

Notice d'utilisation

eZYDIAG® ELISA ANTHRAX

Dosage quantitatif du facteur létal de l'anthrax



Laboratoire Aguettant
1 rue Alexander Fleming
69007 Lyon
FRANCE
+33 4 78 61 51 41

AGUETTANT

NOTICE D'UTILISATION

eZYDIAG® ELISA Anthrax



AVERTISSEMENT

Destiné à la recherche uniquement.

Le produit n'est pas validé pour un usage à des fins de diagnostic.

Pour utilisation professionnelle en laboratoire uniquement.

NOTICE D'UTILISATION

eZYDIAG® ELISA Anthrax

1 Destination

Le KIT ELISA ANTHRAX eZYDIAG® permet de mesurer la toxine dite facteur létal (LF) sécrétée par *Bacillus Anthracis*.

C'est un essai quantitatif qui n'est pas automatisé.

Le kit dose la toxine LF entre 6.25 et 200pg/mL par puit dans la plaque, soit 12.5 à 400pg/mL dans un échantillon (dilution au ½).

Les échantillons testés sont les plasmas issus des prélèvements de sang potentiellement infectés par *Bacillus Anthracis* sur :

- **Anti-coagulant EDTA et citrate,**
- **Sérum prélevé sur tube sec.**

Le kit ELISA Anthrax eZYDIAG® est destiné à être utilisé par des professionnels de laboratoire, formés, dans les établissements de santé de référence, et laboratoire des centres hospitaliers désignés.

2 Contenu du kit

Le kit contient les composants listés ci-dessous :

Nom	Description	Quantité
CONTROLE POSITIF	Solution mère de contrôle positif : 800 pg/mL de toxine LF. A utiliser pour réaliser la gamme étalon.	1 x 1.1 mL
CONJUGUÉ 100X	Solution de streptavidine couplée à la peroxydase de raifort (HRP). Solution 100 fois concentrée (100X) A diluer avant utilisation.	1 x 200 µL
TRACEUR 100X	Solution contenant un anticorps spécifique de la toxine LF marqué à la biotine. A diluer avant utilisation.	1 x 200 µL
DILUANT DES ÉCHANTILLONS	Tampon pour la dilution des échantillons. Prêt à l'emploi.	1 x 8 mL
DILUANT DU TRACEUR ET DU CONJUGUÉ	Tampon pour la dilution du traceur et du conjugué. Prêt à l'emploi.	1 x 28 mL
FILMS ADHÉSIFS	Films adhésifs utilisés pour couvrir les trous pendant les étapes d'incubation	9
SOLUTION D'ARRÊT	Solution arrêtant la réaction enzymatique. Prête à l'emploi.	1 x 12 mL
SOLUTION DE LAVAGE 20X	Tampon pour le lavage des trous. A diluer avant utilisation.	1 x 200 mL
SUBSTRAT	TMB, substrat de l'enzyme du CONJUGUÉ. Prêt à l'emploi.	1 x 13 mL
CONTROL -	Contrôle négatif 0 pg/mL de toxine LF. A diluer avant utilisation selon protocole de préparation échantillon.	1 x 4.8 mL
PLAQUE ANTHRAX eZYDIAG®	Microplaques : 12 barrettes de 8 trous (96 trous) coatées avec un anticorps monoclonal spécifique du facteur létal de l'anthrax.	1

NOTICE D'UTILISATION

eZYDIAG® ELISA Anthrax

ATTENTION

Ne pas utiliser les composants provenant d'un autre lot de kit.
Les composants fournis dans le kit doivent être utilisés uniquement dans le cadre de ce test.

Traçabilité métrologique :

La solution CONTROLE POSITIF est préparée à partir d'une toxine LF recombinante. Les valeurs attribuées sont contrôlées selon une hiérarchie d'étalonnage définie en interne.

3 Matériels requis mais non fournis

- Pipettes et micropipettes adaptées aux volumes à prélever.
- Tubes en polypropylène pour réaliser les différentes dilutions (de préférence low-adsorption).
- Laveur de plaque automatique (optionnel)
- Agitateur de plaque
- Spectrophotomètre (lecteur de plaque 96 puits) avec lecture à 450 nm et 630 nm.
- Eau purifiée

ATTENTION

Les équipements doivent être en bon état de fonctionnement et contrôlés régulièrement conformément aux bonnes pratiques de laboratoire. Les instruments de mesure doivent en particulier faire l'objet de contrôles métrologiques.

4 Principe de l'essai

Le kit ELISA Anthrax eZYDIAG® est un immunodosage enzymatique (ELISA), utilisant deux anticorps monoclonaux spécifiques de l'Anthrax (dosage « sandwich »)

Étape 1 : Un premier anticorps monoclonal spécifique à la toxine LF sécrétée par *Bacillus Anthracis* se trouve à la surface du fond des puits de la plaque (anticorps de capture). L'échantillon à tester est distribué dans le puits. Si présent dans l'échantillon, la toxine LF se lie à l'anticorps. Après un temps d'incubation, un lavage des puits est effectué pour éliminer les substances non liées.

Étape 2 : un second anticorps monoclonal spécifique à un autre épitope de la toxine LF sécrétée par *Bacillus Anthracis* marqué à la biotine (anticorps de détection) est ajouté et se lie à la toxine LF capturée précédemment. Après un temps d'incubation, un lavage des puits est effectué pour éliminer les substances non liées.

Étape 3 : Le conjugué de streptavidine-peroxydase est ajouté et se lie à la biotine présente sur l'anticorps de détection. Après un temps d'incubation, un lavage des puits est effectué pour éliminer les substances non liées.

Étape 4 : Le substrat de l'enzyme (TMB) est ajouté. Si l'enzyme (peroxydase) est présente, il est modifié en un produit émettant un signal mesurable par spectrophotométrie (densité optique) qui est proportionnel à la concentration de toxine LF.

NOTICE D'UTILISATION

eZYDIAG® ELISA Anthrax

Étape 5 : L'ajout de la solution d'acide sulfurique permet d'arrêter la réaction enzymatique.

Étape 6 : Les densités optiques à 450 nm et 630 nm sont lues sur un spectrophotomètre. La lecture à 630 nm permet de mesurer un bruit de fond qui sera soustrait au signal à 450 nm, correspondant au produit de la réaction enzymatique.

Étape 7 : Une courbe d'étalonnage est établie en utilisant la solution mère de CONTROLE POSITIF fournie dans le kit puis tracée en utilisant le fichier tableur. Cette gamme permet de quantifier la concentration de toxine LF dans un échantillon.

5 Conditions de stockage

Le kit doit être conservé dans son emballage d'origine à **5°C ± 3°C** jusqu'à sa date d'expiration.

Date d'expiration : voir l'étiquette du kit.

Ne pas utiliser les kits au-delà de la date de péremption indiquée sur l'étiquette du kit.

Ne pas réutiliser après ouverture.

ATTENTION

En cas de signe de contamination ou de modification de l'apparence d'un composant, ne pas utiliser le kit.

Ne pas utiliser le kit après sa date d'expiration.

Ce kit est à usage unique, ne pas réutiliser.

6 Avertissements et précautions

- Lire attentivement la notice d'utilisation.
- Ce test doit être réalisé par un professionnel de laboratoire dans le respect des bonnes pratiques de laboratoire.
- La manipulation du test en lui-même ne présente pas de risque spécifique, en revanche, tous les échantillons doivent être traités comme infectieux et manipulés selon les précautions appropriées définies au sein du laboratoire.
- Porter les équipements de protection individuels appropriés définis au sein du laboratoire.
- Le matériel non fourni dans le kit doit respecter les caractéristiques décrites en section 3.
- Respecter les conditions de stockage décrites en section 5.
- Ne pas utiliser le kit s'il est endommagé.
- Ne pas utiliser le kit s'il existe des signes de contamination ou de modification
- Ne pas utiliser de réactifs au-delà de la date de péremption.
- Ne pas mélanger ou associer, pendant la même manipulation, des réactifs provenant de kits de lots différents.
- Préparer les échantillons extemporanément.
- La réalisation du test dans une pièce de température supérieure à 25°C peut entraîner une détérioration des performances du kit.

NOTICE D'UTILISATION

eZYDIAG® ELISA Anthrax

- Ne pas vortexer les flacons « Traceur » et « Conjugué » ainsi que leur dilution (mélanger par aspiration/refoulement ou retournement).
- Diluer soigneusement les réactifs, en évitant toute contamination.
- Ne pas utiliser de verrerie pour la préparation des réactifs, favoriser les contenants à usage unique.
- Il n'est pas recommandé de pipeter des volumes trop petits (<10µL) - Ne jamais utiliser le même contenant et le même embout de pipette pour ajouter le conjugué et le substrat.
- Respecter rigoureusement le protocole décrit en section 8 pour assurer la performance du test.
- Eliminer les composants du kit selon la procédure décrite en section 11.

7 Collecter et préparer les échantillons

Les échantillons sont collectés et préparés selon les procédures standard des laboratoires d'analyses. Inspecter visuellement les échantillons avant analyse pour identifier toute caractéristique anormale qui pourrait fausser le résultat.

ATTENTION : Tous les échantillons doivent être traités comme infectieux et manipulés selon les précautions appropriées définies au sein du laboratoire.

8 Protocole détaillé

8.1 Préparation des réactifs

8.1.1 Plaque ELISA ANTHRAX

Avant ouverture du sachet, laisser la PLAQUE ELISA ANTHRAX revenir à température ambiante dans son emballage protecteur, afin d'éviter toute condensation dans les puits. Juste avant le dépôt des échantillons, ouvrir le sachet au point de soudure.

8.1.2 Réactifs liquides

Les réactifs suivants doivent être ramenés à température ambiante, avant leur utilisation.

- DILUANT DU TRACEUR ET DU CONJUGUÉ
- DILUANT DES ÉCHANTILLONS
- SUBSTRAT
- SOLUTION D'ARRÊT
- SOLUTION DE LAVAGE (diluée)

Laisser les flacons CONTROLE POSITIF, TRACEUR 100X et CONJUGUÉ 100X entre +2 et +8°C.

Les réactifs ci-dessous doivent être dilués avant utilisation.

Réactif	Quand ?	Comment ?	Attention !
SOLUTION DE LAVAGE 20X	Avant le début du test	Dilution 1/20 dans de l'eau purifiée (non fournie)	Matériel à usage unique à privilégier

NOTICE D'UTILISATION

eZYDIAG® ELISA Anthrax

TRACEUR 100X	Moins de 10 minutes avant la fin de l'incubation des échantillons.	Dilution 1/100 dans le DILUANT DU TRACEUR ET DU CONJUGUÉ. Mélanger doucement par aspiration-refoulement avec la pipette ou par inversion.	Ne pas vortexer. Eviter de pipetter de très petits volumes (< 10 µL)
CONJUGUÉ 100X	Moins de 10 minutes avant la fin de l'incubation du traceur.		

8.2 Préparation des échantillons

Diluer les échantillons au 1/2 avec le DILUANT DES ÉCHANTILLONS.

Identification du point	Dilution à réaliser	Réactif 1	Volume de Réactif 1 (µl)	Réactif 2	Volume de Réactif 2 (µl)
Echantillon x	1/2	Echantillon x	125	DILUANT DES ECHANTILLONS	125

8.3 Préparation de la gamme de calibration

Identification du point	Dilution à réaliser	Réactif 1	Volume de Réactif 1 (µl)	Réactif 2	Volume de Réactif 2 (µl)
Standard 0	1/2	CONTROL -	1300	DILUANT DES ECHANTILLONS	1300
Standard 200 pg/ml	1/4	CONTROLE POSITIF	120	Standard 0	360
Standard 100 pg/ml	1/2	Standard 200 pg/ml	240	Standard 0	240
Standard 50 pg/ml	1/2	Standard 100 pg/ml	240	Standard 0	240
Standard 25 pg/ml	1/2	Standard 50 pg/ml	240	Standard 0	240
Standard 12.5 pg/ml	1/2	Standard 25 pg/ml	240	Standard 0	240
Standard 6.25 pg/ml	1/2	Standard 12.5 pg/ml	240	Standard 0	240

8.4 Plan de plaque

Les points de la gamme de calibration et les échantillons doivent être testés en duplicat.

NOTICE D'UTILISATION

eZYDIAG® ELISA Anthrax

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	STD 200	STD 200	S1	S1	S9	S9	S17	S17	S25	S25	S33	S33
B	STD 100	STD 100	S2	S2	S10	S10	S18	S18	S26	S26	S34	S34
C	STD 50	STD 50	S3	S3	S11	S11	S19	S19	S27	S27	S35	S35
D	STD 25	STD 25	S4	S4	S12	S12	S20	S20	S28	S28	S36	S36
E	STD 12.5	STD 12.5	S5	S5	S13	S13	S21	S21	S29	S29	S37	S37
F	STD 6.25	STD 6.25	S6	S6	S14	S14	S22	S22	S30	S30	S38	S38
G	STD 0	STD 0	S7	S7	S15	S15	S23	S23	S31	S31	S39	S39
H	STD 0	STD 0	S8	S8	S16	S16	S24	S24	S32	S32	S40	S40

SX : Sample n°X ; le plan de plaque est repris dans le fichier de calcul.

8.5 Protocoles de lavage

Le lavage de la plaque peut être effectué manuellement ou avec un laveur de plaque.

Manuellement : élimination de la solution de lavage par retournement puis tapotage sur un papier absorbant.

Avec *laveur de plaque*, 2 programmes sont nécessaires :

- **PROGAMME DE LAVAGE 1** : aspiration, 3 dépôts successifs de 300 µL de **SOLUTION DE LAVAGE** (préalablement diluée) par puits avec aspiration finale.
- **PROGAMME DE LAVAGE 2** : aspiration, 3 dépôts successifs de 300 µL de **SOLUTION DE LAVAGE** (préalablement diluée) par puits sans aspiration finale.

8.6 Protocole détaillé

- 1) Sortir la **PLAQUE ELISA ANTHRAX** de son sachet.
- 2) Laver les puits avec 3 distributions / éliminations successives de 300 µL de **SOLUTION DE LAVAGE DILUÉE** (voir §8.1.2) par puits (manuellement ou programme n°1, voir §8.5).
- 3) Déposer immédiatement **100 µL** de **chaque standard (STD 200 à STD 0)** (voir préparation §8.3) et **d'échantillons dilués** (voir préparation §8.2) selon le plan de plaque défini (voir préparation §8.4). Le dépôt doit être réalisé en 30 minutes maximum.
- 4) Recouvrir la plaque avec un film adhésif.
- 5) Placer la plaque **sous agitation** (1000 rpm) pendant **30 minutes à température ambiante 20°C (+/-3°C)**.
- 6) Laver les puits avec 3 distributions / éliminations successives de 300 µL de **SOLUTION DE LAVAGE DILUÉE** (voir §8.1.2) par puits (manuellement ou programme n°1, voir §8.5).
- 7) Déposer **100 µL** de **TRACEUR** (préalablement dilué) dans chaque puits.
- 8) Recouvrir la plaque avec un film adhesif.
- 9) Placer la plaque sous **agitation** (1000 rpm) pendant **30 minutes à température ambiante**.

NOTICE D'UTILISATION

eZYDIAG® ELISA Anthrax

- 10) Laver les puits avec 3 distributions / éliminations successives de 300 µL de SOLUTION DE LAVAGE DILUÉE (voir §8.1.2) par puits (manuellement ou programme n°1, voir §8.5).
- 11) Déposer **100 µL** de CONJUGUÉ (préalablement dilué) dans chaque puits.
- 12) Recouvrir la plaque avec un film adhésif.
- 13) Placer la plaque **sous agitation** (1000 rpm) pendant **20 minutes** à **température ambiante**.
- 14) Laver les puits avec 3 distributions / éliminations successives de 300 µL de SOLUTION DE LAVAGE DILUÉE (voir §8.1.2) par puits, **sans élimination finale** (manuellement ou programme n°2, voir §8.5).
- 15) Recouvrir d'un adhésif.
- 16) Placer la plaque **sous agitation** (1000 rpm) pendant **5 minutes** à **température ambiante**, puis éliminer la solution de lavage.
- 17) Laver les puits avec 3 distributions / éliminations successives de 300 µL de SOLUTION DE LAVAGE DILUÉE (voir §8.1.2) par puits (manuellement ou programme n°1, voir §8.5).
- 18) Dans chaque puits, déposer **100 µL** de SUBSTRAT.
- 19) Recouvrir d'un adhésif.
- 20) Placer la plaque **à l'abri de la lumière** pendant **15 minutes** à **température ambiante sans agitation**.
- 21) Dans chaque puit, déposer **100 µL** de SOLUTION D'ARRÊT.
- 22) Mesurer immédiatement l'absorbance à **450 et 630 nm**. Si vous en avez la possibilité, programmer votre lecteur pour obtenir directement les valeurs correspondant à la soustraction des absorbances mesurées à 630 de celles mesurées à 450 nm (450 nm – 630 nm). Dans le cas contraire, il faudra faire cette soustraction, sur un tableur ou manuellement, à partir des données brutes du lecteur.

9 Calculs des résultats

L'interprétation des résultats du protocole qualitatif est facilitée par l'utilisation d'un fichier Excel conçu à cet effet.

Ce fichier est mis à disposition par le LABORATOIRE AGUETTANT à l'interlocuteur client privilégié lors de toute commande de kit. Le fichier est disponible sur le site : www.aguettant.fr/kit-anthrax

Le fichier comporte 3 feuilles, « Informations générales », « Plan de plaque - Saisie lectures » et « Résultats ».

9.1 Feuille « Informations générales »

Cette feuille permet de saisir librement les informations souhaitées.

NOTICE D'UTILISATION

eZYDIAG® ELISA Anthrax

9.2 Feuille « Plan de Plaque- Saisie lectures »

Cette feuille permet de renseigner le nom du laboratoire, la date, l'identité de l'opérateur, la référence du kit utilisé. Elle renseigne sur le plan de plaque à respecter (tableau « Plan de plaque »). Les cases « Ech N°X » (tableau « Plan de plaque ») sont accessibles pour la saisie de l'identifiant de chacun des échantillons. Le tableau du bas permet de rentrer manuellement ou par « copier-coller » l'ensemble des données expérimentales (DO450nm moins DO630nm) de chaque puits **en accord avec le plan de plaque** et le nombre d'échantillons testés.

Lors de la saisie/copie des données, respecter le format des nombres (notamment le séparateur de décimaux « , » ou « . ») selon le paramétrage du système d'exploitation et/ou d'Excel.

Un champ « Remarques/Observations » permet d'indiquer toutes les informations complémentaires jugées utiles.

9.3 Feuille « Résultats »

Sur cette feuille, les seuls champs accessibles à la saisie de l'utilisateur sont les cellules « Visa opérateur », « Validation » et « Facteur de dilution ».

Cette page de calcul et de rendu de résultats se complète automatiquement à partir des données saisies dans l'onglet « Plan de plaque - Saisie lectures ».

Dans le cas où aucun calcul ne se fait sur la feuille « Résultats », vérifier que le « . » a bien été utilisé comme séparateur des décimaux lors de la saisie des données.

Le tableau de résultats est exprimé en concentration **en pg/ml dans le puit. L'échantillon testé est une dilution au ½ de l'échantillon.**

Vérifier la validité des résultats en contrôlant les éléments ci-dessous :

- La densité optique moyenne du STD0 doit être au maximum égale à 0,025.
- La densité optique du STD200 (200pg/mL) doit être au moins égale à 1.300.
- Linéarité : le coefficient de corrélation R^2 de la courbe d'étalonnage doit être au moins égal à 0.99.
- Le ratio DO STD6.25 / DO STD0 (Moyenne) ≥ 2

Si l'un de ces critères n'est pas conforme, les performances du test ne sont pas atteintes et les résultats obtenus sont invalides.

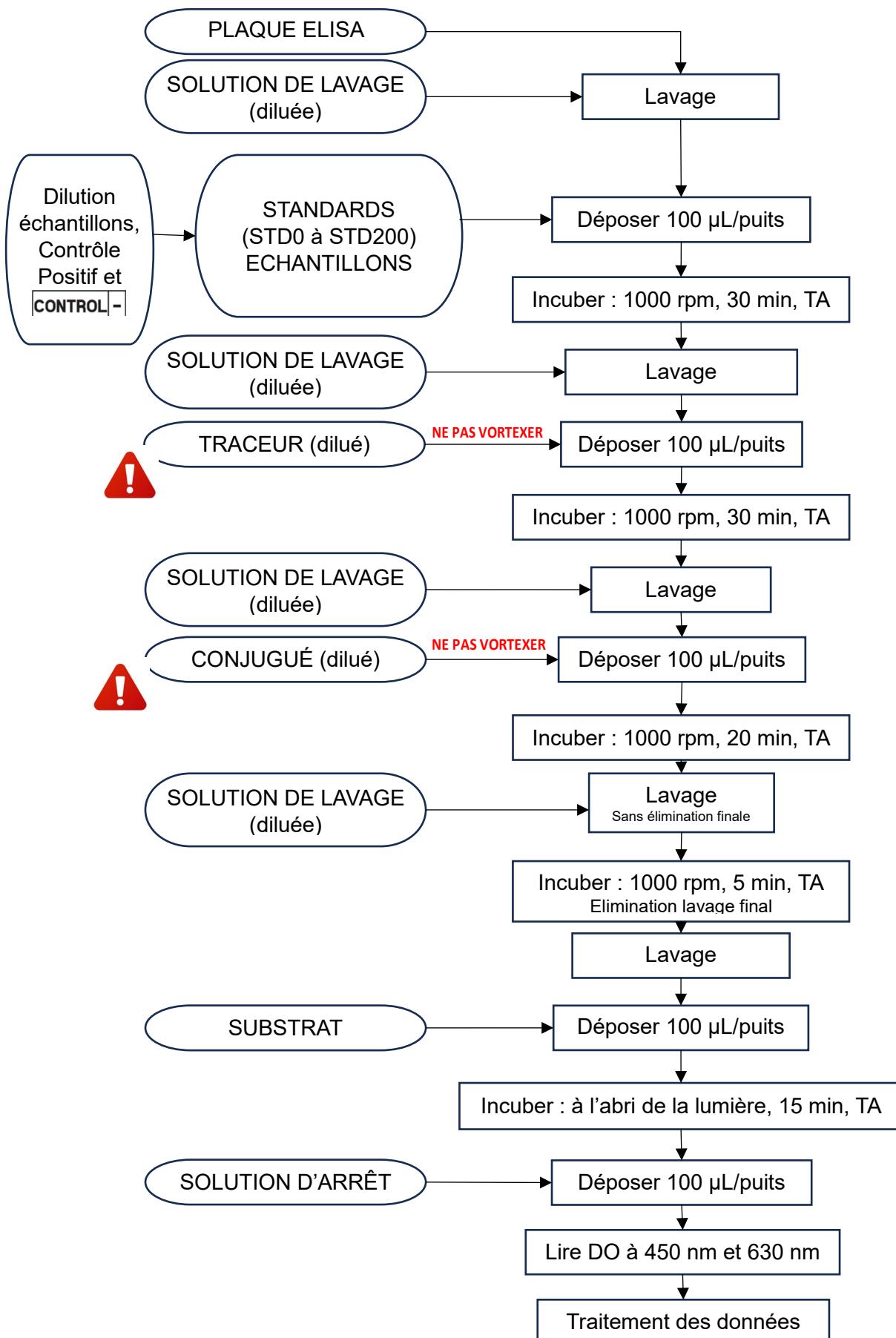
10 Interprétation des résultats

Un résultat **inférieur à la limite de détection** est considéré **négatif**.

NOTICE D'UTILISATION

eZYDIAG® ELISA Anthrax

11 Protocole résumé



NOTICE D'UTILISATION

eZYDIAG® ELISA Anthrax

12 Elimination du kit

Les composants du kit sont à éliminer en tant que déchets chimiques et biologiques (infectieux) selon les procédures internes au laboratoire et conformément à la réglementation en vigueur.

13 Limitations de la procédure

Le résultat peut être faussé lorsque l'échantillon présente une caractéristique visuelle anormale. Une inspection visuelle des échantillons avant analyse est recommandée.

La présence de biotine dans les échantillons peut potentiellement impacter les immunodosages utilisant la technologie Streptavidine - Biotine.

Contact

Fabricant	LABORATOIRE AGUETTANT 1 rue Alexander Fleming 69007 LYON FRANCE
Assistance technique	www.aguettant.fr +33 4 78 61 51 41
Information médicale	infoscientifique@aguettant.fr
Réclamations	reclamations@aguettant.fr

NOTICE D'UTILISATION

eZYDIAG® ELISA Anthrax

Symbole

Symbole	Définition
	Fabricant
	Date limite d'utilisation
LOT	Code de lot
REF	Référence catalogue
	Ne pas utiliser si l'emballage est endommagé et consulter les instructions d'utilisation
	Limite de température: entre 2 °C et 8 °C
	Consulter les instructions d'utilisation électroniques www.aguettant.fr/kit-anthrax
	Contenu suffisant pour < 40 > essais
	Contient un matériau biologique d'origine animale
CONTROL -	Contrôle négatif
RUO	Destiné à la recherche uniquement.

Termes et abréviations

STD	Standards
DO	Densité optique
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
HRP	Horseradish peroxidase
LF	Lethal factor = Facteur létal de l'anthrax
QC	Contrôle Qualité
REF	Référence
RPM	Rotation par minute
S	Sample = Echantillon
TA	Température ambiante
TMB	3,3',5,5'-Tétraméthylbenzidine