

NOTICE D'UTILISATION DU SPHEROTEST

REF	PRODUCT
IB-Sph/HumG	Human IgG(H+L) Spherotest Kit
IB-Sph/HumGg	Human IgGgamma Spherotest Kit
IB-Sph/HumM	Human IgM Spherotest Kit
IB-Sph/RabG	Rabbit IgG(H+L) Spherotest Kit
IB-Sph/MouG	Mouse IgG(H+L) Spherotest Kit

1- COMPOSANTS DU KIT

Les quantités de réactifs disponibles dans les kits sont prévues pour 96 points de dosages.

➤ **ATTENTION, LES KITS NE PREVOIENT PAS DE STANDARD D'ETALONNAGE. IL EST RECOMMANDE D'UTILISER VOTRE PROPRE STANDARD EN FONCTION DE L'UTILISATION FINALE DU KIT. LE CAS ECHEANT, NOUS POURRONS VOUS INDIQUER LES REFERENCES DE STANDARDS QUI ONT ETE UTILISES POUR LA MISE AU POINT DU TEST, SUR DEMANDE (aleguellec@indicia.fr).**

Le kit est composé de la manière suivante :

➤ **REACTIFS BILLES**

1 tube contenant 2.2 ml de microparticules activées par un anticorps et stabilisées dans un tampon à pH 7.4 contenant une protéine d'origine animale et

stabilisatrice et un agent bactériostatique (azide de sodium à 0.09%).

➤ **TAMPON DE DILUTION : DILUTION BUFFER**
1 tube contenant 58 ml de solution prête à l'emploi (contient de l'azide de sodium 0.09%).

➤ **TAMPON DE BLOCAGE: BLOCKING BUFFER**
1 tube contenant 15 ml de solution, prête à l'emploi (contient de l'azide de sodium 0.09 %)

Stockage: Les kits Sphérotest sont expédiés à température ambiante (sauf pour Human IgM Sphérotest kit transporté à température contrôlée). Après réception, conserver tous les composants du kit entre +2°C et +8°C.

Important: Ne pas congeler les réactifs du kit.

2- PRINCIPE DU TEST

Le Sphérotest est une méthode de dosage immunologique rapide, simple et spécifique. Elle repose sur la technique de micro-agglutination en microplaque 96 puits.

L'utilisation du Sphérotest est destinée à la détection d'immunoglobulines (Ig) de souris, de lapin ou humains (en fonction des références de kits utilisés). Le réactif est composé de

microparticules de polystyrène monodisperses activées par des anticorps spécifiques.

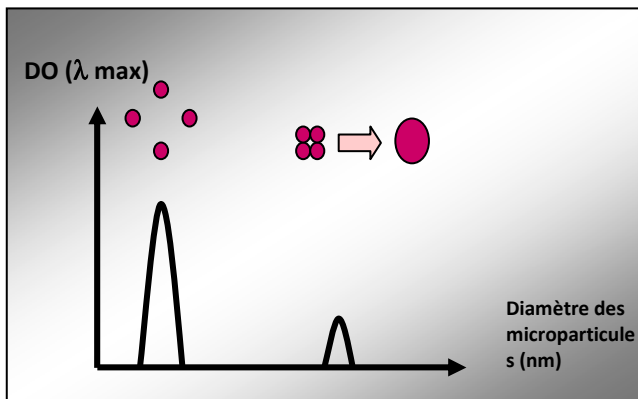
Chaque référence de Sphérotest est spécifique d'une espèce et /ou classe d'immunoglobulines. Le Sphérotest peut être utilisé sur différents types d'échantillons (plasmas, sérums, ascites ou surnageants de culture) et ce sans risque de réactions croisées avec d'autres protéines présentes dans l'échantillon.

Principe technique: Phénomène optique

Les microsphères monodisperses présentent un maximum d'absorbance à un λ_{max} défini qui est fonction des indices de réfraction des microparticules et de la solution, ainsi que du diamètre des microparticules.

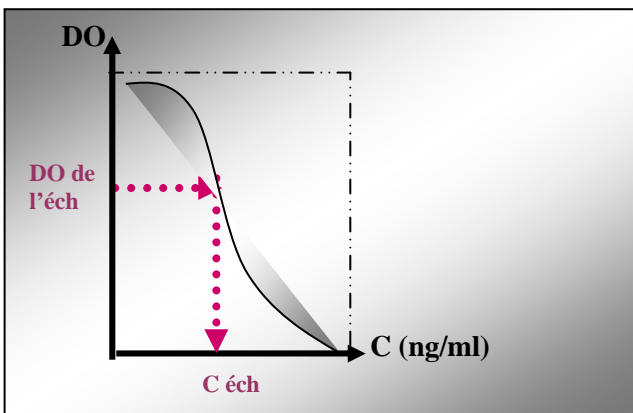
En présence de leur antigène (immunoglobulines), les microparticules activées agglutinent pour former des amas de particules qui sont assimilées à des microparticules de plus gros diamètres et qui n'absorbent pas au même λ_{max} .

Ainsi, au λ_{max} des microparticules monodisperses, il est possible de suivre ce phénomène d'agglutination. Au contact des immunoglobulines cible, les microparticules agglutinent et causent une diminution de l'absorbance à 340 nm (ou 405 nm).

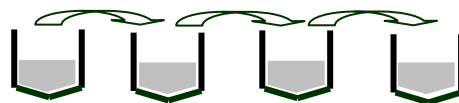


Un échantillon ayant une concentration faible en immunoglobulines aura donc une valeur d'absorbance élevée et un échantillon ayant une concentration forte en immunoglobulines aura une faible valeur d'absorbance.

La courbe de calibration (décroissance de l'absorbance en fonction de la concentration en Ig) permet de suivre la réponse d'absorbance de l'échantillon et de déterminer la concentration en Ig de manière fiable et reproductible.



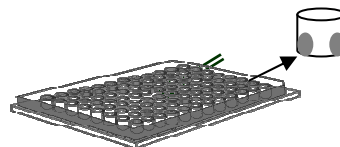
3- UNE METHODE FACILE D'UTILISATION



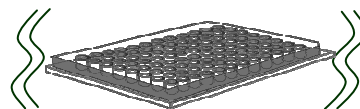
1- Préparer la gamme étalon et diluer les échantillons



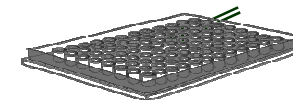
2- Resuspendre vigoureusement les microparticules activées



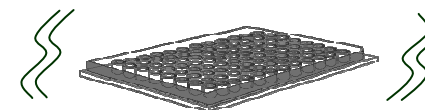
3- Déposer 20 μ l de microparticules actives d'un côté du puits et 20 μ l d'échantillon/ point de gamme ou tampon pour le contrôle du côté opposé.



4- Incuber 5 min à température ambiante sous agitation vigoureuse permettant le mélange des gouttes.



5- Dans chaque puits, ajouter 100 μ l de tampon de blocage



6- Incuber 5 min à température ambiante sous agitation vigoureuse sans qu'il n'y ait de débordement. Lire la plaque à 340 nm préférentiellement (ou 405 nm).

4- INFORMATIONS IMPORTANTES AVANT UTILISATION

- **PRODUIT DESTINE A LA RECHERCHE UNIQUEMENT.**
- **TOUS LE SREACTIFS SE CONSERVENT A 2-8°C ET DEVRONT ETRE EQUILIBRES A TEMPERATURE AMBIANTE AVANT UTILISATION.**
- **UTILISER SEULEMENT LES REACTIFS FOURNIS DANS LE KIT. NE PAS LES DILUER.**

- LES VOLUMES PIPETES ET LES TEMPS D'INCUBATION DOIVENT ETRE RESPECTES STRICTEMENT.
- **MICROPARTICULES ACTIVEES : IL EST TRES IMPORTANT D'AGITER VIGOREUSEMENT LES PARTICUELS AVANT DE PIPETER PENDANT 60 SECONDES. CECI AFIN DE S'ASSUER QUE LES PARTICULES RESTENT HOMOGENES ET MONODISPERSES AU PIPETAGE.**
- **SI LE NIVEAU DE CONCENTRATION EN IMMUNOGLOBULINES DANS L'ECHANTILLON EST INCONNUE, IL EST RECOMMANDE DE REALISER PLUSIEURS DILUTIONS EN SERIE.**
- **L'INTERVALLE DE LA GAMME ETALON DU SPHEROTEST S'ETEND DE 7.8 A 1000 NG/ML. LA ZONE DYNAMIQUE DE MESURE S'ETEND DE 30 A 500 NG/ML (SAUF POUR HUMAN IGM SPHEROTEST KIT DE 62.5 A 500 NG/ML).**
- **LORS DE LA DILUTION DES ECHANTILLONS OU STANDARD, IL EST RECOMMANDE D'UTILISER LE DILUTION BUFFER OPTIMISE POUR LE TEST.**
- **GARDER UN PUIVS VIDE DANS LA MICROPLAQUE (EX H12) POUR EFFECTUER UN CONTROLE BLANC.**

- **IL EST RECOMMANDE DE PREPARER UNE NOUVELLE GAMME ETALON POUR CHAQUE ESSAI (UNE PAR PLAQUE) ET DE DEPOSER LA GAMME EN DOUBLE POUR UNE MEILLEURE REPRODUCTIBILITE DES RESULTATS.**
- **PRENDRE TOUTES LES PRECAUTIONS NECESSAIRES POUR LA MANIPULATION D'ECHANTILLONS POTENTIELLEMENT INFECTES.**
- **HUMAN SPHEROTEST KITS (IGG ET IGG GAMMA :**
DANS LE KIT IGG(H+L) : LES MICROPATICULES SONT ACTIVEES PAR UN ANTICORPS ANTI-HUMAN IGG(H+L) SPECIFIQUE DES DEUX TYPES DE CHAINES LOURDE ET LEGERE (CHAINES KAPPA ET LAMBDA)
DANS LE KIT IGGGAMMA : LES MICROPATICULES SONT ACTIVEES PAR UN ANTICORPS ANTI-HUMAN IGG GAMMA QUI RECONNAIT SPECIFIQUEMENT LA CHAINE GAMMA DE L'IMMUNOGLOBULINE. LE KIT PERMETTRA DONC UNE QUANTIFICATION SPECIFIQUE DE LA POPULATION IGG EN PRESENCE D'AUTRES ISOTYPES.
SELON L'APPLICATION FINALE, IL SERA PREFERABLE D'UTILISER L'UNE OU L'AUTRE DES REFERENCES EN FONCTION DU DEGRE DE SPECIFICITE DESIRE POUR LE DOSAGE.

5- MATERIELS NECESSAIRES MAIS NON FOURNIS

- Standard de référence nécessaire pour la gamme étalon : Il est recommandé d'utiliser votre propre standard (fraction d'immunoglobulines purifiées). Vous pouvez également acheter un standard commercial.
- Microplaque 96 puits : plaque standard transparente, en polystyrène, avec des puits à fond plat. (nous conseillons l'utilisation de microplaques Greiner).
- Pipettes 10-1000 µl.
- Agitateur de microplaques : s'assurer que la vitesse d'agitation permettent d'agiter jusqu'à 1000 mouvements/min. Si l'utilisation du Sphérotest est répétée, il est conseillé de calibrer les vitesses d'agitation 1 et 2 en fonction de votre équipement afin de garantir une fiabilité et une reproductibilité des résultats. Ne pas hésiter à agiter suffisamment pour que les deux gouttes à la 1ere étape se mélangent.
- Lecteur de microplaque permettant une mesure à 340 nm préférentiellement (ou 405 nm).

6- PROCEDURE

- Préparation de la gamme étalon

- Lorsque la dilution de l'échantillon est faible (ex pour les surnageants de culture), il est recommandé de préparer la gamme dans la même matrice que l'échantillon à doser (ex milieu de culture).
- Réaliser une dilution (P1) du standard à 10 µg/ml en utilisant le Dilution Buffer (DB).
- Puis effectuer des dilutions en série en utilisant le Dilution Buffer (DB) comme indiqué dans le tableau 1.

Tableau 1: Préparation de la gamme étalon

tube	DB Vol (µl)	STD Vol (µl)	Concentration finale (ng/ml)
PA	900	100 µl of P1	1000
PB	500	500 µl of PA	500
PC	500	500 µl of PB	250
PD	500	500 µl of PC	125
PE	500	500 µl of PD	62.5
PF	500	500 µl of PE	31.3
PG	500	500 µl of PF	15.6
PH	500	500 µl of PG	7.8

➤ **Préparation des échantillons**

- Tester différentes dilutions de l'échantillon de telle sorte que la concentration qui soit comprise dans l'intervalle de gamme 7.8-1000 ng/ml. Le facteur de dilution dépend du niveau de concentrations donc du type dans l'échantillon (Tableau 2). Pour se situer

dans la zone dynamique de dosage, réaliser des dilutions en série de 1/200 à 1/1000.

- Utiliser le Dilution Buffer pour effectuer ces dilutions.

ATTENTION NE PAS UTILISER DE PBS INCOMPATIBLE AVEC LA METHODE.

Tableau 2: Niveaux de concentrations en Immunoglobulines par type d'échantillons

Serum/Plasma: 5-20 mg/ml

Ascites: 0.5-5 mg/ml

Cell culture supernatant: 0.01-0.05 mg/ml

➤ **Préparation des microparticules activées**

- Resuspendre vigoureusement les microparticules actives pendant 60 secondes juste avant dépôt. Le culot doit être entièrement repris, les réactifs "billes" doivent avoir un aspect opaque et bien homogène.

➤ **PROTOCOLE**

○ **CONDITIONS OPÉRATOIRES:**

- Le Sphérotest peut être réalisé à température ambiante (20-25°C). Pour des températures avoisinant 30-35°C, l'agglutination est favorisée, donc les valeurs d'absorbance sont plus faibles. Pour éviter tout risque de problème de

reproductibilité veillez à réaliser le Sphérotest dans des conditions toujours similaires.

- Autant que possible, respecter scrupuleusement les temps d'incubation pour s'assurer de la fiabilité et reproductibilité des résultats. Toutefois, une incubation entre 4 et 6 min n'invalident pas les résultats.

- A chaque nouvel essai, déposer une gamme étalon fraîchement préparée comme décrit plus haut.

○ **ETAPE 1: CONTACT ENTRE LES MICROPARTICULES ACTIVEES ET LES IMMUNOGLOBULINES**

- Resuspendre vigoureusement pendant 60s les microparticules activées et déposer immédiatement à la pipette 20µl. Déposer la goutte sur un côté du puits suivant le plan de microplaque. (dépôt dans chaque puits gamme/échantillon/contrôle).

ATTENTION NE PAS LAISSER LES MICROPARTICULES SEDIMENTER. SI LE TUBE DE MICROPARTICULES N'EST PAS UTILISE IMMEDIATEMENT, VORTEXER A NOUVEAU AVANT DEPOT.

- Gamme étalon: Pipeter 20µl de chaque point de gamme, ou échantillon

dilué et déposer la goutte du côté opposé à la goutte de microparticules activées. La gamme est déposée de PA à PH en double préférentiellement.

- Contrôle "Billes": Pipeter 20 µl de Dilution Buffer (ou matrice échantillon négative si la gamme est préparée dans une matrice négative) et déposer la goutte du côté opposé à la goutte de microparticules activées. Ce témoin permet de contrôler la dilution des billes. La DO obtenue doit être comprise entre 1.1 et 1.6.

- Laisser incubé 5 min à température ambiante sous agitation vigoureuse (≥1000 mouvements/min).

ATTENTION LES DEUX GOUTTES DOIVENT SE MELANGER AVEC L'AGITATION. CETTE ETAPE EST CRUCIALE POUR S'ASSURER DE LA VALIDITE DES RESULTATS.

○ **ETAPE 2: BLOCAGE**

- Ajouter 100 µl de Blocking Buffer dans chaque puits (points de gamme – échantillon – témoin billes).

- Laisser incubé 5 min à température ambiante, sous agitation vigoureuse.

ATTENTION LA VITESSE D'AGITATION DEVRA ETRE SUFFISANTE TOUT EN EVITANT TOUT RISQUE DE DEBORDEMENT.

○ **ETAPE 3: LECTURE ET RESULTATS**

- Mesurer l'absorbance à 340 nm préférentiellement.

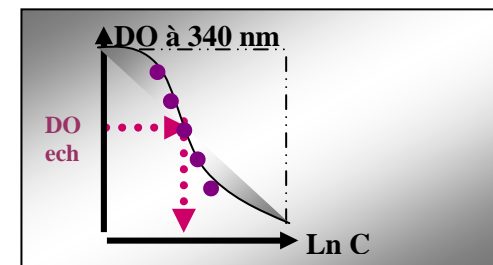
- Tracer la courbe étalon et déterminer la concentration en immunoglobulines de l'échantillon.

7- INTERPRETATION DES RESULTATS

- Le lecteur de microplaque donne un résultat d'absorbance par puits. La valeur d'absorbance décroît en présence d'immunoglobulines. Les échantillons les plus concentrés auront donc les valeurs d'absorbance les plus faibles.
- Pour tracer la courbe étalon, déduire la valeur du blanc (absorbance du puits vide H12) à l'ensemble des valeurs brutes (points de gamme/ échantillons/ contrôle).

$$DO = DO \text{ brute} - DO \text{ blanc}$$

- Le témoin "billes" est garant de la validité de l'essai: sa moyenne d'absorbance corrigée du blanc devra être comprise entre 1.1 et 1.6.
- La courbe étalon (sigmoïde inversée) est construite à partir des valeurs moyenne d'absorbance et de concentrations: $DO=f(\ln C) \rightarrow$ représentation en linéaire



- Sur la courbe étalon reporter la valeur d'absorbance des échantillons pour déterminer la concentration. Faire la moyenne des réplicats le cas échéant.
- Une droite de régression linéaire peut être tracée dans l'intervalle dynamique de dosage pour calculer la concentration à partir de l'équation de droite.
- Déterminer la concentration finale en immunoglobulines en multipliant par le facteur de dilution.

$$C = \text{Conc lue} \times D$$

NOTE : TOUS LES CALCULS PEUVENT ETRE REALISES A PARTIR D'UN LOGICIEL STANDARD DE TRAITEMENT DE DONNEES UTILISES EN IMMUNOASSAYS (VOIR AVEC VOTRE FOURNISSEUR DE LECTEUR DE MICROPLAQUES).

8- SPECIFICATIONS PRODUITS

DELAI DE REALISATION D'UN SPHEROTEST: 10 MIN
ETENDUE DE LA GAMME : 7.8-1000 NG/ML
PRECISION DES RESULTATS D'ABSORBANCE DE LA
GAMME : < 15% SUR TOUTE LA GAMME
INTRA-RUN
INTER-RUN
INTERMANIPULATEURS