

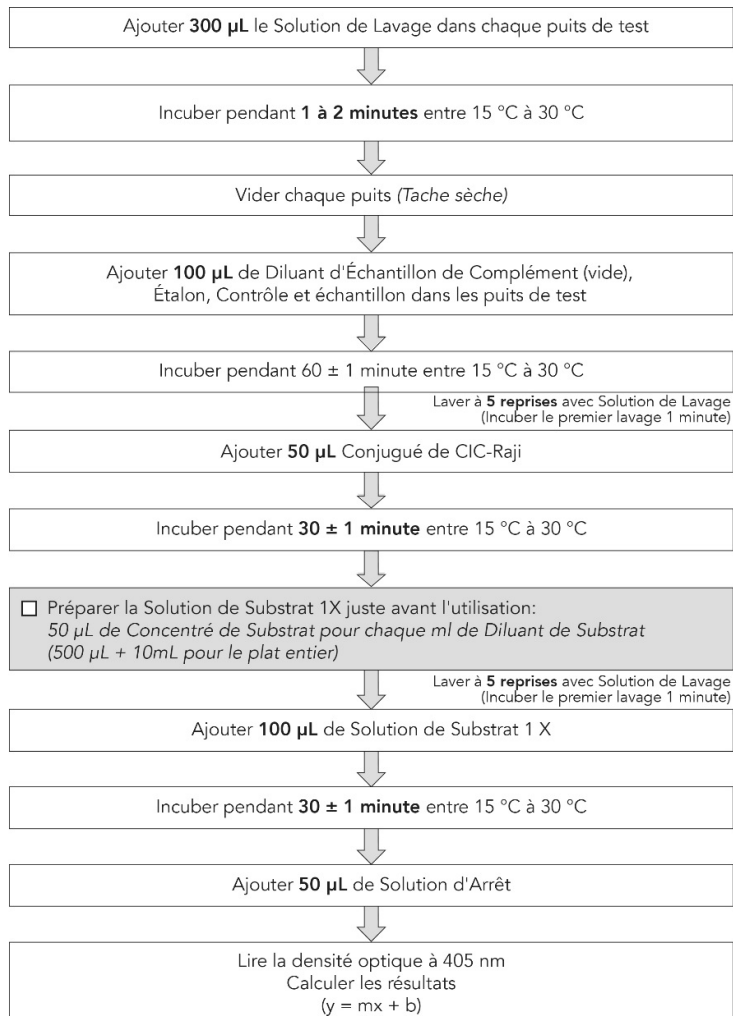
**Essai immunoenzymatique portant sur la quantification des complexes immuns circulants (CIC) contenant des fragments d'activation du C3 et présents dans le sérum ou le plasma humains**

## SOMMAIRE

### Préparation de réactif, contrôle, et d'échantillon

- Diluer Concentré de Solution de Lavage 1 :20 avec de l'eau désionisée.
- Reconstituez chaque Contrôle avec 1.0 ml de Diluant d'Échantillon de Complément, mélange complètement et congé pendant 15 minutes. *(Pour confirmer la Contrôle Haute, employez 1 mL de Diluant de Confirmation CJC-Raji pour l'étape de reconstitution.)*
- Diluer l'échantillon 1 :50 avec Diluant d'Échantillon de Complément (10 µL + 490 µL).
- Pour confirmer de hauts échantillons , diluer 1 :50 avec de Diluant de Confirmation CIC-Raji.

### Procédure de l'essai





L'essai immunoenzymatique de remplacement des cellules CICRaji de MicroVue porte sur la quantification des complexes immuns contenant des fragments d'activation du C3 dans le sérum et le plasma humains.

### RÉSUMÉ ET EXPLICATION

L'importance des complexes immuns circulants (CIC) et leur lien avec diverses maladies font l'objet de recherches depuis plusieurs années. La formation de complexes immuns est un processus de protection continu, généralement bénin, effectué par un système immunitaire fonctionnant normalement. Dans un hôte normal, les CIC sont retirés de la circulation sous les effets de plusieurs processus biochimiques, enzymatiques et cellulaires complexes. La clairance effective de nombreux CIC requiert l'activation du complément. L'activation du complément entraîne un dépôt des fragments du C3 dans le complexe immun suivi par une élimination accrue par les phagocytes du système réticuloendothélial. Dans le cas de certaines maladies, qui ne sont pas complètement comprises, les complexes immuns peuvent ne pas être éliminés efficacement de l'organisme. Dans ces maladies, les complexes immuns peuvent s'accumuler et provoquer des lésions de certains organes et tissus liés au complément. Cette activation du complément peut entraîner une série d'événements potentiellement destructeurs au niveau de l'hôte, notamment la production d'anaphylatoxine, la lyse de cellules, la stimulation de leucocytes, et l'activation de macrophages et d'autres cellules.<sup>1</sup> Lorsque les complexes immuns viennent se fixer sur les parois vasculaires ou les membranes cellulaires, une destruction de tissu sain peut se produire, comme dans certains cas de glomérulonéphrite.

Certaines caractéristiques des CIC influent sur leur pathogénicité potentielle. Les éléments les plus importants sont : (1) la nature, la taille et la concentration de l'antigène ; (2) la nature, la taille et la concentration de l'anticorps ; et (3) le taux de formation et de clairance des complexes immuns.<sup>1,2</sup>

Les complexes immuns circulants ont été mesurés dans différentes conditions : infections, troubles auto-immuns, traumatismes, et maladies néoplasiques prolifératives, par exemple. Les études actuelles suggèrent que la détermination des CIC peut être importante dans l'évaluation de certaines maladies et, parfois, dans le contrôle de l'efficacité du traitement. C'est particulièrement vrai dans les cas de lupus érythémateux disséminé (LED) et pour certaines formes d'arthrite rhumatoïde.<sup>3,4</sup> Le premier stade de la maladie lié à la formation de complexes immuns est une atteinte sérique, décrite au début du XXe siècle par von Pirquet. Depuis cette époque, des taux élevés de CIC ont été constatés dans les cas de maladies auto-immunes (lupus érythémateux disséminé, syndrome lié au lupus érythémateux disséminé, arthrite rhumatoïde), glomérulonéphrite, maladies néoplasiques (maladie de Hodgkin, leucémie), infections bactériennes (endocardite bactérienne subaiguë, lèpre), infections parasitaires (paludisme, bilharziose) et infections virales (hépatite, mononucléose).

Plus de 40 techniques d'analyse de détection ou de quantification des CIC ont été mises au point. Ces tests, qui comprennent notamment le test utilisant les cellules Raji, le test d'écart du C1q, le test de la conglutinine, les procédés de fixation du C1q en phase fluide, le test du facteur rhumatoïde, le test de la précipitine du PEG, et les essais du C1q en phase solide ont été décrits.<sup>1,5</sup> Étant donné que la taille et les propriétés physicochimiques des CIC varient considérablement, aucun de ces essais n'a été accepté comme norme. Une étude collaborative menée sous l'égide de l'Organisation mondiale de la Santé en 1978 a montré qu'aucune de ces méthodes n'était adaptée à tous les stades de la maladie suspectée, et a recommandé de recourir à au moins deux méthodes d'essais différentes pour détecter et quantifier les CIC.

### PRINCIPE DU PROCÉDÉ

Les fragments du troisième composant du complément, C3, se lient souvent de manière covalente aux complexes immuns activant le complément. Les cellules Raji, issues d'une lignée de cellules en culture continue de lymphocytes B, portent des récepteurs du complément CR2 qui se lient aux fragments iC3b, C3d,g et C3d du C3 activé.<sup>6,7,8</sup> L'essai Raji Cell CIC est basé sur la capacité des récepteurs CR2 des cellules

Raji à se lier aux complexes immuns contenant ces fragments du C3.<sup>6</sup> L'essai immunoenzymatique de remplacement des cellules CIC-Raji de MicroVue permet également de quantifier les fragments du C3 contenant des CIC en utilisant un anticorps monoclonal immobilisé qui se lie spécifiquement aux fragments d'activation iC3b, C3d,g et C3d du C3 de manière analogue à la réaction de liaison des CR2 des cellules Raji.

Lors de la première étape, les échantillons étalon et les échantillons plasmatiques ou sériques dilués dans le diluant de l'échantillon de complément sont ajoutés dans les puits de micro-essai enduits d'anticorps monoclonaux aux fragments du C3 humain, puis incubés. Pendant cette incubation, les complexes immuns contenant des fragments d'activation du C3 sont capturés par l'anticorps en phase solide. Après incubation, les protéines sériques ou plasmatiques non liées sont éliminées au cours d'un cycle de lavage.

Lors de la deuxième étape, des IgG antihumaines de souris conjuguées à de la peroxydase de raifort (HRP) sont ajoutées dans chacun des puits de test et incubées. Pendant cette incubation, le conjugué se lie aux complexes immuns qui sont désormais liés aux puits de micro-essai. Le conjugué non lié est éliminé au cours d'un cycle de lavage.

Au cours de la troisième étape, un substrat enzymatique est ajouté dans chaque puits de micro-essai. La réaction du conjugué anticorps-HRP avec le substrat chromogénique se traduit par une coloration verte. Après incubation, on ajoute un réactif pour arrêter la propagation de la coloration.

L'absorbance des échantillons étalon et à analyser (valeurs  $A_{405}$ ) est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre. L'intensité de la coloration verte qui apparaît est proportionnelle à la quantité de CIC se liant à la phase solide. On obtient une courbe étalon en reliant les valeurs  $A_{405}$  obtenues pour chaque échantillon étalon à sa concentration indiquée. On détermine la concentration de complexes immuns présents dans l'échantillon à analyser en se référant à la courbe étalon. Les résultats sont exprimés en microgrammes d'équivalents gamma-globuline humaine agrégée par la chaleur et traitée par sérum par mL ( $\mu\text{g Eq/mL}$ ). Afin de confirmer la présence de CIC, l'échantillon peut être analysé après dilution dans du diluant de confirmation CIC-Raji, qui contient des anticorps bloquants dont les spécificités sont similaires à l'anticorps immobilisé sur le puits de micro-essai.

## RÉACTIFS ET MATÉRIAUX FOURNIS

Le kit d'essai immunoenzymatique CIC-Raji Cell contient les éléments suivants :

<b>A</b>	<b>Des échantillons</b>	<b>Réf. A9970-A9974</b>	<b>1 chacun x 2 mL</b>
<b>B</b>	Chacun d'entre eux contient une quantité connue de gammaglobuline humaine agrégée par la		
<b>C</b>	chaleur et traitée par sérum dans une PBS, 2,5 % de stabilisants, et 0,01 % de thimérosal		
<b>D</b>			
<b>E</b>			
<b>L</b>	<b>CIC-RCR Contrôle bas</b>	<b>Réf. A9919</b>	<b>3 flacons</b>
	(Lyophilisé) Contient de faibles niveaux de HAGG traitées par sérum dans du sérum humain, 20 mM d'EDTA, 0,01 % de thimérosal		
<b>H</b>	<b>CIC-RCR Contrôle haut</b>	<b>Réf. A9920</b>	<b>3 flacons</b>
	(Lyophilisé) Contient des niveaux élevés de HAGG traitées par sérum dans du sérum humain, 20 mM d'EDTA, 0,01 % de thimérosal		
<b>①</b>	<b>Plaque de micro-essai</b>	<b>Réf. A9512</b>	<b>12 chacun</b>
	De 96 puits avec portoir et support composé de bandes de huit puits enduites de fragments de C3 anti-humain de souris dans une poche d'aluminium refermable		
<b>②</b>	<b>Solution d'arrêt</b>	<b>Réf. A3673</b>	<b>6 mL</b>
	Contient 250 mM d'acide oxalique		

- |          |   |                   |                          |
|----------|---|-------------------|--------------------------|
| <b>3</b> | <b>Concentré de solution de lavage 20X</b><br>Chacun contient une solution saline de tampon phosphate (PBS), 1,0 % de Tween-20®, et 0,035 % Proclin® 300                      | <b>Réf. A9957</b> | <b>2 flacons x 50 mL</b> |
| <b>4</b> | <b>Diluant de l'échantillon de complément</b><br>Contient de la PBS, 2,5 % de stabilisants, 0,035 % de ProClin 300  | <b>Réf. A3670</b> | <b>50 mL</b>             |
| <b>5</b> | <b>Diluant du substrat</b><br>Contient 0,1 M de tampon citrate et 0,05 % d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>  | <b>Réf. A3672</b> | <b>25 mL</b>             |
| <b>6</b> | <b>Concentré de substrat</b><br>Contient 0,7 % de 2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazoline-6-acide sulfonique) et du sel de diammonium   | <b>Réf. A3671</b> | <b>1,5 mL</b>            |
| <b>7</b> | <b>Conjugué CIC-Raji</b><br>Contient des IgG anti-humaine (de souris) conjuguées à de la peroxydase en suspension dans un tampon stabilisant de HRP contenant un conservateur | <b>Réf. A9516</b> | <b>2 flacons x 3 mL</b>  |
| <b>8</b> | <b>Diluant de confirmation CIC-Raji</b><br>Contient de la PBS, 2,5 % des stabilisants, un anticorps anti-fragment C3 humain, et 0,035 % du ProClin 300                        | <b>Réf. A9517</b> | <b>12 mL</b>             |

Tween-20® è un marchio registrato di ICI Americas Inc.  
ProClin® è un marchio registrato di Rohm and Haas Company.

## 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 système de lavage adapté aux dosages immunologiques
- 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 A<sub>405</sub> entre 0,0 et 2,0
- Eau déionisée ou distillée

## AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

- Pour utilisation diagnostique *in vitro*.
- Traiter les échantillons comme du matériel potentiellement contaminant.
- Suivre les précautions standard lors de la manipulation du contenu de ce kit et de tous les échantillons de patients.
- Utiliser les réactifs fournis en une seule livraison avant la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
- Stocker les réactifs de l'essai selon les indications.
- Ne pas utiliser les plaques enduites si la pochette est percée.
- 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.
- 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.
- L'utilisation de pipettes multi-canaux ou de robots pipetteurs est recommandée pour assurer la distribution rapide des réactifs.

- Pour une mesure exacte des échantillons, ajouter les échantillons et les solutions étalon avec précision. Pipetter avec soin, en utilisant uniquement un équipement étalonné.
- Il est essentiel de prélever et de conserver les échantillons avec soin pour obtenir des résultats corrects (voir la section *PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION DES ÉCHANTILLONS*).
- Éviter toute contamination microbienne ou croisée des échantillons, des réactifs et du matériel. En cas de contamination, des résultats inexacts pourraient être obtenus.
- Tester chaque échantillon en double.
- Ne pas réutiliser un puits de micro-essai pour un deuxième test.
- Le fait de ne pas appliquer les durées et températures d'incubation indiquées dans le procédé est susceptible de conduire à des résultats erronés.
- **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.**
- Ne pas laisser sécher les puits de micro-essai une fois que l'essai a commencé.
- Ne pas effleurer ni toucher le fond des puits en ajoutant ou en aspirant des liquides.
- Des échantillons inactivés par la chaleur, hyperlipé-miques ou contaminés, peuvent entraîner des résultats erronés.
- 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.
- Cet essai peut être effectué avec n'importe quelle méthode de lavage validée. **Pour un résultat optimal, ne pas utiliser de pipette multicanaux pour laver les barrettes de puits.**
- Le test doit être effectué dans une zone suffisamment ventilée.
- Éliminer les contenants et les contenus non utilisés conformément aux exigences fédérales, nationales et réglementations réglementaires locales.
- Porter des gants et des lunettes de protection, et suivre les bonnes pratiques de laboratoire en manipulant cette trousse.
- Lavez-vous soigneusement les mains après manipulation.
- Pour en savoir plus sur les symboles de danger, la sécurité, la manipulation et l'élimination des composants de ce kit, veuillez vous référer à la Fiche de données de sécurité (FDS) que vous trouverez sur [quidel.com](http://quidel.com).

## CONSERVATION

Conserver les kits non ouverts entre 2 °C à 8 °C. Après ouverture du kit, le concentré de solution de lavage 20X peut être conservé entre 2 °C à 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 °C 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.

Les échantillons sériques ou plasmatiques doivent être prélevés dans des conditions d'asepsie et préparés suivant les techniques standard pour les tests en laboratoire d'analyse.<sup>9,10</sup> Ne pas inactiver les échantillons

par la chaleur. Avant le test, toute particule doit être éliminée des échantillons par centrifugation à faible vitesse.

Les échantillons peuvent être stockés sur de la glace, à environ 0 °C pendant 6 heures maximum. Si les échantillons sont conservés pendant plus longtemps, il faut les congeler à -70 °C minimum (le stockage à -20 °C peut entraîner des résultats erronés).

## PRÉPARATION DES RÉACTIFS

Se référer au Tableau 1 pour connaître les quantités de solution de substrat et le nombre de bandes nécessaires pour un nombre donné de tests. Après avoir choisi les réactifs et les matériaux nécessaires, replacer immédiatement les produits inutilisés aux températures de conservation appropriées (voir la partie *CONSERVATION*). Amener tous les réactifs et matériaux de l'essai à température ambiante (de 15 °C à 30 °C) avant utilisation.

### 1. 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 °C à 8 °C, il est possible que des cristaux se soient formés. Pour les dissoudre, réchauffer le flacon au bain-marie entre 37 °C et 50 °C jusqu'à dissolution complète, puis bien mélanger. Préparer la solution de lavage 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 °C à 8 °C. Si le réactif devient trouble ou se décolore, il doit être jeté.

### 2. Sélection des bandes de micro-essai.

Déterminer le nombre de bandes pour l'essai en consultant le Tableau 1. Retirer le support pour bandes de la plaque assemblée. Remettre les bandes inutilisées dans le sac de conservation refermé, et le stocker entre 2 °C à 8 °C. Fixer solidement les bandes utilisées pour l'essai.

### 3. Dilution de l'échantillon.

***Avertissement: Manipuler tous les échantillons comme s'ils étaient potentiellement infectieux. Ne pas utiliser d'échantillons inactivés par la chaleur ou contaminés.***

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 sur la fiche technique fournie. Préparer une solution diluée à 1:50 de chaque échantillon à l'aide de diluant de l'échantillon de complément (ex. : 10 µL d'échantillon de test mélangé avec 490 µL de diluant de l'échantillon de complément). Bien mélanger, mais éviter de faire de la mousse et des bulles. Ne pas conserver ni réutiliser les échantillons dilués.

### 4. Ajout d'échantillons dilués dans les puits de microtitrage.

Il existe deux méthodes pour ajouter le tampon et les échantillons dilués, étalon et de contrôle dans les puits (voir étape 5 de la partie *PROCÉDÉ DE L'ESSAI*). Lors de tests d'ampleur limitée pour lesquels seuls quelques échantillons sont testés, les échantillons dilués et les autres réactifs peuvent être ajoutés directement dans les puits qui leur ont été attribués à l'aide d'une micropipette (100 µL/puits). Pour les analyses de faible et de grande ampleur, mais en particulier pour ces dernières, nous recommandons d'utiliser une pipette multi-canaux pour ajouter les échantillons comme indiqué ci-après. **(Une pipette multi-canaux peut également servir à ajouter facilement le conjugué, le substrat et la solution d'arrêt.)**

Afin de verser les échantillons étalon, de contrôle et dilués dans les puits de micro-essai le plus rapidement possible, on peut utiliser la « technique des répliques ». Au lieu d'ajouter 100 µL de chacun des trois types d'échantillons dans les puits enduits d'anticorps un par un, il est possible d'ajouter entre 120 et 130 µL de chaque solution dans les différents puits d'une plaque vide (non fournie) correspondant au schéma d'essai immunoenzymatique souhaité. Une fois que toutes les solutions à analyser ont été versées dans les puits de micro-essai de la plaque vide, transvaser rapidement 100 µL

de chaque puits vide dans les puits enduits d'anticorps, à l'aide d'une micropipette multi-canaux. Pour éviter toute contamination croisée, les embouts des pipettes doivent être changés à chaque fois que la composition des échantillons à transvaser change.

5. **Diluant de confirmation CIC-Raji (en option).**

Si l'on souhaite une confirmation des résultats positifs, déterminer le nombre (N) d'échantillons devant être confirmés. Numéroter les tubes à essai de 1c à Nc et les enregistrer. Préparer la dilution à 1:50 en utilisant le diluant de confirmation CIC-Raji. L'échantillon dilué dans du diluant de confirmation CIC-Raji doit être analysé **en même temps** que l'échantillon dilué dans du diluant d'échantillon de complément.

6. **Préparation de solution de substrat.**

**À préparer juste avant l'utilisation.** Déterminer le volume de solution de substrat requis à l'aide du Tableau 1 ci-après. Préparer la solution de substrat en ajoutant 50 µL de concentré de substrat pour chaque mL de diluant de substrat. Bien mélanger.

7. **Contrôles CIC.**

Chaque contrôle doit être reconstitué avec 1,0 mL ± 0,05 mL de diluant d'échantillon de complément fourni. Après reconstitution, mélanger le contenu de chaque flacon doucement, mais complètement, afin de garantir une réhydratation complète. Incuber les solutions réhydratées à température ambiante (15 °C à 30 °C) pendant 10 à 15 minutes. Mélanger doucement, mais complètement de nouveau, et utiliser. AUCUNE DILUTION SUPPLÉMENTAIRE NÉCESSAIRE.

**Tableau 1**  
**Matériel et Quantités Nécessaires Pour L'essai**

Puits <sup>1</sup>	Bandes de 8 puits	Solution de substrat nécessaire(mL)	Diluant de substrat (mL)	Concentré de substrat (µL)
16	2	1,6	2,0	100
24	3	2,4	3,0	150
32	4	3,2	4,0	200
40	5	4,0	5,0	250
48	6	4,8	5,0	250
56	7	5,6	6,0	300
64	8	6,4	7,0	350
72	9	7,2	8,0	400
80	10	8,0	9,0	450
88	11	8,8	9,0	450
96	12	9,6	10,0	500

<sup>1</sup>Déterminer le nombre d'échantillons à analyser, et ajouter quinze (15) puits pour les cinq (5) échantillons étalon et les échantillons de contrôle haut et bas à analyser (en double), ainsi qu'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.

## PROCÉDÉ DE L'ESSAI

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

Voir les parties *PRÉPARATION DES RÉACTIFS* et *AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS* avant de poursuivre

1. Noter les emplacements de puits de micro-essai correspondant au(x) puits vide(s), aux échantillons à analyser, étalon et contrôles 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.
2. Préparer les bandes de micro-essai comme indiqué ci-après:
  - a. Réhydrater les puits de micro-essai en ajoutant environ 300 µL de solution de lavage dans chaque puits à l'aide d'un flacon de lavage ou tout autre dispositif de remplissage.
  - b. Incuber à température ambiante (15 °C à 30 °C) pendant 1 à 2 minutes.
  - c. Aspirer le contenu de chaque puits.

- d. 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.
3. Ajouter 100 µL de diluant de l'échantillon de complément dans le(s) puits qui sera/ont utilisé(s) pour vider le lecteur de plaque.
4. Ajouter 100 µL de chaque échantillon étalon de CIC-Raji (A, B, C, D et E) dans les puits en double.
5. Ajouter 100 µL de chaque échantillon dilué dans le puits de micro-essai qui lui a été attribué. Voir la partie *PRÉPARATION DES RÉACTIFS*, étape 4.
6. Incuber à température ambiante (15 °C à 30 °C) pendant 60 minutes ± 1 minute.
7. Laver les puits de micro-essai comme suit :
  - a. Après l'incubation de l'étape 6 (et de l'étape 9 plus bas), vider chaque puits.
  - b. Ajouter environ 300 µL de solution de lavage dans chaque puits à l'aide d'un flacon de lavage ou tout dispositif de remplissage.
  - c. Incuber les puits pendant 1 minute à température ambiante (15 °C à 30 °C).
  - d. Vider chaque puits.
  - e. Ajouter environ 300 µL de solution de lavage dans chaque puits.
  - f. Vider chaque puits.
  - g. Renouveler les étapes e à f encore trois fois.**
  - h. 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.
8. Verser 50 µL de conjugué CIC-Raji dans chaque puits lavé, y compris dans les puits vides, au moyen d'une pipette multi-canaux ou automatisée.
9. Incuber les bandes de micro-essai à température ambiante (15 °C à 30 °C) pendant 30 minutes ± 1 minute. **Préparer la solution de substrat pendant cette incubation (voir *PRÉPARATION DES RÉACTIFS* étape 6).**
10. Laver les puits de micro-essai après l'incubation de 30 minutes de l'étape 9, comme décrit ci-avant, à l'étape 7.
11. 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), à l'aide d'une pipette multi-canaux ou automatisée.
12. Incuber les bandes de micro-essai à température ambiante (15 °C à 30 °C) pendant 30 minutes ± 1 minute.
13. Verser 50 µL de solution d'arrêt dans chaque puits pour arrêter la réaction enzymatique, au moyen d'une pipette multi-canaux ou automatisée. 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 pour que la couleur se propage régulièrement.
14. 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 13), en corrigeant le puits vide en fonction du type de système spectrophotométrique utilisé.
15. Garder le portoir et le support pour bandes en vue d'une réutilisation.
16. Jeter les échantillons dilués restants, ainsi que le substrat et les bandes de micro-essai utilisées conformément aux exigences fédérales, nationales et réglementations réglementaires locales. Garder le portoir et le support pour bandes en vue d'une réutilisation.

## MÉTHODE DE CONFIRMATION RECOMMANDÉE

S'il est nécessaire de confirmer un résultat positif avec un autre test, ou si un résultat positif est incompatible avec l'interprétation clinique, l'échantillon positif peut être soumis de nouveau à un test de confirmation. Un résultat négatif ne peut être confirmé. La méthode de confirmation repose sur un diluant d'échantillon (le Diluant de Confirmation CIC-Raji) qui contient des anticorps anti-fragment C3 humain. Pour confirmer un résultat positif, une aliquote de l'échantillon doit être diluée dans le Diluant de Confirmation CIC-Raji, et une autre aliquote doit être diluée dans la même proportion dans le Diluant de l'Échantillon de Complément. Les deux échantillons sont alors testés suivant le procédé habituel de l'essai immunoenzymatique de remplacement CIC-Raji de MicroVue. Voir les parties *PRÉPARATION DES RÉACTIFS* et *INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS* pour plus de détails.



## CONTRÔLE QUALITÉ

Si le contrôle positif et/ou négatif ne fonctionne pas comme indiqué, veuillez contacter l'Assistance technique Quidel dès que possible.

En plus des échantillons de contrôle, l'essai de remplacement des cellules CIC-Raji MicroVue comprend également une *MÉTHODE DE CONFIRMATION RECOMMANDÉE* et une étape de *VALIDATION*.

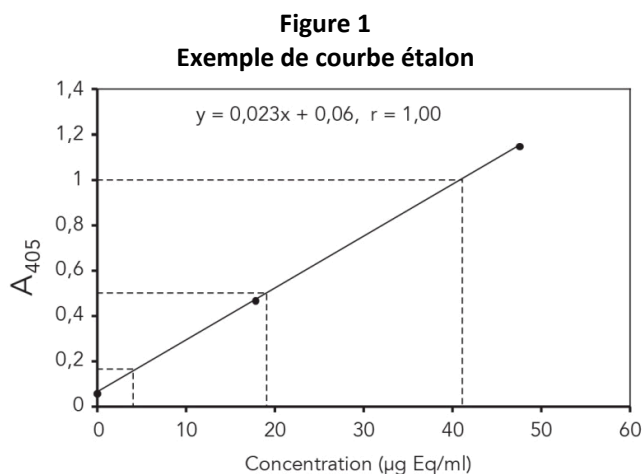
En utilisant les contrôles, étalons avec validation, et la méthode de confirmation, vous devez pouvoir obtenir des résultats reproductibles et précis.

## INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

### Calcul des résultats

**Calculs :** On obtient la courbe étalon en utilisant les valeurs  $A_{405}$  pour chaque échantillon étalon CIC-Raji, auxquelles on a soustrait l'échantillon à blanc (en ordonnée), et les microgrammes correspondants d'équivalent gammaglobuline humaine agrégée par la chaleur et traitée par sérum par mL ( $\mu\text{g Eq/ml}$ ), indiqués sur l'étiquette du flacon pour chaque étalon (en abscisse). Après régression linéaire, la courbe étalon obtenue doit répondre aux critères de validation (voir ci-dessous). Les concentrations des échantillons sont alors calculées directement à partir de la courbe étalon. La plupart des ordinateurs et des calculateurs sont capables d'exécuter ces calculs.

Les données peuvent aussi être obtenues par graphique réalisé à la main et les valeurs ( $\mu\text{g Eq/ml}$ ) de l'échantillon à analyser peuvent être lues directement à partir de la courbe étalon la plus adaptée. La Figure 1 est un exemple de courbe étalon type.



**Calculs du test de confirmation :** Pour confirmer un résultat positif, on divise la concentration en complexes immuns de l'échantillon dilué dans du diluant de confirmation CIC-Raji par la concentration en complexes immuns de l'échantillon dilué dans du diluant d'échantillon de complément, pour obtenir un rapport :

$$\text{rapport} = \frac{[\text{CIC}] \text{ dans diluant de confirmation}}{[\text{CIC}] \text{ dans diluant échantillon de complément}}$$

Échantillon	A <sub>405</sub>	µg Eq/mL
Étalon A	0,6	0
Étalon B	0,18	5
Étalon C	0,45	17
Étalon D	0,75	30
Étalon E	1,16	48
Échantillon 1	0,15	3,9
Échantillon 2	0,50	19,1
Échantillon 3	1,00	40,9
r = 1,00	m = 0,023	b = 0,06

## 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 pour que l'essai soit valide.

---

coefficient de corrélation (r): > 0,95

pente(m): 0,013 à 0,034

point d'intersection sur l'axe des ordonnées y (b): de (-)0,07 à (+)0,10

---

La plupart des sujets sains ont des niveaux de CIC mesurables. Étant donné qu'il n'y a pas de niveau anormal de CIC reconnu, l'utilisateur doit établir ses propres niveaux normaux. À titre indicatif, les niveaux de CIC basés sur les résultats obtenus à partir de populations saines décrits dans la partie *VALEURS ATTENDUES* sont les suivants :

**Résultats normaux :** Si la concentration en CIC est inférieure ou égale à 15 µg Eq/ml, les niveaux de CIC sont considérés comme normaux.

**Résultats anormaux :** Si la concentration en CIC est supérieure ou égale à 20 µg Eq/ml, les niveaux de CIC sont considérés comme anormaux. Les échantillons dont les concentrations mesurées en CIC sont supérieures à l'étalon E CIC-Raji doivent être notés comme supérieurs aux concentrations d'étalon E CIC-Raji attribuées indiquées sur l'étiquette du flacon.

**Résultats ambigus :** Si la concentration en CIC est supérieure à 15 µg Eq/ml et inférieure à 20 µg Eq/ml, les résultats sont ambigus. Ces échantillons peuvent être analysés de nouveau, ou un nouvel échantillon peut être prélevé et analysé, si indiqué. Si un échantillon obtient un deuxième résultat ambigu, il peut alors être considéré comme nettement supérieur à la moyenne et donc être enregistré comme anormal.

**Résultats de confirmation :** Si le rapport est inférieur à 0,5, le résultat positif est confirmé. Autrement dit, une réduction supérieure à 50 % de la concentration en CIC apparente confirme un résultat positif.

Il arrive parfois que des échantillons positifs lors de l'essai ne soient pas confirmés comme tels. Cela peut être notamment dû à : (1) une mauvaise manipulation des échantillons (ex. : contaminés ou inactivés par la chaleur) ou (2) des échantillons contenant des anticorps IgG humains qui se lient aux IgG de souris. Ces échantillons ne sont pas forcément négatifs aux CIC. En effet, la substance à l'origine du faux positif peut masquer les CIC présents concomitamment qui, en l'absence de cette autre substance, donneraient un résultat positif pouvant être confirmé.

## LIMITES DU PROCÉDÉ

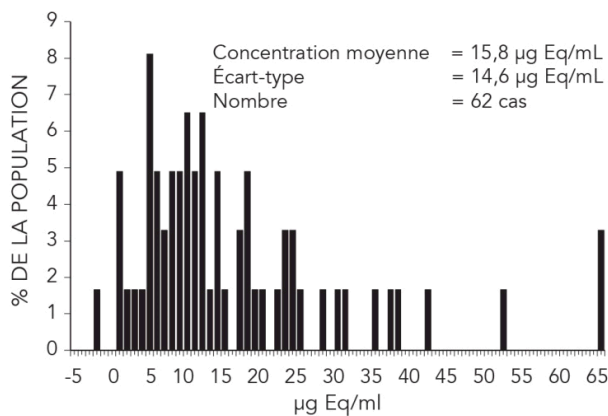
Ce test mesure la quantité de complexes immuns ou d'agrégats d'IgG humaine contenant des fragments d'activation du C3. Par conséquent, les conditions qui entraînent l'agrégation des IgG ou l'activation du complément doivent être évitées pendant le prélèvement et le traitement de l'échantillon.

## VALEURS ATTENDUES

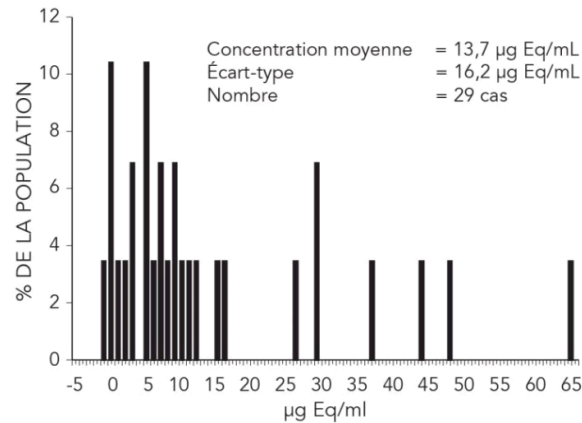
Cinquante (50) échantillons de sérum choisis ont été obtenus auprès d'un laboratoire de référence qui reçoit des échantillons provenant de tous les États-Unis. Ces échantillons de sérum ont été testés lors de l'essai immunoenzymatique de remplacement des cellules CIC-Raji de MicroVue et lors de l'essai sur les cellules Raji du laboratoire de référence. Une concordance de 92 % a été observée entre les deux essais en termes de détection de la présence de CIC.

Les échantillons de sérum obtenus auprès de soixante-deux (62) patients atteints de LED dans deux cliniques de l'Est des États-Unis et de vingt-neuf (29) patients souffrant d'AR soignés dans une clinique rhumatologique du Sud des États-Unis ont été analysés lors de l'essai immunoenzymatique de remplacement des cellules CIC-Raji de MicroVue. En outre, on a analysé des échantillons de sérum obtenus auprès de vingt-six (26) sujets sains suivis dans deux sites cliniques spécialisés dans le LED et de vingt-cinq (25) patients non-autoimmuns du point de vue clinique et suivis en clinique rhumatologique. Les concentrations moyennes de CIC, les écarts-types, et la distribution statistique pour chaque population sont présentés aux Figures 2, 3 et 4.

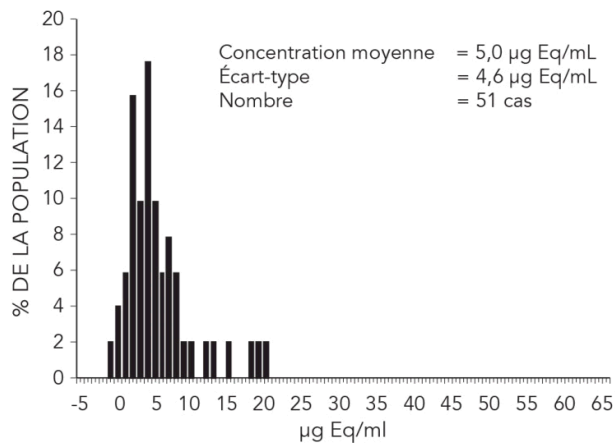
**Figure 2**  
**Essai Immunoenzymatique de Remplacement CIC-Raji**  
**Population Souffrant de Lupus Érythémateux Disséminé**



**Figure 3**  
**Essai Immunoenzymatique de Remplacement CIC-Raji**  
**Population Souffrant d'Arthrite Rhumatoïde**



**Figure 4**  
**Essai Immunoenzymatique de Remplacement CIC-Raji**  
**Population de Contrôle**



Sur un site spécialisé dans le LED et sur le site dédié à l'AR, le degré d'activité de la maladie a été attribué indépendamment de toute donnée de laboratoire sur les CIC. Cette évaluation a été effectuée par le(s) médecin(s) traitant(s). Pour garantir la cohérence du suivi, un médecin de chaque site a passé en revue ultérieurement les dossiers des patients et a défini l'activité de la maladie. Un patient atteint d'AR a été décrit comme étant au stade final, dit « d'épuisement ». Le résultat des CIC pour ce patient était de 1 µg Eq/ml. Puisqu'il n'y avait aucun autre patient atteint d'AR similaire, ce résultat n'est pas inclus dans le Tableau 2. Le Tableau 2 indique la relation observée entre les CIC mesurés par l'essai immunoenzymatique de remplacement des cellules CIC-Raji de MicroVue et l'activité de la maladie chez les patients.

**Tableau 2**  
**Résultats de l'Essai de Remplacement des Cellules CIC-Raji Comparés à l'Activité de la maladie**

	% Anormal*		
	Activité faible	Activité modérée	Activité élevée
LED	8 % (1/12)	36 % (4/11)	79 % (11/14)
AR	0 % (0/4)	19 % (3/16)	50 % (4/8)

\* Entre parenthèses (après chaque % anormal) figure le nombre de patients pour lesquels le résultat est anormal, divisé par le nombre de patients classés présentant une activité particulière de la maladie.

## CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

### Exactitude

Un étalon des complexes immuns de l'Organisation mondiale de la Santé (OMS), à savoir des complexes anatoxine tétanique-anatoxine antitétanique préincubés dans du sérum humain normal fraîchement prélevé, a été utilisé pour standardiser l'essai. Pour tester l'exactitude de l'essai, cinq dilutions de l'échantillon étalon de l'OMS ont été testées en triple au cours de neuf séries d'essais avec le kit de MicroVue.

Les concentrations analysées ont indiqué une corrélation de 0,99 avec les valeurs connues.

### Reproductibilité de l'essai

Les échantillons des patients et les étalons des kits ont été analysés au cours de neuf analyses utilisant deux lots de kits différents. Chaque échantillon a été testé en triple au cours de chaque série de tests. La variation moyenne entre chaque série, pour les échantillons à analyser et les étalons du kit, figure dans le Tableau 3 comme variation inter-essais. La variation moyenne dans chaque série, pour les échantillons à analyser et les étalons du kit, figure dans le Tableau 3 comme variation intra-essai.

**Tableau 3**  
**Reproductibilité de l'Essai**

		Moyenne	Intra-essai	Inter-essais
		(µg Eq/mL)	(CV en %)	(CV en %)
<b>Échantillon</b>	1	56	5	9
	2	13	9	23
<b>Étalon</b>	1	4	8	30
	2	11	7	15
	3	23	5	9
	4	32	4	6
	5	40	5	6
	6	48	4	5
	7	59	3	4

### Sensibilité

L'essai immunoenzymatique de remplacement des cellules CIC-Raji de MicroVue mesure au moins 4 µg Eq/ml d'analyte CIC basé sur la comparaison avec l'étalon de l'OMS.

### Spécificité

Les cinquante et un (51) échantillons de sérum de contrôle décrits dans la partie *VALEURS D'ÉCHANTILLON* ont été analysés au cours de l'essai de remplacement des cellules CIC-Raji de MicroVue. Seuls trois étaient positifs (systématiquement supérieurs à 15 µg Eq/ml), soit une spécificité de 94 %.

## 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 [quidel.com](http://quidel.com).

## RÉFÉRENCES

1. McDougal, J.S, McDuffie, F.C., Immune Complexes in Man: Detection and Clinical Significance, *Advances in Clinical Chemistry*, Vol. 24, p. 1, 1985.
2. Endo, L., Corman, L.C., Panush, R.S., Clinical Utility of Assays for Circulating Immune Complexes, *Medical Clinics of North America*, Vol. 69, No. 4, p. 623, July 1985.
3. Abrass, C.K., Nies, K.M., Louie, J.S., Border, W.A., Glasscock, R.J., Correlation and Predictive Accuracy of Circulating Immune Complexes with Disease Activity in Patients with Systemic Lupus Erythematosus, *Arthritis Rheum.*, Vol. 23, p. 273, 1980.
4. Duquesnoy, B., Circulating Immune Complexes and Complement in Rheumatoid Arthritis, *Ann. Biol. Clin.*, Vol. 42, p. 71, 1984.
5. Theofilopoulos, A.N., The Raji, Conglutinin, and Anti-C3 Assays for the Detection of Complement-Fixing Immune Complexes, *Methods in Enzymology*, Vol. 74, p. 511, 1981 .
6. Agnello, V., Winchester, R.J., Kunkel, H.G., Precipitin Reactions of the C1q Component of Complement with Aggregated Gamma-Globulin and Immune Complexes in Gel Diffusion, *Immunology*, Vol. 19, p. 909, 1970.
7. Hack, C.E., Huijbregts, C.C., Paardekooper, J., Influence of Ionic Strength, EDTA Concentration, Endogenous C1q and Polyanions on the 125I-C1q-Binding Test, *J. Immunol. Meth.*, Vol. 72, p. 197, 1984.
8. Richardson, J.H., Barkley, W.E., *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, p. 11-13, 1984.
9. Davidson, I., et al., *The Blood*, p. 1 20. in Cl. Davidson and J.B. Henry (ed.), Todd-Sanford Clinical Diagnosis, W.B. Saunders Co., Philadelphia, Pennsylvania, 1969.
10. Centers for Disease Control. Recommendations for prevention of HIV transmission in health-care settings. *MMWR* 1987;36 (suppl no. 2S):001.

**REF** A002 – CIC-Raji Cell Replacement

**IVD**



**EC REP**

MDSS GmbH  
Schiffgraben 41  
30175 Hannover,  
Germany



**Quidel Corporation**  
2005 East State Street, Suite 100  
Athens, OH 45701 USA  
[quidel.com](http://quidel.com)

**PIA002001FR00 (04/17)**

## GLOSSAIRE

---

**REF**

Référence catalogue



Conformité Européenne

---

**EC REP**

Représentant autorisé dans  
la Communauté Européenne

**LOT**

Référence du lot

---



Date d'expiration



Fabricant

---



Conditions de stockage



Utilisation prévue

---



Consulter les instructions  
électroniques



Risques biologiques

---

**IVD**

Pour utilisation *in vitro*



Contenu suffisant pour 96 déterminations

---

**CONT**

Contenu

**CONTROL**

Contrôle

---