

# CY-QUANT™ ELISA sCD146

Dosage immuno-enzymatique du CD146 soluble  
(sCD146, S-Endo, MUC 18)

• *Trousse pour 96 déterminations contenant :*

- 3 x 2 barrettes de Réactif 1 (Barrette coatée)
- 3 flacons de Réactif 2 (Calibrant)
- 1 flacon de Réactif 3 (Solution de lavage)
- 1 flacon de Réactif 4 (Tampon de dilution)
- 1 flacon de Réactif 5 (Anti CD146-peroxydase)
- 1 flacon de Réactif 6 (TMB)
- 1 flacon de Réactif 7 (Plasma contrôle)
- 1 flacon de Réactif 8 (Solution stop)
- 1 support de barrettes

Ref. 7501



## Uniquement à Usage de Recherche.

### 1 METHODE

CY-QUANT™ ELISA sCD146 est une trousse de dosage immuno-enzymatique (ELISA) de la molécule CD146 soluble (sCD146, S-Endo, MUC 18) dans le plasma et le sérum.

### 2 VALEURS USUELLES

61 plasma citratés issus d'adultes normaux (hommes et femmes) ont été testés. Ces valeurs sont données uniquement à titre indicatif. Il est recommandé à chaque laboratoire d'établir ses propres valeurs normales à partir d'une population locale de donneurs normaux.

Moyenne sCD146 = 273 ± 70 ng/mL

### 3 NATURE DE L'ECHANTILLON

Sérum, plasma prélevé sur citrate ou EDTA.

### 4 PRINCIPE DU TEST

Un support plastique recouvert de fragments F(ab')<sub>2</sub> d'anticorps monoclonal anti CD146 humain (Réactif 1) fixe le sCD146 à doser. Le sCD146 est révélé à l'aide d'un second anticorps marqué à la peroxydase (Réactif 5) qui se fixe sur un déterminant antigénique différent et éloigné du premier. Le taux de peroxydase liée est mesuré par son activité sur le substrat TMB (Réactif 6). L'intensité du signal, après arrêt de la réaction (Réactif 8), est proportionnelle à la concentration de sCD146 présente initialement dans le milieu.

### 5 REACTIFS

- **Réactif 1 :** poche contenant 2 barrettes de 16 puits recouverts de fragments F(ab')<sub>2</sub> d'anticorps monoclonal de souris anti CD146 humain.
- **Réactif 2 :** flacon de 1 mL de sCD146 humain recombinant en concentration connue (160 ng/mL).
- **Réactif 3 :** flacon de 50 mL de solution de lavage, 20 fois concentrée.
- **Réactif 4 :** flacon de 50 mL de tampon de dilution.
- **Réactif 5 :** flacon de 1,2 mL d'anticorps monoclonal de souris anti CD146 humain couplé à la peroxydase, 20 fois concentré.
- **Réactif 6 :** flacon de 25 mL de TMB (tetra-méthyl-benzidine).
- **Réactif 7 :** flacon de plasma humain lyophilisé (plasma contrôle) en concentration connue (voir papillon inclus dans le coffret).
- **Réactif 8 :** flacon de 15 mL de solution stop.

### 6 REACTIFS ET MATERIEL AUXILIAIRES NECESSAIRES NON FOURNIS

- Eau distillée.
- Chronomètre.
- Pipettes multicanaux, pipettes à embout jetable (10 µL à 1000 µL).
- Tubes à hémolyse.
- Matériel de lavage.
- Lecteur de plaques à 450 nm.
- Agitateur de type vortex.

### 7 PRECAUTIONS

- Respecter les bonnes pratiques de laboratoire.
- Se conformer à la réglementation locale en vigueur pour l'élimination des déchets.
- Considérer le sang comme potentiellement infectieux.
- Réactif 4 – Tampon de dilution :
  - H317 :** Peut provoquer une allergie cutanée
  - P280 :** Porter des gants de protection / des vêtements de protection / un équipement de protection des yeux / du visage
  - P302 + P352 :** EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU: laver abondamment à l'eau et au savon
- Réactif 7 – Plasma contrôle:

Ces réactifs contiennent des produits d'origine humaine et/ou animale. Lorsque du plasma humain a été utilisé dans la préparation de ces réactifs, la recherche de l'antigène HBs, des anticorps anti-HCV, anti-HIV-1 et anti-HIV-2 a été effectuée et trouvée négative. Cependant aucun test ne peut garantir de façon absolue l'absence de tout agent infectieux. Aussi, ces réactifs d'origine biologique doivent être manipulés avec les précautions d'usage s'agissant de produits potentiellement infectieux.
- Réactif 8 – Solution stop :
  - H314 :** Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves
  - P280 :** Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage
  - P301 + P330 + P331 :** EN CAS D'INGESTION: rincer la bouche. NE PAS faire vomir
  - P303 + P361 + P353 :** EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU (ou les cheveux): enlever immédiatement les vêtements contaminés. Rincer la peau à l'eau/se doucher
  - P305 + P351 + P338 :** EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer
  - P310 :** Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin

### 8 RECONSTITUTION ET CONSERVATION DES REACTIFS

#### Remarques :

- Conservés à 2-8°C sous leur état d'origine, les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur le coffret.
- Tous les réactifs doivent être à température ambiante (18-25°C) avant utilisation.
- Utiliser de l'eau distillée de bonne qualité pour diluer et reconstituer les réactifs.

#### • Réactif 1

Avant ouverture de l'emballage, laisser le réactif 1 à température ambiante pendant 30 minutes ; les barrettes sont alors prêtes à l'emploi. Commencer le dosage sitôt les barrettes sorties de leur emballage.

#### • Réactifs 2, 4, et 8

Prêts à l'emploi.

#### • Réactif 3\*

Il doit être dilué au 1/20 en eau distillée.

Stabilité après dilution : 15 jours à 2-8°C en dehors de toute contamination.

\* **Note :** La présence de cristaux n'altère en rien la qualité du réactif 3. Incuber à 37°C jusqu'à totale dissolution des cristaux si nécessaire.

#### • Réactif 5

Il doit être dilué au 1/20 à l'aide du réactif 4.

Stabilité après dilution : 1 heure à température ambiante en dehors de toute contamination.

#### ● Réactif 6

Prêt à l'emploi.

**Note: Éviter l'exposition à la lumière et à la chaleur ainsi que la contamination avec des ions métalliques ou de la peroxydase.**

#### ● Réactif 7

Reconstituer le flacon par exactement 0,5 mL d'eau distillée.

Laisser la solution se stabiliser pendant 30 minutes à température ambiante. Puis homogénéiser avant emploi.

Stabilité après reconstitution : 4 heures à température ambiante. Alternativement, il peut être conservé 15 jours aliquoté à -80°C.

### 9 RECUEIL ET TRAITEMENT DE L'ECHANTILLON

#### Prélèvement :

##### ● Anticoagulant :

- Citrate de sodium 0,109M / 0,129M (1 volume de citrate pour 9 volumes de sang).

- EDTA (K3)

● Centrifugation : 10 minutes à 2 500 g.

● Conservation du plasma : 8 heures à température ambiante.

#### 10 MODE OPERATOIRE

Trousse contenant suffisamment de réactifs pour 96 déterminations, pouvant être utilisée en une, deux ou trois fois et permettant l'analyse d'un maximum 41 échantillons en doublet.

#### Préparation de la gamme d'étalonnage

Sur un portoir, disposer 6 tubes numérotés D1 à D6.

- Dans chacun des tubes D2 à D6, ajouter le volume de réactif 4 (diluant) comme indiqué dans le tableau ci dessous.

- Dans le tube D1, pipeter 1 mL de réactif 2 (calibrant).

- Dans le tube D2, pipeter 500 µl du tube D1. Homogénéiser le tube à l'aide d'un agitateur de type Vortex.

- Effectuer les dilutions suivantes comme indiqué dans le tableau.

Changer les embouts après chaque pipetage pour éviter toute contamination.

Dilutions	Volume R2	Volume R4	Concentration
D1	1000 µL	-	160 ng/mL
D2	500 µL de D1	500 µL	80 ng/mL
D3	500 µL de D2	500 µL	40 ng/mL
D4	500 µL de D3	500 µL	20 ng/mL
D5	500 µL de D4	500 µL	10 ng/mL
D6	-	500 µL	0 ng/mL

#### Préparation des échantillons à tester et du plasma contrôle

Les échantillons à tester, ainsi que le plasma contrôle reconstitué, sont à utiliser dilués au 1/10 en réactif 4. Cependant si un taux élevé de sCD146 est suspecté, l'échantillon peut être dilué au 1/20 en réactif 4 dilué.

#### Dosage

##### Remarques :

- A chaque lavage, remplir les puits avec 300 µL de réactif 3 dilué, puis les vider entièrement ; le nombre de lavages préconisés doit être scrupuleusement respecté.

- Ne jamais laisser les puits vides. Si nécessaire les remplir de réactif 3 dilué.

- Ne pas mettre les barrettes sous la lumière vive.

- La cinétique de la réaction étant rapide, la distribution de la gamme d'étalonnage, des échantillons à tester et du plasma contrôle doit se faire le plus rapidement possible. Le même temps d'incubation, pour les différentes étapes, doit être respecté pour chaque puits d'analyse.

- Les lavages peuvent être réalisés indifféremment à la main ou avec un laveur de plaque automatique.

Dès les barrettes sorties de leur emballage, distribuer en double :

- les dilutions étalons, les échantillons dilués à tester, le plasma contrôle reconstitué et dilué, dans les 4 heures suivant leur préparation.

le réactif 4 (blanc).

Déposer dans chaque puits		
FIXATION DE L'ANTIGENE	Echantillon dilué	<b>200 µL</b>
	Incuber <b>30 minutes</b> à température ambiante	
Laver <b>5 fois</b> avec <b>300 µL</b> de réactif 3 dilué puis ajouter immédiatement :		
FIXATION DE L'IMMUNO-CONJUGUE	Réactif 5 dilué	<b>200 µL</b>
	Couvrir les puits et incuber <b>30 minutes</b> à température ambiante	
Laver <b>5 fois</b> avec <b>300 µL</b> de réactif 3 dilué puis ajouter immédiatement :		
REVELATION	Réactif 6	<b>200 µL</b>
	Incuber <b>5 minutes</b> à température ambiante pour chaque échantillon et ajouter :	
	Réactif 8	<b>100 µL</b>
Incuber <b>5 minutes</b> à température ambiante		
LECTURE	Mesurer l'absorbance à 450 nm (ajuster le 0 sur le blanc réactif)	

#### 11 RESULTATS

Tracer la courbe d'étalonnage en échelle **bi-logarithmique** en portant en abscisse le taux de sCD146 des différents points de la gamme d'étalonnage, et en ordonnée la valeur de l'absorbance correspondante. En déduire le taux de sCD146 des échantillons testés et du plasma contrôle (valeur à multiplier par 10 pour tenir compte de la dilution initiale).

Vérifier que le résultat obtenu pour le réactif 7 (plasma contrôle) se situe bien dans la fourchette indiquée sur le papillon inclus dans la trousse.

Si ce résultat est en dehors de la fourchette, les résultats des échantillons doivent être considérés avec précaution. Vérifier que tous les composants du système fonctionnent correctement (conditions du test, réactifs, calibration, intégrité des échantillons testés, etc). Si nécessaire répéter le test.

**Remarque** : si des dilutions différentes de l'échantillon sont utilisées, un facteur correcteur devra intervenir : les taux mesurés devront être multipliés par 1/D (D étant le facteur de dilution).

#### 12 CARACTERISTIQUE DE LA METHODE

Grâce à l'utilisation de fragments F(ab')<sub>2</sub> pour la sensibilisation des barrettes, l'interférence du facteur rhumatoïde est éliminée.

#### 13 BIBLIOGRAPHIE

- 1- Kishimoto T. *et al.* Eds. 1996 : Leucocyte Typing VI, Garland Publishing Inc, White Cell Differentiation Antigens pp755-759.
- 2- Bardin N. *et al.* Thromb Haemost 2003, 90:915-20.
- 3- Bardin N. *et al.* Inflamm Bowel Dis. 2006 12(1):16-21.
- 4- Saito O. *et al.* Clin Exp Nephrol 2008, 12:58-64.
- 5- Dogansen S.C. *et al.* Cardiovasc Diabetol 2013, 12:153
- 6- Ilie M. *et al.* Br J Cancer. 2014;110(5):1236-43.

**BIOCYTEX**  
**140 CH. DE L'ARMEE D'AFRIQUE**  
**13010 MARSEILLE**  
**FRANCE**  
**TEL : +33 (0) 4 96 12 20 40**  
**FAX : +33 (0) 4 91 47 24 71**