'intensité de la coloration est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 405 nm. L'intensité de la coloration du mélange est proportionnelle à la concentration en protéine fonctionnelle de l'inhibiteur du C1 dans les échantillons étalon, de contrôle et à analyser.

## RÉACTIFS ET MATÉRIAUX FOURNIS

L'essai immunoenzymatique de l'inhibiteur du C1 contient les réactifs et matériaux suivants :

- A Des échantillons étalon d'inhibiteur du C1**  
**B Réf. A4469–A4473 2 chacun, 1 ml**  
**C** (lyophilisés) Après reconstitution, chacun d'entre eux contient une quantité connue d'inhibiteur du C1 dans le plasma humain, de PBS, et de stabilisants.  
**D**  
**E**
- L Contrôle (humain) anormal d'inhibiteur du C1**  
**Réf. A9524 2 flacons x 1 ml**  
 (lyophilisés) Après reconstitution, chacun d'entre eux contient du plasma humain présentant un faible taux d'inhibiteur du C1 dans la PBS, stabilisants.
- N Contrôle (humain) normal de l'inhibiteur du C1**  
**Réf. A9523 2 flacons x 1 ml**  
 (lyophilisés) Après reconstitution, chacun d'entre eux contient du plasma humain présentant un taux d'inhibiteur du C1 normal dans la PBS, stabilisants.
- 1 Plaque de micro-essai Réf. 4634 12 chacun**  
 Plaque de huit puits enduits d'avidine dans son emballage d'aluminium refermable.
- 2 Solution d'arrêt Réf. A3673 6 ml**  
 Contient 250 mM d'acide oxalique.
- 3 Concentré de solution de lavage 20X Réf. A9957 2 flacons x 50 ml**  
 Après dilution, chacun contient une solution saline de tampon phosphate (PBS), 0,05 % de Tween-20®, et 0,035% Proclin® 300.
- 4 Concentré diluant de l'échantillon 5X Réf. A9519 25 ml**  
 Après dilution, il contient de la PBS, des stabilisants, et 0,035 % de ProClin 300.
- 5 Diluant du substrat Réf. A3672 25 ml**  
 Contient 0,1 M de tampon citrate et 0,05 % d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- 6 Concentré de substrat Réf. A3671 1,5 ml**  
 Contient 0,7 % de 2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazoline-6-acide sulfonique) et du sel de diammonium.
- 7 Conjugué d'inhibiteur du C1 (100X) Réf. A9525 0,25 ml**  
 Contient du concentré de peroxydase (100X) et de l'inhibiteur du C1 antihumain de chèvre conjugué dans une PBS, des stabilisants, et 0,01 % de thimérosal.
- 8 Solution de réhydratation Réf. A3675 25 ml**  
 Contient 0,035 % de ProClin 300.
- 9 Diluant de conjugué Réf. A9526 10 ml**  
 Contient de la PBS, des stabilisants, et 0,01 % de thimérosal.
- 10 Inhibiteur du C1 Réf. A9527 4 flacons x 0,5 ml**  
 Après reconstitution, chacun contient du C1<sub>s</sub> biotinylé (conjugué à de la biotine) et activé dans une PBS avec des stabilisants.

Tween-20® est une marque d'ICI Americas Inc.  
 ProClin® est une marque de Rohm and Haas Compan

## MATÉRIAUX NÉCESSAIRES NON FOURNIS

- Minuterie (60 minutes)
- Calculateur, ou tout autre équipement informatique permettant de valider l'essai
- Plaques de micro-essai et/ou tubes à essais et supports de tests propres et non utilisés
- Récipient pour dilution de tampon de lavage
- Flacon de lavage ou tout autre de système de lavage adapté aux dosage immunologique
- Pipettes multi-canaux réglables (8 ou 12 canaux) ou micropipettes automatisées (en option)
- Pipettes propres de 1 ml, 5 ml, et 10 ml
- Embouts de micropipettes et de pipettes
- Lecteur de plaque capable de mesurer la densité optique entre 0,0 et 2,0
- Eau déionisée ou distillée

## AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

1. Pour utilisation diagnostique *in vitro*.
2. Suivre les précautions standard lors de la manipulation du contenu de ce kit et de tous les échantillons de patients.
3. Éliminer les récipients et leur contenu inutilisé conformément aux dispositions réglementaires nationales et locales.
4. Utiliser les réactifs fournis en une seule livraison avant la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
5. Porter des gants et des lunettes de protection, et suivre les bonnes pratiques de laboratoire en manipulant cette trousse.
6. Stocker les réactifs de l'essai selon les indications.
7. Ne pas effleurer ni toucher le fond des puits en ajoutant ou en aspirant des liquides.
8. L'utilisation de durées et de températures d'incubation autres que celles indiquées dans la section Procédé peut entraîner des résultats erronés.
9. Ne pas laisser sécher les puits de micro-essai une fois que l'essai a commencé.
10. Ne pas réutiliser un puits de micro-essai pour un deuxième test.
11. L'utilisation de pipettes multi-canaux ou de robots pipetteurs est recommandée pour assurer la distribution rapide des réactifs.
12. Pour une mesure exacte des échantillons, ajouter les échantillons et les solutions étalon avec précision. Pipetter avec soin, en utilisant uniquement un équipement étalonné.
13. Il est essentiel de prélever et de conserver les échantillons avec soin pour obtenir des résultats corrects.
14. Éviter toute contamination microbienne ou croisée des échantillons, des réactifs et du matériel. En cas de contamination, des résultats inexacts pourraient être obtenus.

15. Le thimérosal est utilisé comme conservateur. Tout contact ou toute ingestion accidentelle de tampons ou de réactifs contenant du thimérosal peut provoquer des réactions d'hypersensibilité, notamment une irritation de la peau, des yeux ou de la bouche. Consulter un médecin en cas d'observation de ces symptômes. L'exposition au thimérosal est susceptible de provoquer des effets mutagènes. Éviter tout contact avec des bases ou des acides forts.
16. Le ProClin 300 est utilisé comme conservateur. Tout contact ou toute ingestion accidentelle de tampons ou de réactifs contenant du Proclin peut provoquer une irritation de la peau, des yeux ou de la bouche. Le respect des bonnes pratiques de laboratoire permet de réduire l'exposition. Consulter un médecin en cas d'observation de ces symptômes.
17. Le concentré de substrat est photosensible. Éviter toute exposition prolongée à la lumière directe ou indirecte. Conserver les réactifs dans l'obscurité lorsqu'ils ne sont pas utilisés.
18. Afin d'éviter la production d'aérosols pendant le lavage, utiliser un appareil pour aspirer le liquide de lavage et le déverser directement dans un flacon contenant de l'eau de Javel.
19. Des échantillons inactivés par la chaleur, hyperlipémiques ou contaminés, peuvent entraîner des résultats erronés.

## CONSERVATION

Conserver les kits non ouverts entre 2 et 8 °C. Après ouverture du kit, le concentré de solution de lavage 20X et la solution de réhydratation peuvent être conservés entre 2 et 30 °C.

Après avoir choisi les réactifs ou les produits à utiliser pour l'essai, replacer immédiatement les réactifs non utilisés à une température de conservation appropriée. Amener les réactifs et produits de l'essai à température ambiante (entre 15 et 30 °C) avant utilisation.

## SIGNES D'INSTABILITÉ ET DE DÉTÉRIORATION DES RÉACTIFS

La couleur du concentré de substrat peut aller du transparent au vert pâle à foncé. Cela n'altère pas ses performances. Cependant, la solution de substrat qui vient d'être préparée doit être transparente à vert pâle. Une coloration vert foncé indique une détérioration de la solution de substrat ; celle-ci doit alors être jetée et une nouvelle solution de substrat préparée dans un récipient en verre propre.

Toute turbidité ou décoloration de la solution de lavage indique une détérioration du réactif. Le cas échéant, la solution doit être jetée.

## PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION DES ÉCHANTILLONS

### Manipuler et éliminer tous les échantillons en suivant les précautions standard.

L'essai nécessite au moins 10 µl de sérum ou de plasma EDTA. Tous les échantillons doivent être prélevés dans des conditions d'asepsie et préparés suivant les techniques standard pour les tests en laboratoire d'analyse. Il est préférable d'utiliser des échantillons fraîchement prélevés et non hémolysés. Un échantillon de plasma EDTA peut être conservé à température ambiante (15-30 °C) pendant 24 heures maximum. Un échantillon de sérum ne doit pas être conservé à température ambiante pendant plus de six heures. Si un allongement de la durée de conservation est prévisible, l'échantillon de plasma ou de sérum doit être congelé et conservé à -20 °C minimum. Éviter de congeler et décongeler un échantillon à plusieurs reprises. Avant le test, toute particule doit être éliminée de l'échantillon par centrifugation à faible vitesse.

## PRÉPARATION DES RÉACTIFS

Se référer aux Tableaux 1 et 2 pour connaître les quantités de réactifs et de produits nécessaires. Après avoir sorti les réactifs et les produits nécessaires, replacer immédiatement les produits non utilisés aux températures de conservation appropriées (voir *CONSERVATION* des réactifs). Amener les réactifs à température ambiante (entre 15 et 30 °C) avant utilisation. Après utilisation, remettre le kit au réfrigérateur (2-8 °C).

- Solution de lavage.** Mélanger le concentré de solution de lavage 20X en retournant plusieurs fois le flacon. Si le concentré de solution de lavage 20X a été conservé entre 2 et 8 °C, il est possible que des cristaux se soient formés. Pour dissoudre les cristaux, réchauffer le flacon au bain-marie entre 37 et 50 °C jusqu'à dissolution complète. Bien mélanger. Préparer la solution de lavage pour les puits de micro-essais en diluant tout le contenu d'un flacon de concentré de solution de lavage 20X avec de l'eau distillée ou déionisée jusqu'à obtention d'un litre de produit. Bien mélanger. La solution de lavage reste stable pendant 30 jours quand elle est conservée dans un récipient propre entre 2 et 8 °C. Si le réactif devient trouble ou se décolore, il doit être jeté.
- Sélection des plaques de micro-essai.** Déterminer le nombre d'échantillons à analyser, et ajouter quinze (15) puits pour les cinq échantillons étalon, et les échantillons de contrôle normaux et anormaux à analyser (en double), et un puits vide. Il est conseillé de tester les échantillons étalon et de contrôle en double, sur d'autres plaques de micro-essai si possible. En fonction du nombre de puits requis, détacher le nombre de bandes désiré. Fixer solidement les bandes devant être utilisées sur la plaque. Remettre les bandes non utilisées dans le sac de conservation, le refermer hermétiquement, et le stocker entre 2 et 8 °C.

- Reconstitution des échantillons étalon et de contrôle d'inhibiteur du C1, et l'échantillon d'inhibiteur du C1.** Ajouter 1 ml de solution de réhydratation dans chaque flacon d'échantillon étalon (A-E) et dans chaque flacon d'échantillon de contrôle. Ajouter 0,5 ml de solution de réhydratation dans chaque flacon d'inhibiteur du C1 requis. (Un flacon permet de traiter environ 25 échantillons à analyser.) Réhydrater les flacons reconstitués pendant au moins 15 minutes à température ambiante (15-30 °C), puis bien mélanger. Éviter de faire de la mousse ou des bulles en mélangeant. Les échantillons étalon et témoin reconstitués restent stables pendant 30 jours lorsqu'ils sont conservés entre 2 et 8 °C.

**REMARQUE : Il n'est pas nécessaire de diluer d'autres échantillons étalon et de contrôle reconstitués avant de procéder à l'essai.** Quatre (4) flacons d'inhibiteur du C1 sont fournis ; le kit permet donc à l'utilisateur de réaliser jusqu'à quatre (4) essais. **L'inhibiteur du C1 reconstitué reste stable pendant vingt-quatre (24) heures entre 2 et 8 °C et pendant deux (2) heures maximum à température ambiante (15-30 °C).**

- Préparation du diluant de l'échantillon 1X.** Pour déterminer la quantité de diluant de l'échantillon 1X nécessaire, se référer au Tableau 1. Préparer la quantité de diluant de l'échantillon 1X requise en mélangeant les volumes indiqués d'eau distillée ou déionisée au concentré de diluant d'échantillon 5X.

**TABLEAU 1  
DILUANT DE L'ÉCHANTILLON 1X  
(Consignes et Préparation)**

| Nombre de plaques | Quantité de diluant d'échantillon 1X nécessaire (ml) | Volume de réactifs nécessaire |                                  |
|-------------------|--|-------------------------------|----------------------------------|
|                   |  | Eau (ml)                      | Diluant de l'échantillon 5X (ml) |
| 2                 | 6  | 4,8                           | 1,2                              |
| 3                 | 15   | 12,0                          | 3,0                              |
| 4                 | 22   | 17,6                          | 4,4                              |
| 5                 | 30   | 24,0                          | 6,0                              |
| 6                 | 38   | 30,4                          | 7,6                              |
| 7                 | 46   | 36,8                          | 9,2                              |
| 8                 | 54   | 43,2                          | 10,8                             |
| 9                 | 62   | 49,6                          | 12,4                             |
| 10                | 70   | 56,0                          | 14,0                             |
| 11                | 78   | 62,4                          | 15,6                             |
| 12                | 86   | 68,8                          | 17,2                             |

- Dilution de l'échantillon.** Déterminer le nombre (N) d'échantillons à analyser. Numéroter les tubes à essai de 1 à N et noter quel échantillon correspond à chaque tube. Préparer 1 ml de chaque échantillon à une dilution de 1:101 (10 µl d'échantillon dans 1 ml de diluant d'échantillon 1X) à l'aide de diluant d'échantillon 1X. Bien mélanger, mais éviter de faire de la mousse et des bulles. Ne pas conserver ni réutiliser les échantillons dilués.
- Préparation de conjugué 1X.** Pour chacune des trois bandes à analyser, ajouter 25 µl de conjugué 100X à 2,5 ml de diluant de conjugué. Le conjugué 1X reste stable pendant 12 heures maximum entre 2 et 8 °C.

7. **Préparation de solution de substrat. À préparer juste avant utilisation.** Ne pas préparer la solution de substrat avant l'étape 8 du procédé de l'essai. Déterminer le volume de solution de substrat requis à l'aide du Tableau 2. **Préparer la solution de substrat en ajoutant 50 µl de concentré de substrat pour chaque ml de diluant de substrat.** Bien mélanger. Si la solution de substrat prend une coloration vert foncé avant utilisation, la jeter et en préparer une nouvelle dans un récipient propre.

**TABLEAU 2  
SOLUTION DE SUBSTRAT X1  
(Consignes et Préparation)**

| Nombre de plaques | Quantité de solution de substrat nécessaire (ml) | Volume de réactifs nécessaire |                            |
|-------------------|--|-------------------------------|----------------------------|
|                   |  | Diluant de substrat (ml)      | Concentré de substrat (µl) |
| 2                 | 2  | 2                             | 100                        |
| 3                 | 3  | 3                             | 150                        |
| 4                 | 4  | 4                             | 200                        |
| 5                 | 5  | 5                             | 250                        |
| 6                 | 5  | 5                             | 250                        |
| 7                 | 6  | 6                             | 300                        |
| 8                 | 7  | 7                             | 350                        |
| 9                 | 8  | 8                             | 400                        |
| 10                | 9  | 9                             | 450                        |
| 11                | 9  | 9                             | 450                        |
| 12                | 10   | 10                            | 500                        |

## PROCÉDÉ DE L'ESSAI

**Lire la notice produit dans son intégralité avant de commencer l'essai.**

Voir la partie *PRÉPARATION DES RÉACTIFS* avant de poursuivre.

- Sur une fiche technique, consigner la position des puits de micro-essai correspondant à tous les échantillons étalon, de contrôle, et à analyser, ainsi que les numéros de lot indiqués sur les étiquettes des flacons. Sur l'un des coins de la plaque de micro-essai, coller une étiquette qui servira de point de repère pour l'orientation.
- Traitement des échantillons étalon, de contrôle et à analyser avec l'inhibiteur du C1 :
  - Ajouter 100 µl de chaque échantillon étalon d'inhibiteur du C1 reconstitué (A, B, C, D, E) dans les micro-tubes préalablement étiquetés.
  - Ajouter 100 µl d'échantillon de contrôle anormal d'inhibiteur du C1 et 100 µl d'échantillon de contrôle normal d'inhibiteur du C1 dans les micro-tubes préalablement étiquetés.
  - Ajouter 100 µl de chaque échantillon de patient dilué à 1:101 (voir *Dilution de l'échantillon*, paragraphe 5 sous la *PRÉPARATION DES RÉACTIFS*) dans un micro-tube préalablement étiqueté.
  - Ajouter 20 µl d'inhibiteur du C1 fraîchement reconstitué dans les micro-tubes contenant les échantillons étalon et de contrôle, et dans ceux contenant les échantillons dilués à analyser. Faire tourner chaque micro-tube vigoureusement.
  - Incuber à température ambiante (15–30 °C) pendant 30 minutes ± 1 minute.

- En fonction des exigences en termes de lecteur de plaque d'essai immunoenzymatique, choisir un ou plusieurs puits devant servir de puits vide(s), et ajouter 50 µl de diluant d'échantillon 1X dans ces puits de micro-essai.
- Ajouter 50 µl de chaque échantillon étalon et de contrôle traité avec de l'inhibiteur du C1 (étape 2) dans les puits de micro-essai choisis pour contenir les doubles. Ajouter 50 µl de chaque échantillon traité avec de l'inhibiteur du C1 (étape 2) dans les puits de micro-essai qui lui a été attribué.
- Incuber à température ambiante (15–30 °C) pendant 10 minutes ± 1 minute.
- Laver les puits de micro-essai comme suit :

**Remarque : Le lavage des puits de micro-essai est une étape cruciale. Bien suivre les instructions de lavage.**

- Après l'incubation de l'étape 5 (ou de l'étape 8 ci-après), vider chaque puits.
- Remplir tous les puits de solution de lavage (environ 300 µl) en utilisant un flacon de lavage ou tout autre dispositif de remplissage.
- Incuber les puits pendant 1 minute à température ambiante (15–30 °C).
- Vider chaque puits.
- Remplir tous les puits de solution de lavage (environ 300 µl).
- Vider chaque puits.
- Répéter les étapes e à f trois fois supplémentaires.
- Après le cinquième cycle de lavage, retourner la plaque et la taper sur du papier absorbant à deux reprises afin d'éliminer toute trace de liquide.

**Ne pas laisser sécher les puits.**

- Verser 50 µl de conjugué d'inhibiteur du C1 dilué (voir paragraphe 6) dans chaque puits lavé, y compris dans le(s) puits vide(s), à l'aide d'une pipette multi-canaux ou automatisée.
- Incuber la bande de micro-essai à température ambiante (15–30 °C) pendant 60 minutes ± 1 minute. **Préparer la solution de substrat pendant cette incubation (voir *PRÉPARATION DES RÉACTIFS* étape 7).**
- Laver les puits de micro-essai après l'incubation de 60 minutes (étape 8), comme décrit dans la partie *PROCÉDÉ DE L'ESSAI*.
- Immédiatement après le lavage, verser 100 µl de la solution de substrat fraîchement préparée dans chaque puits, y compris dans le(s) puits vide(s).
- Incuber la bande de micro-essai à température ambiante (15–30 °C) pendant 30 minutes.
- Ajouter 50 µl de solution d'arrêt dans chaque puits pour arrêter la réaction enzymatique. La solution d'arrêt doit être ajoutée dans les puits dans le même ordre et au même rythme que l'a été la solution de substrat. Taper doucement la plaque contre la table pour permettre à la coloration du substrat de se propager régulièrement.

13. Déterminer le degré d'absorbance à 405 nm (valeur  $A_{405}$ ) pour chaque puits de test dans l'heure suivant l'ajout de la solution d'arrêt (étape 12), en corrigeant le puits vide en fonction du type de système spectrophotométrique utilisé.
14. Jeter les échantillons dilués, étalon, et de contrôle restants, ainsi que le substrat, le conjugué, l'inhibiteur du C1 et les bandes de micro-essai utilisées (voir la partie *AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS*). Garder le portoir et le support pour bandes en vue d'une réutilisation.

## CONTRÔLE QUALITÉ

Les bonnes pratiques de laboratoire recommandent l'utilisation d'échantillons de contrôle afin de garantir le bon fonctionnement de l'essai. Chaque kit de test de l'inhibiteur du C1 contient des contrôles normaux et anormaux qui peuvent être utilisés à cet effet. Ces contrôles doivent être testés au moins une fois pour chaque lot d'échantillon, c'est-à-dire pour chaque série de tests. Les contrôles, lorsque utilisés comme indiqué, doivent donner un pourcentage de valeurs moyennes normales dans les limites précisées sur les étiquettes des flacons. Puisque ces contrôles doivent être traités par un réactif et testés exactement comme un échantillon type, ils servent de contrôles pour chaque série de tests portant sur l'inhibiteur du C1. Des contrôles externes, préparés par votre laboratoire, peuvent également être utilisés afin de s'assurer du bon fonctionnement de l'essai.

En outre, la notice du produit exige que la courbe standard générée à l'aide des échantillons étalon A à E du kit corresponde à des critères de validation rigoureux (voir la partie *INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS*). Les échantillons étalon doivent être analysés en double lors de chaque série de tests. Si l'essai ne remplit pas ces critères, le renouveler, ou contacter l'assistance technique Quidel.

## INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

### Calcul des résultats

On obtient la courbe étalon en utilisant les valeurs  $A_{405}$  pour chaque échantillon étalon, auxquelles on a soustrait l'échantillon à blanc (en ordonnée), et la concentration correspondant à chaque échantillon étalon (en abscisse). La courbe étalon doit remplir les critères de validation. La plupart des ordinateurs et des calculateurs sont capables d'exécuter ces calculs. La Figure 1 est un exemple de courbe étalon type.

Le taux de concentration de chaque échantillon est calculé à partir de la courbe étalon, grâce à l'analyse de régression linéaire.

### Validation

Déterminer la pente, le point d'intersection et le coefficient de corrélation de la meilleure courbe obtenue. Les valeurs doivent être comprises entre les limites indiquées ci-dessous pour que l'essai soit validé :

- coefficient de corrélation (r) : supérieur à 0,95
- pente (m) : de 0,798 à 1,944
- point d'intersection sur l'axe des ordonnées (b) : de (-)0,115 à (+)0,047

## Interprétation

La concentration en inhibiteur du C1 d'un échantillon donné est exprimée en pourcentage du taux moyen des échantillons normaux. Un taux d'inhibiteur du C1 fonctionnel moyen a été déterminé grâce à cet essai sur la base d'un échantillon de 100 sujets sains testés par trois techniciens (voir la partie *CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE, EXACTITUDE*). Le pourcentage moyen normal pour tout échantillon dilué à 1:101 testé est déterminé comme indiqué dans la partie *CALCULS DES RÉSULTATS*.

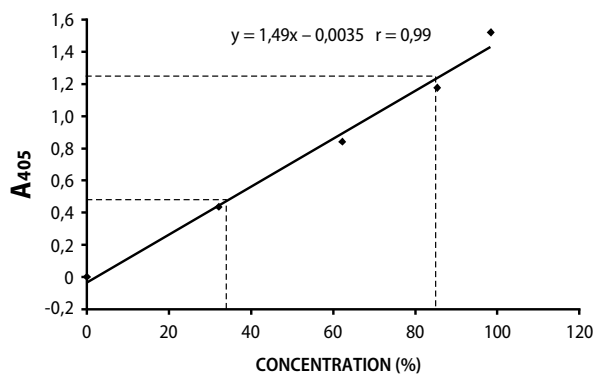
**Résultats anormaux :** Un taux de concentration de l'inhibiteur du C1 inférieur ou égal à 40 % de la moyenne normale est considéré comme nettement inférieur à la normale et doit être considéré comme anormal. Les échantillons qui doivent être à nouveau analysés car leurs résultats sont ambigus (voir ci-après) peuvent également être considérés comme anormaux.

**Résultats ambigus :** Bien qu'il soit inférieur à la moyenne, un taux de concentration en inhibiteur du C1 situé entre 41 % et 67 % de la moyenne normale n'est pas considéré comme un résultat nettement inférieur à la moyenne, mais comme un résultat ambigu. Ces échantillons peuvent être analysés de nouveau, ou un nouvel échantillon peut être prélevé et analysé. Si un échantillon obtient un deuxième résultat ambigu, il peut alors être considéré comme nettement inférieur à la moyenne et donc être enregistré comme anormal.

**Résultats normaux :** Un taux de concentration supérieur ou égal à 68 % de la moyenne normale est considéré comme normal.

### Exemple de courbe étalon

FIGURE 1



## LIMITES DU PROCÉDÉ

L'essai immunoenzymatique de MicroVue portant sur l'inhibiteur du C1 est utilisé pour analyser les échantillons de sérum ou de plasma EDTA. Les anticoagulants autres que l'EDTA n'ont pas fait l'objet de tests.

## VALEURS ATTENDUES

Cent (100) échantillons de sérum normal prélevés sur quarante-neuf (49) enfants et cinquante et un (51) adultes ont été analysés à l'aide de l'essai immunoenzymatique de MicroVue portant sur l'inhibiteur du C1. Aucune différence notable n'a été constatée entre les échantillons prélevés sur les adultes et sur les enfants. La concentration moyenne en protéine de l'inhibiteur du C1 de ces échantillons a été définie comme correspondant à 100 % de la moyenne normale (écart type = 15,8 %).

Des échantillons appariés de plasma et de sérum EDTA ont été prélevés sur quinze (15) sujets adultes sains et analysés selon cette méthode. Aucune différence notable n'a été constatée entre ces types d'échantillons.

Des échantillons prélevés sur vingt-huit (28) patients déjà connus comme présentant un déficit en inhibiteur du C1 ont été testés au cours de cet essai. Ces échantillons ont été prélevés sur différents sites répartis dans plusieurs régions des États-Unis. Ces vingt-huit patients présentaient tous un taux d'inhibiteur du C1 fonctionnel nettement inférieur à la moyenne normale. Ces données sont présentées dans le Tableau 3.

**TABLEAU 3  
PATIENTS SOUFFRANT D'ANGIOÈDÈME**

| N° du patient | Site | Pourcentage par rapport à la moyenne normale (%) | Interprétation |
|---------------|------|--|----------------|
| 1P*           | A    | 19   | anormal        |
| 1S*           | A    | 37   | anormal        |
| 2**           | A    | 0  | anormal        |
| 2**           | A    | 6  | anormal        |
| 3             | A    | 0  | anormal        |
| 4             | A    | 17   | anormal        |
| 5             | A    | 6  | anormal        |
| 6             | A    | 0  | anormal        |
| 7             | A    | 0  | anormal        |
| 8†            | A    | 56   | anormal        |
| 9†            | A    | 61   | anormal        |
| 10            | B    | 8  | anormal        |
| 11            | C    | 0  | anormal        |
| 12            | D    | 28   | anormal        |
| 13            | D    | 14   | anormal        |
| 14            | D    | 32   | anormal        |
| 15            | D    | 21   | anormal        |
| 16†           | D    | 45   | anormal        |
| 17            | D    | 3  | anormal        |
| 18            | D    | 24   | anormal        |
| 19            | E    | 0  | anormal        |
| 20            | E    | 0  | anormal        |
| 21            | E    | 2  | anormal        |
| 22            | E    | 13   | anormal        |
| 23            | E    | 17   | anormal        |
| 24            | E    | 19   | anormal        |
| 25            | E    | 4  | anormal        |
| 26            | E    | 3  | anormal        |
| 27†           | E    | 44   | anormal        |
| 28            | E    | 0  | anormal        |

\* 1S et 1P : sérum et plasma EDTA prélevés sur un patient au même moment.

\*\* Les deux échantillons provenant du patient N°2 ont été obtenus à trois ans d'intervalle.

† Les tests de ces patients ont donné des résultats ambigus à plusieurs reprises, ces derniers ont donc été considérés comme anormaux.

## CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

### Exactitude

Suivant un modèle de régression linéaire, les concentrations en inhibiteur du C1 de quinze sérums normaux, mesurées par l'essai immunoenzymatique, ont été consignées en fonction de leur concentration, telle que déterminée par une technique d'immunodiffusion radiale. Le taux de concentration en inhibiteur du C1 de l'étalon primaire a été déterminé en utilisant des étalons de kit à valeur déterminée, en se basant sur le modèle de régression linéaire. Afin de vérifier le degré de précision de ce modèle, six analyses de concentration en inhibiteur du C1 ont également été effectuées pour l'étalon primaire par immunodiffusion radiale. Ces deux méthodes de mesure de la concentration en inhibiteur du C1 ont permis d'obtenir des résultats similaires. La valeur moyenne obtenue sur 100 échantillons de sérum normal par l'essai immunoenzymatique de MicroVue portant sur l'inhibiteur du C1 est de 182 µg/ml. Cette valeur est du même ordre que la concentration normale indiquée qui est de 180 µg/ml.

### Précision

Trois lots de kits d'essai ont été évalués. Chaque kit a été testé trois fois par un technicien différent. Les échantillons ont été testés par réplicats de trois lors de chacune des neuf séries de test. Le Tableau 4 indique les variations au cours d'un même essai, et entre les différents essais.

**TABLEAU 4  
REPRODUCTIBILITÉ DE L'ESSAI**

| Type          | Moyenne (A <sub>405</sub> ) | Intra-essai (CV en %) | Inter-essais (CV en %) |
|---------------|-----------------------------|-----------------------|------------------------|
| Échantillon 1 | 1,26                        | 3                     | 11                     |
| Échantillon 2 | 0,68                        | 5                     | 15                     |
| Échantillon 3 | (-) 0,02                    | 26                    | 47                     |
| Étalon A      | (-) 0,02                    | 22                    | 33                     |
| Étalon B      | 0,39                        | 5                     | 19                     |
| Étalon C      | 1,35                        | 6                     | 13                     |

### Spécificité

L'inhibiteur du C1 antihumain de chèvre utilisé pour préparer le conjugué a été comparé à un autre anticorps de l'inhibiteur du C1 disponible sur le marché et autorisé par la FDA. Il a fait montre d'une seule ligne d'identité lors d'un test d'immunodiffusion. De plus, l'immunosérum de Quidel s'est avéré monospécifique pour l'inhibiteur du C1 lorsque testé à différentes concentrations par rapport à du sérum humain normal venant d'être prélevé et contenant 10 mM d'EDTA. Les analyses ont été réalisées par immunodiffusion double, par immunoelectrophorèse unidimensionnelle et bidimensionnelle et par immunoelectrophorèse fusiforme.

### ASSISTANCE

Pour obtenir ces services depuis les autres pays, veuillez contacter votre distributeur local. Vous trouverez les informations sur Quidel, ses produits et ses distributeurs sur le site [www.quidel.com](http://www.quidel.com).

## RÉFÉRENCES

1. Ratnoff, O.D., J. Pinsky, D. Ogston, and G.B. Naff. The inhibition of plasmin, plasma kallikrein, plasma permeability factor, and C'1r subcomponent of the first component of complement by serum C'1 esterase inhibitor. *J. Exp. Med.* 129:315, 1969.
2. Travis, J. and G.S. Salvesen. Human plasma proteinase inhibitors. *Ann. Rev. Biochem.* 52:655,1983.
3. Donaldson, V.H. and R.R. Evans. A biochemical abnormality in hereditary angioneurotic edema. Absence of serum inhibitor of C'1-esterase. *Am. J. Med.* 35:37, 1963.
4. Rosen, F.S., C.A. Alper, J. Pinsky, M.R. Klemperer, and V.H. Donaldson. Genetically determined heterogeneity of the C1 esterase inhibitor in patients with hereditary angioneurotic edema. *J. Clin. Invest.* 50:2143, 1971.
5. Gelfand, J.A., G.R. Boss, C.L. Conley, R. Reinhart, and M.M. Frank. Acquired C1 esterase inhibitor deficiency and angioedema: a review. *Medicine.* 58:321,1979.
6. Kerr, M.A. and A.A.C. Yeung-Laiwah. C1-Inhibitor deficiency and angioedema. In: *Complement in Health and Disease*, ed. K. Whaley, MTP Press Limited, p. 53,1987.
7. Donaldson, V.H. Serum inhibitor of C'1-esterase in health and disease. *J. Lab. Clin. Med.* 68:369,1966.
8. Levy, L.R. and I.H. Lepow. Assay and properties of serum inhibitor of C1-esterase. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 101:608, 1959.
9. Ziccardi, R.J. and N.R. Cooper. Development of an immunochemical test to assess C1 inactivator function in human serum and its use for the diagnosis of hereditary angioedema. *Clin. Immunol. Immunopath.* 15:465,1980.
10. Gigli, I., S. Ruddy, and K.F. Austen. The stoichiometric measurement of the serum inhibition of the first component of complement by the inhibition of immune hemolysis. *J. Immunol.* 100(6): 1154, 1968.
11. Centers for Disease Control. Recommendations for prevention of HIV transmission in health-care settings. *MMWR* 1987;36 (suppl no. 2S):001.

---

## GLOSSAIRE



Consulter les instructions d'utilisation au CDROM



Application

---

REF A003 – **MICROVUE** C1-Inhibitor EIA Kit  
Complement



Quidel Corporation | 10165 McKellar Court  
San Diego, CA 92121 USA | [www.quidel.com](http://www.quidel.com)



MDSS GmbH  
Schiffgraben 41  
30175 Hannover, Germany