

CH-50

CE

1. INTRODUCTION

La réduction du CH50 a lieu quand les divers composants du complément sont insuffisants ou épuisés.

Le principal usage de ce test concerne le domaine de l'allergologie et de l'immunologie afin de relever l'insuffisance des composants du complément associée à l'immunodéficience (carence affectant avant tout les composants classiques ou terminaux du complément). Divers composants absents ou ayant enregistré une réduction significative du complément peuvent provoquer des infections, des méningites de *Neisseria* ou des septicémies.

Un CH50 réduit induit l'approfondissement des analyses fonctionnelles de divers composants du complément.

2. INDICATION D'UTILISATION

Méthode immunoenzymatique colorimétrique pour la détermination qualitative de la fonctionnalité du complément dans le sérum humain.

3. PRINCIPE DU DOSAGE

Le complexe précipité β -galactosidase/anti- β -galactosidase est solubilisé par le sérum par dépôt des molécules de C3b. La formation de la quantité de C3b pour la solubilisation est médiée par la voie alternative, mais elle est accélérée par l'activité de la C3-convertase de la voie classique.

La quantité du complexe β -galactosidase dissociée de l'anticorps détectable dans le surnageant en fin de réaction et pouvant être relevée à travers l'activité enzymatique constitue une mesure de la capacité du sérum à former de la C3b.

L'O-nitrophényl-galactopyranoside (o-NPG) sert de substrat enzymatique et la mesure du produit (O-nitrophénol) est effectuée à 420 nm (405 nm).

4. MATERIELS

4.1. Réactifs fournis

- **Calibrateur de référence** : 1 flacon contenant 0,6 ml du calibrateur de référence synthétique. La valeur exacte du CH 50 est indiquée sur l'étiquette.
- **Tampon d'incubation** : 1 flacon contenant 12 ml de tampon phosphaté (50mM, pH 7.35)
- **Immuno-complexe** : 2 flacons contenant chacun 3 ml du β -galactosidase/anti- β -galactosidase
- **Substrat ONPG** : 1 flacon contenant 2.3 mM o-NPG lyophilisé en tampon phosphaté (15 mM, pH 7.0) (éviter tout contact avec la peau)
- **Ethanediol** : 1 flacon contenant 1 ml Ethanediol (nocif en cas d'ingestion)
- **Solution d'arrêt**: 1 flacon contenant 7 ml de tampon tris
- **Microplaque**
- **Contrôle faible** : 1 flacon contenant 0,6 ml de contrôle avec taux de solubilisation faible. La concentration est indiquée sur l'étiquette.
- **Contrôle élevé** : 1 flacon contenant 0,6 ml de contrôle avec taux de solubilisation élevé. La concentration est indiquée sur l'étiquette.

4.2. Matériels et équipements requis

- Incubateur 37°C
- Lecteur de microplaques ELISA, pour mesure l'absorbance à 420 ou 405 nm
- Centrifugeuse (10000 – 13500 xg « RCF »)
- Vortex
- Pipettes
- Eau distillée
- Tubes jetables
- Chronomètre

5. STABILITE ET CONSERVATION

Les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette s'ils sont conservés entre 2°C et 8 °C à l'obscurité.

6. PREPARATION DES REACTIFS

Il est très important que tous les réactifs, échantillons et contrôles soient portés à température ambiante (22°C – 28 °C) avant de commencer le dosage !

Remarques

Le calibrateur de référence et les contrôles sont synthétiques et garantissent donc un facteur de reproductibilité plus élevé ainsi qu'une plus grande stabilité par rapport aux produits humains.

6.1. Immunocomplexe

Utiliser le réactif sans le diluer. Agiter soigneusement l'immunocomplexe précipité avant usage en utilisant pour cela le vortex. Stable 3 mois à 2...8°C.

6.2. Substrat ONPG

Verser 10 ml d'eau distillée. Une fois la dissolution terminée, ajouter 0,5 ml d'Ethanediol. Stable 2 mois à 2...8°C.

Important : pour faciliter la répétition (inter-essais), il est conseillé d'amener le substrat à température ambiante (22-28°C) avant usage (ne pas dispenser le réactif dès la sortie du frigidaire).

7. ÉCHANTILLONS

Utiliser exclusivement des échantillons de sérum humain, ne pas utiliser des échantillons plasmatiques. Les échantillons humains sont stables pendant un mois s'ils sont conservés à -20° C (six mois à - 80 °C).

8. PROCÉDE DU DOSAGE

Lire attentivement la notice d'emploi **avant de** réaliser le dosage. La fiabilité des résultats dépend du suivi strict du protocole.

Étape no. 1 dans les pipettes d'Eppendorf :

1. Dispenser les échantillons sériques, le contrôle non solubilisant et le calibrateur de référence dans une éprouvette Eppendorf :

	Calibrateur de référence	Échantillon et contrôles	Contrôle non solubilisant
Tampon d'incubation	100 µl	100 µl	150 µl
Calibrateur de référence	50 µl	---	---
Échantillon et contrôles	----	50 µl	---
Immunocomplexe	50 µl	50 µl	50 µl

2. Utiliser le vortex et inverser plusieurs fois en s'assurant que la solution est bien mélangée.
3. Laisser à incuber pendant 2 heures à 37°C.
4. Centrifuger à 10000-13500 xg « RCF » pendant 15 minutes.
5. Transférer avec soin, en évitant de toucher la pastille, 50 µl de surnageant de chaque éprouvette d'Eppendorf dans le puits de la microplaque.

Important :

- éviter la re-suspension de la pastille; la pastille est souvent pas très visible, mais il est sur le fond du tube; par conséquent, ne pas toucher le fond du tube avec la pointe.
- ne pas agiter le produit centrifugé.
- prendre le surnageant délicatement afin d'éviter les turbulences qui pourraient provoquer une re-suspension de la pastille

La pastille est constituée d'immunocomplexe non solubilisé avec une grande activité enzymatique (β -galactosidase) ; la présence d'une petite quantité de pastille dans le surnageant peut donner de faux positifs ou altérer les valeurs des contrôles.

Étape no. 2 dans la microplaque :

	Blanc	Calibrateur de référence	Échantillon ou contrôles	Contrôle non solubilisant
Tampon d'incubation	50 µl			
Surnageant		50 µl	50 µl	50 µl
Substrat ONPG	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Laisser incuber pendant 15 minutes à 37°C à l'abri de la lumière.				
Solution d'arrêt	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
Agiter doucement la microplaque. Lire l'absorbance avec le blanc à 420 (405/420) nm.				

9. RESULTATS

9.1. Calcul des résultats

Calculer l'extinction moyenne de chacun des contrôles, du calibrateur de référence et de chaque échantillon.

Les résultats peuvent être exprimés comme suit :

- a. Valeur CH50
- b. % du calibrateur de référence

Déterminer les résultats en utilisant la formule suivante :

- a. $DO(\text{échantillon}) / DO(\text{calibrateur de référence}) \times CH50(\text{valeur du calibrateur de référence}) = \text{Valeur CH50 de l'échantillon}$
- b. $DO(\text{échantillon}) / DO(\text{calibrateur de référence}) \times CH(\% \text{ du calibrateur de référence}) = \% \text{ du calibrateur de référence}$

Exemple : Valeur de CH50 du flacon du calibrateur de référence = 100
% de CH50 du flacon du calibrateur de référence = 50

Absorbance du calibrateur de référence = 0,350

Absorbance de l'échantillon = 1,108

- a. Valeur de CH50 de l'échantillon = $1,108 / 0,350 \times 100 = 316$
- b. % de référence de l'échantillon = $1,108 / 0,350 \times 50 = 158\%$

9.2. Valeurs de Référence

% de référence	Valeur CH50	Interprétation
0 – 50	0 – 100	Absent ou faible
51 – 150	101 – 300	Normal
> 151	> 301	Élevé

Il est important de noter que la détermination d'une gamme de valeurs attendues dans une méthode donnée pour une population de «normal» est tributaire de nombreux facteurs, tels que la spécificité et la sensibilité de la méthode en usage, et la population étudiée. Par conséquent, chaque laboratoire devrait examiner la gamme spécifiée par le fabricant comme un guide général et de produire leur propre gamme de valeurs attendues sur la base des laboratoires où la population autochtone habite.

10. CONTROLE QUALITE

Chaque laboratoire devrait analyser les échantillons dans la gamme des niveaux élevés, normaux et base de CH50 pour vérifier les prestations de l'analyse. Ces échantillons devraient être traités comme inconnus et les valeurs déterminées devraient être dans chaque test effectué. Les tableaux de contrôle de la qualité devraient être observés afin de suivre les prestations des réactifs fournis. Des méthodes statistiques appropriées devraient être employées pour vérifier la tendance. Le laboratoire devrait définir des limites d'acceptabilité des prestations d'analyse. De plus, la capacité d'absorption maximale devrait être constante avec l'expérience précédente. La déviation significative par rapport aux prestations établies peut indiquer un changement non observé des états ou une dégradation expérimentale des réactifs du coffret. Des réactifs frais doivent être utilisés pour déterminer le motif des variations.

11. PERFORMANCE DU DOSAGE ET CARACTÉRISTIQUES

11.1. Corrélation

22 échantillons provenant de donneurs sains ont été testés avec le dosage CH50 NovaTec et un dosage analogue disponible en commerce. Les résultats ont été élaborés par analyse des courbes ROC sur deux niveaux (bas et normal), donnant le résultat suivant :

Sensibilité	100,0%
Spécificité	94,4%
Accord global	95,5%

12. LIMITES DE LA TECHNIQUE

Le résultat exprimé par le dosage NovaTec CH50 n'a pas valeur diagnostique en soi. Ce résultat doit être interprété en conjonction avec d'autres tests et le tableau clinique du patient doit être dûment évalué.

Le test NovaTec CH50 permet d'évaluer l'activité fonctionnelle du complément total. Ce test peut déterminer des taux anormaux de complément, mais sans identifier le ou les composants anormaux.

La méthode traditionnelle pour la détermination de l'activité fonctionnelle du complément est la méthode de l'hémolyse totale. Cette méthode NovaTec CH 50 exploite la capacité du complément à solubiliser les immunocomplexes et elle est en complète corrélation avec les autres méthodes commerciales.

Cette réaction permet de mesurer l'activation des composants du complément de la voie classique et de la voie terminale. L'activité totale du complément est habituellement anormale en cas de déficit de l'un ou l'autre des composants. L'évaluation de la CH 50 est utile pour le dépistage génétique des carences du système de complément et dans le suivi des progrès de la maladie chez des patients affectés de troubles des immunocomplexes.

13. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

- En accord avec l'article 1 paragraphe 2b de la directive européenne 98/79/EC, l'utilisation des dispositifs médicaux de diagnostic in vitro est destinée par le fabricant à garantir la pertinence, les performances et la sécurité du produit. Par conséquent, la procédure de dosage, l'information, les précautions et mises en garde du mode d'emploi doivent être suivies de façon stricte. L'utilisation de ces kits avec des automates ou dispositifs similaires doit être validée. Aucun changement de la conception, composition et procédure de dosage, ainsi que l'utilisation avec d'autres produits non approuvés par le fabricant, ne sont autorisés ; seul l'utilisateur est responsable de tels changements. Le fabricant n'est pas responsable des faux résultats et des incidents dus à ces modifications. Le fabricant n'est pas responsable des résultats fournis par analyse visuelle des échantillons des patients.
- Uniquement pour diagnostic in vitro.
- Suivre les Bonnes Pratiques de Laboratoires (BPL) pour la manipulation de produits sanguins.
- Tous les composants d'origine humaine utilisés pour la fabrication de ces réactifs ont été analysés et ont été testés non réactifs aux antigènes HBs, en anticorps anti-VIH et en anticorps anti-VHC. Néanmoins, tous les produits doivent être considérés et traités comme étant potentiellement infectieux.
- Ne pas échanger les réactifs ou les bandes provenant de différents lots de production.
- Ne pas utiliser de réactifs provenant d'autres fabricants avec les réactifs de ce kit.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
- Utiliser seulement des cônes de pipette, des distributeurs et du matériel de laboratoire propres.
- Ne pas échanger les bouchons des flacons, pour éviter la contamination croisée
- Fermer les flacons de réactifs immédiatement après l'utilisation pour éviter l'évaporation et la contamination microbienne.
- Avant une nouvelle utilisation, vérifier les flacons de conjugué et de contrôle, déjà utilisés, pour exclure une contamination microbienne.
- Pour éviter la contamination croisée et des résultats faussement élevés, introduire les échantillons de patients et le conjugué exactement au fond des puits en évitant les éclaboussures.
- Quand l'utilisation a automatisé l'équipement, l'utilisateur a la responsabilité de s'assurer que le kit a été convenablement évalué. Pour améliorer la performance du kit sur les systèmes automatiques ELISA, on recommande d'augmenter le nombre de se lave.
- Certains réactifs contiennent de petites quantités d'Azide de Sodium NaN_3 comme conservateur. Eviter tout contact avec peau et le muqueuses.
- L'Azide de Sodium peut être toxique s'il est ingéré ou absorbé à travers la peau ou les yeux ; de plus, il peut réagir avec les tubes de plomb ou de cuivre en formant des azotures métalliques potentiellement explosifs. Faire couler de grandes quantités d'eau si un évier est utilisé pour éliminer les réactifs et prévenir la formation d'azotures.
- Le chromogène ONPG contient un irritant qui peut être nocif s'il est inhalé, ingéré ou absorbé à travers la peau. Eviter toute inhalation, ingestion ou contact avec la peau et les yeux pour prévenir de ces risques.
- Éviter l'exposition du réactif ONPG à la lumière directe du soleil, aux métaux et aux substances oxydantes. Ne pas congeler la solution.
- L'Ethanediol est nocif en cas d'ingestion; en cas d'ingestion, consulter immédiatement un médecin.

- L'addition de la solution de substrat ONPG donne lieu à une réaction cinétique qui se termine par l'ajout de solution stop. Par conséquent, l'addition de solution de substrat et de solution stop doit être faite durant la manipulation pour éliminer tous risques de dépassement de la durée de réaction.
- Suivre la notice pour les contrôles qualité dans les laboratoires médicaux en dosant les contrôles et/ou les sérums.
- Les échantillons microbiologiquement contaminés ne doivent pas être utilisés pour le dosage. Les échantillons hautement lipémiques ou hémolysés ne doivent pas être utilisés non plus.
- Les lecteurs de microplaques mesurent verticalement. Ne pas toucher le fond des puits.
- La méthode ELISA de NovaTec est destinée à un personnel qualifié qui est familiarisé avec les Bonnes Pratiques de Laboratoire.

13.1. Elimination des déchets

Les résidus des produits chimiques et des préparations sont considérés en général comme des déchets dangereux. L'élimination de ce type de déchet est réglementée par des lois et réglementations nationales et régionales. Contacter les autorités compétentes ou les sociétés de gestion des déchets pour obtenir des renseignements sur l'élimination des déchets dangereux.

14. INFORMATION POUR LES COMMANDES

Prod. No.:

DNOV096

CH-50 (96 Dosages)