

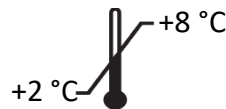


# Notice d'utilisation

## eZYDIAG® ELISA RICINE

### Test quantitatif et qualitatif de la toxine

### Ricine



**LABORATOIRE AGUETTANT**

1 rue Alexander Fleming

69007 Lyon,

France

## **1 DESTINATION DU DISPOSITIF**

Le kit est un dispositif médical de diagnostic in-vitro, destiné à la détection spécifique de la ricine dans des échantillons de plasma humain. Le test est quantitatif et qualitatif : un protocole différent est défini en conséquence.

Le kit est destiné à être utilisé pour tous les patients, quels que soient leur âge et leur sexe, potentiellement exposés et/ou empoisonnés, de manière accidentelle ou intentionnelle (suicide, bioterrorisme) à l'agent toxique Ricine, et quelle que soit la voie d'exposition (par ingestion, inhalation ou injection).

Les tests doivent être effectués sur du plasma humain obtenu à partir d'échantillons sanguins prélevés sur tubes de collecte citrate ou EDTA. Les plasmas héparinés ne doivent pas être analysés avec le kit.

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

Les résultats de l'analyse sont destinés à être utilisés par des professionnels de santé.

## **2 PRINCIPE DE L'ANALYSE**

Le kit est un immunodosage enzymatique (ELISA), utilisant deux anticorps monoclonaux spécifiques de la ricine (dosage « sandwich ») dans des échantillons de plasma humain.

La ricine est une toxine glycoprotéique présente dans la graine de ricine. Cette protéine a une masse moléculaire de 66 000 Daltons, et est formée de 2 chaînes polypeptidiques A et B de même taille et reliées par un pont disulfure. Une fois attachée par la chaîne B à la paroi cellulaire, la chaîne A, responsable des propriétés toxiques, inhibe la synthèse des protéines, provoquant la mort cellulaire.

Un anticorps monoclonal de capture, murin, RB37, dirigé contre la chaîne B de la ricine est pré-coaté dans les puits de la plaque. Des échantillons ou des standards sont ensuite ajoutés dans ces puits, si la ricine est présente dans les échantillons, elle se lie à l'anticorps immobilisé (capture). Le sandwich est formé par l'addition du deuxième anticorps monoclonal murin (détecteur), RA35, dirigé contre la chaîne A de la ricine. Le conjugué enzymatique est ajouté, et une solution de substrat réagit avec le complexe enzyme-anticorps-cible pour produire un signal mesurable. L'intensité de ce signal est directement proportionnelle à la concentration de cible (l'analyte) présente dans l'échantillon d'origine.

Le kit peut être utilisé selon deux protocoles :

- Un protocole dit essai qualitatif, permettant l'analyse d'un maximum d'échantillons (jusqu'à 45 plasmas en duplicata, les résultats sont rendus uniquement sur un critère positif/négatif.
- Un protocole dit essai quantitatif, utilisant une gamme d'étalonnage et permettant l'analyse au maximum de 38 plasmas (en duplicata), les résultats sont alors rendus de façon quantitative (concentration de ricine présente dans l'échantillon).

La phase solide est composée de 12 barrettes de 8 puits en polystyrène, dont les parois sont recouvertes du premier anticorps monoclonal (Anticorps de capture). Le second anticorps monoclonal

(Anticorps traceur) est marqué à la biotine. La fixation de ce deuxième anticorps est révélée par l'addition de streptavidine couplée à la peroxydase du raifort (HRP).

Le nombre de barrettes à utiliser est à définir selon le nombre d'échantillons à analyser et le protocole choisi en s'aidant du plan de plaque proposé, (voir §9.3 et §10.3).

L'essai comprend les étapes réactionnelles suivantes :

1. Prélavage des puits à utiliser (nombre de barrettes selon le nombre d'échantillons à analyser)
2. Distribution du contrôle négatif, du contrôle positif (protocole qualitatif) ou de la gamme de standards (protocole quantitatif) et des échantillons
3. Incubation sous agitation
4. Lavage puis distribution de l'anticorps traceur
5. Incubation sous agitation
6. Lavage puis distribution du conjugué
7. Incubation sous agitation
8. Lavage puis révélation de l'activité enzymatique liée à la phase solide par addition du substrat
9. Arrêt de la révélation
10. Lecture au spectrophotomètre des absorbances à 450 nm et 630 nm (ou 620 nm selon les filtres disponibles)
11. Interprétation des résultats

La réalisation du test dans une pièce de température supérieure à 25°C peut entraîner une détérioration des performances.

### 3 COMPOSITION DU KIT

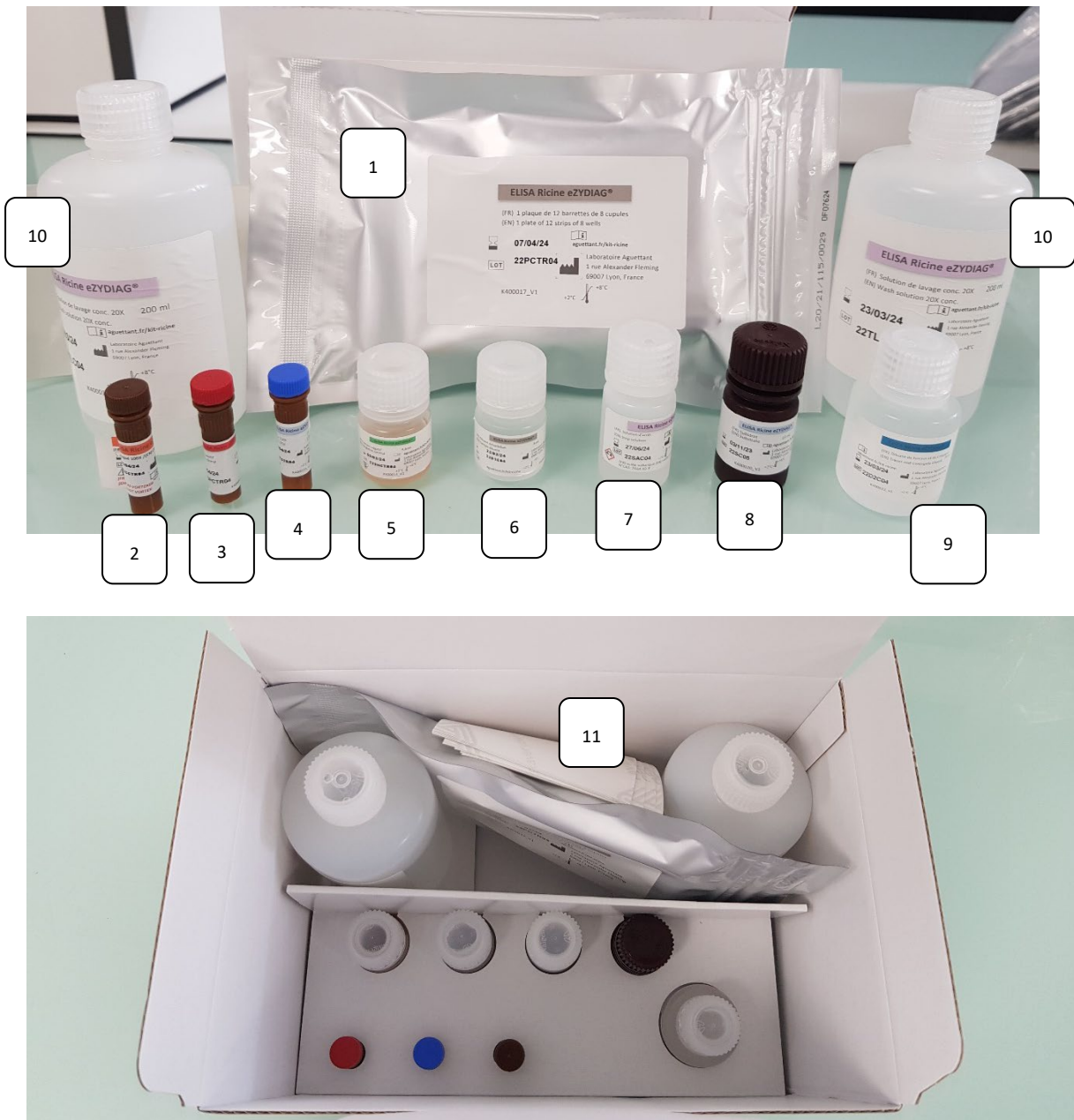



Figure 1: Composition du kit

Composants	Nature des réactifs	Présentation	N°
PLAQUE ELISA RICINE	Microplaque : 12 barrettes de 8 puits revêtus avec un anticorps monoclonal de souris anti-ricine.	1 plaque avec dessiccant en sachet aluminisé refermable.	1
CONJUGUÉ 100x	Solution de streptavidine couplée à la peroxydase du raifort (HRP). <b>Solution 100 fois concentrée (100X)</b>	1 flacon (0.2 mL)	2
CONTRÔLE POSITIF	Contrôle positif. <b>A diluer selon le protocole pour obtenir le contrôle positif (protocole qualitatif) ou la gamme d'étalonnage (protocole quantitatif).</b>	1 flacon (1.1 mL)	3
TRACEUR 100X	Solution d'anticorps de détection (anticorps monoclonal de souris anti-ricine) couplé à la biotine. <b>Solution 100 fois concentrée (100X)</b>	1 flacon (0.2 mL)	4
<b>CONTROL -</b>	Contrôle négatif composé de sérum contrôlé. <b>A diluer selon protocole.</b>	1 flacon (4.8 mL)	5
DILUANT DES ÉCHANTILLONS	Solution tamponnée de dilution (phosphate salin), contient un anticorps monoclonal non spécifique de souris. <b>Solution prête à l'emploi.</b>	1 flacon (8 mL)	6
SOLUTION D'ARRÊT	Solution d'arrêt, acide sulfurique à 2,95 % <b>Solution prête à l'emploi.</b> 	1 flacon (12 mL)	7
SUBSTRAT	Solution de TMB (3,3', 5,5'-tetramethylbenzidine). <b>Solution prête à l'emploi.</b>	1 flacon (13 mL)	8
DILUANT DU TRACEUR ET DU CONJUGUÉ	Solution tamponnée de dilution du traceur et du conjugué (tampon phosphate salin). <b>Solution prête à l'emploi.</b>	1 flacon (28 mL)	9
SOLUTION DE LAVAGE	Solution tamponnée. <b>Solution concentrée 20 fois (20X).</b>	2 flacons (2x200 mL)	10
/	Film adhésifs	9 films adhésifs	11

Traçabilité métrologique : le **CONTRÔLE POSITIF** est préparé à partir d'un tourteau de ricine. La valeur attribuée est contrôlée par une hiérarchie d'étalonnage définie en interne.

## 4 MATERIELS REQUIS MAIS NON FOURNIS

L'utilisation du kit requiert l'utilisation des matériels suivants, non fournis par le LABORATOIRE AGUETTANT :

- **Micropipettes.** Cet appareil doit être en bon état et faire l'objet de contrôles métrologiques réguliers conformément aux bonnes pratiques de laboratoire.
- **Micropipette 8 canaux.** Cet appareil doit être en bon état et faire l'objet de contrôles métrologiques réguliers conformément aux bonnes pratiques de laboratoire.
- **Tubes en polypropylène** pour réaliser les différentes dilutions.
- **Agitateur de microplaques**
- **Laveur de plaques automatique** (le lavage manuel ne permet pas l'atteinte de critères de validation des résultats). Cet appareil doit être en bon état et faire l'objet de contrôles métrologiques réguliers conformément aux bonnes pratiques de laboratoire.
- **Spectrophotomètre** permettant la mesure sur microplaques 96 puits, des absorbances à 450 nm et 630 nm (ou 620 nm suivant les filtres disponibles). Cet appareil doit être en bon état et faire l'objet de contrôles métrologiques réguliers conformément aux bonnes pratiques de laboratoire.



**IL EST ESSENTIEL DE DISPOSER D'UN LAVEUR DE MICROPLAQUES**

**IL EST FORTEMENT DECONSEILLE DE FAIRE LES LAVAGES PAR RETOURNEMENT**

**2 programmes de lavages sont utilisés :** (à programmer sur votre laveur)

- **Programme n°1 (Prog 1) :** 3 distributions successives de 300 µL par puits **avec** aspiration finale.
- **Programme n°2 (Prog 2) :** 3 distributions successives de 300 µL par puits **sans** aspiration finale.

**Le respect de ces protocoles de lavage est essentiel pour la qualité et la validité des résultats.**

## 5 CONDITIONS DE STABILITE ET DE CONSERVATION

- Conserver le kit dans son emballage d'origine, à une température comprise entre **+2°C et +8°C**.
- Ne pas utiliser les kits au-delà de la date de péremption indiquée sur l'étiquette du kit.
- Ne pas congeler les réactifs.
- Le kit peut être utilisé pendant le mois suivant l'ouverture dans les conditions suivantes :
  - Rapidement après utilisation, les composants sont stockés entre +2°C et +8°C.
  - Les réactifs liquides ne sont pas dilués ou souillés
  - Les bouteilles, les flacons et le sachet sont fermés précautionneusement après utilisation.
  - Le sachet de la **PLAQUE ELISA RICINE** a été ouvert selon après remise à température ambiante.
  - Il est recommandé de noter la date de première utilisation.

## 6 TYPES D'ÉCHANTILLONS

Le test doit être réalisé sur des plasmas humains obtenus à partir de prélèvements sanguins réalisés sur tubes de collecte citrate ou EDTA. Les plasmas héparinés ne doivent pas être analysés avec ce kit. Il est préférable de tester les échantillons dans un délai de 24 heures suivant le prélèvement avec une conservation entre 2°C et 8°C. Au-delà, la conservation des plasmas est possible à -20°C pour une durée inférieure à 6 mois, ou à -70/80°C pour des durées supérieures.

Suivre la procédure standard de prélèvement sanguin en évitant tout contact direct avec le sang.

Certains échantillons pouvant générer des résultats erronés, il est recommandé d'identifier préalablement à l'analyse tous les échantillons qui pourraient présenter un aspect anormal (opalescents, lactescents, ictériques, hémolysés, partiellement coagulés...).

Si les échantillons doivent être transportés, ils doivent être conditionnés et emballés selon les réglementations relatives au transport d'échantillons biologiques et transportés réfrigérés (entre 2°C et 8°C) sur une durée maximum de 25 heures ou congelés (< -20°C).

## 7 MISES EN GARDE ET PRECAUTIONS

- Ne pas utiliser le kit s'il est endommagé.
- Ne pas utiliser le kit s'il existe des signes de contamination ou de modification.
- Les réactifs doivent être conservés à une température de +2°C à +8°C.
- 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.
- Laisser les réactifs revenir à température ambiante pendant environ une heure (sauf le [TRACEUR 100X](#) et le [CONJUGUÉ 100X](#)) avant utilisation.
- Ne pas vortexer les flacons [TRACEUR 100X](#) et [CONJUGUÉ 100X](#) ainsi que leur dilution (mélanger par aspiration – refoulement).
- Diluer soigneusement les réactifs, en évitant toute contamination.
- La [SOLUTION D'ARRÊT](#) contient de l'acide sulfurique et représente un danger corrosif, veuillez donc prendre des précautions lors de son utilisation
- 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 (<10 µL).
- Après chaque lavage, il est nécessaire de distribuer les réactifs le plus rapidement possible et sans délai.
- Changer l'embout de pipette entre chaque échantillon.
- Respecter strictement le protocole fourni par le fabricant.
- Le lavage des puits est une étape essentielle de la procédure et doit être réalisée avec un laveur de microplaque, le lavage par retournement est fortement déconseillé.

- Respecter les programmes de lavages indiqués dans cette notice et vérifier que tous les puits sont totalement remplis, puis totalement vidés. Un lavage mal effectué entrainera des résultats incorrects.
- Ne jamais utiliser le même contenant et le même embout de pipette pour ajouter le conjugué et le substrat.
- Sur des échantillons partiellement coagulés, veillez à ne pas pipeter de fibrine.
- Dans le cadre du protocole qualitatif, tester systématiquement les témoins positifs et négatifs.
- Dans le cadre du protocole quantitatif, intégrer systématiquement une gamme d'étalonnage à toute manipulation.
- En cas d'identification d'échantillons positifs, fortement concentrés, il est conseillé d'inactiver les déchets liquides à la soude (NaOH, 0,1 M en concentration finale).
- S'assurer que tous les appareils utilisés dans cette procédure ont été vérifiés et étalonnés conformément aux recommandations du fabricant.

(\*) Les fiches de données de sécurité du kit sont mises à disposition par le LABORATOIRE AGUETTANT à l'interlocuteur client privilégié lors de toute commande de kit ELISA RICINE eZYDIAG®. Elles sont disponibles à <https://www.aguettant.fr/kit-ricine/>.

## **8 PREPARATION DES REACTIFS**

L'ensemble de la préparation des réactifs et dilution des échantillons est à réaliser extemporanément.

### **8.1 Réactifs prêts à l'emploi**

#### **8.1.1 PLAQUE ELISA RICINE**

Avant ouverture du sachet, laisser la **PLAQUE ELISA RICINE** revenir à température ambiante pendant 1 heure 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, prendre le nombre de barrettes nécessaires aux analyses et remettre immédiatement les barrettes inutilisées dans le sachet avec le dessiccant.

Refermer hermétiquement après avoir pris soin de chasser l'air.

Conserver à une température entre +2°C et +8°C.

#### **8.1.2 Réactifs liquides prêts à l'emploi**

Les réactifs suivants :

- **DILUANT DU TRACEUR ET DU CONJUGUÉ**
- **DILUANT DES ÉCHANTILLONS**
- **SUBSTRAT**
- **SOLUTION D'ARRÊT**
- **CONTROL -**
- **CONTRÔLE POSITIF**

doivent être ramenés à température ambiante, environ 1 heure avant leur utilisation.



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

Après chaque utilisation, ils doivent être rebouchés soigneusement et remis rapidement entre +2°C et +8°C pour garantir leur bonne conservation.

## 8.2 Dilution des réactifs

Après chaque utilisation, les réactifs doivent être rebouchés soigneusement et remis rapidement entre +2°C et +8°C pour garantir leur bonne conservation. N'utiliser que la quantité nécessaire pour la réalisation des analyses.

### 8.2.1 TRACEUR DILUÉ

La préparation du TRACEUR DILUÉ doit être réalisée 10 minutes maximum avant la fin de l'incubation des échantillons et Standards.

Diluer le TRACEUR 100X au 1/100 dans le DILUANT DU TRACEUR ET DU CONJUGUÉ (ex : 10 µL de TRACEUR 100X + 990 µL de DILUANT DU TRACEUR ET DU CONJUGUÉ pour une barrette). Effectuer une agitation douce par aspiration-refoulement à la micropipette ou par retournement pour homogénéiser le mélange. Ne pas vortexer.

Il est recommandé d'éviter le pipetage de trop petites quantités (< 10 µL). Pour rappel, il est nécessaire d'utiliser des micropipettes en bon état et ayant fait l'objet d'une calibration récente.

### 8.2.2 CONJUGUÉ DILUÉ

La préparation du CONJUGUÉ DILUÉ doit être réalisée 10 minutes avant son dépôt dans le puit.

Diluer la solution de CONJUGUÉ 100X au 1/100 dans le DILUANT DU TRACEUR ET DU CONJUGUÉ (ex : 10 µL de CONJUGUÉ 100X + 990 µL de DILUANT DU TRACEUR ET DU CONJUGUÉ). Effectuer une agitation douce par aspiration-refoulement à la micropipette ou par retournement pour homogénéiser le mélange. Ne pas vortexer.

Il est recommandé d'éviter le pipetage de trop petites quantités (< 10 µL). Pour rappel, il est nécessaire d'utiliser des micropipettes en bon état et ayant fait l'objet d'une calibration récente.

### 8.2.3 SOLUTION DE LAVAGE DILUÉE

Diluer la SOLUTION DE LAVAGE 20X au 1/20 dans de l'eau distillée, eau ultrapure ou « Pour préparation injectable » à température ambiante (ex : 50 mL de SOLUTION DE LAVAGE 20X + 950 mL d'eau distillée).

## 9 PROTOCOLE ESSAI QUALITATIF

### 9.1 Préparation des témoins pour le protocole qualitatif

Identification du point	Dilution à réaliser	Réactif 1	Volume Réactif 1 (µL)	Réactif 2	Volume Réactif 2 (µL)
<i>Témoin Positif</i>	1/4	CONTRÔLE POSITIF	60	DILUANT DES ÉCHANTILLONS	180
<i>Témoin Négatif</i>	1/2	CONTROL -	250	DILUANT DES ÉCHANTILLONS	250

### 9.2 Préparation des échantillons

Les échantillons doivent être testés en duplicata.

Identification du point	Dilution à réaliser	Réactif 1	Volume Réactif 1 (µL)	Réactif 2	Volume Réactif 2 (µL)
<i>Echantillon x</i>	1/2	Echantillon x	125	DILUANT DES ÉCHANTILLONS	125

### 9.3 Plan de plaque (qualitatif)

Le plan de plaque proposé, ci-dessous, doit être respecté afin de permettre une utilisation simplifiée du fichier Excel de traitement des résultats.

Ce fichier est mis à disposition par le LABORATOIRE AGUETTANT à l'interlocuteur client privilégié lors de toute commande de kit et est disponible à <https://www.aguettant.fr/kit-ricine/>.

Saisir l'identifiant de chacun de vos échantillons dans les cases												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	<i>Témoin Positif</i>	ECH n°2	ECH n°6	ECH n°10	ECH n°14	ECH n°18	ECH n°22	ECH n°26	ECH n°30	ECH n°34	ECH n°38	ECH n°42
<b>B</b>												
<b>C</b>	<i>Témoin Négatif</i>	ECH n°3	ECH n°7	ECH n°11	ECH n°15	ECH n°19	ECH n°23	ECH n°27	ECH n°31	ECH n°35	ECH n°39	ECH n°43
<b>D</b>												
<b>E</b>		ECH n°4	ECH n°8	ECH n°12	ECH n°16	ECH n°20	ECH n°24	ECH n°28	ECH n°32	ECH n°36	ECH n°40	ECH n°44
<b>F</b>												
<b>G</b>	ECH n°1	ECH n°5	ECH n°9	ECH n°13	ECH n°17	ECH n°21	ECH n°25	ECH n°29	ECH n°33	ECH n°37	ECH n°41	ECH n°45
<b>H</b>												

(ECH = échantillon)

## 9.4 Protocole qualitatif détaillé

Avant toute incubation recouvrir la plaque d'un film adhésif propre (inclus dans le kit).

1. Laver les barrettes avant utilisation avec 3 distributions successives de 300 µL de **SOLUTION DE LAVAGE DILUÉE** (voir §8.2.3) par puits (programme n°1, voir §4).
2. Selon le plan de plaque, distribuer 100 µL de *témoin positif dilué* en duplicata (voir §9.1) et 100 µL du *témoin négatif dilué* (voir §9.1) en quadruplet ainsi que 100 µL de chaque *échantillon dilué* à analyser (voir §9.2).
3. Incuber sous agitation (1000 rpm) pendant 45 minutes à température ambiante.
4. Laver avec 3 distributions successives de 300 µL de **SOLUTION DE LAVAGE DILUÉE** (voir §8.2.3) par puits (programme n°1, voir §4).
5. Distribuer 100 µL de **TRACEUR DILUÉ** (voir §8.2.1) par puits.
6. Incuber sous agitation (1000 rpm) pendant 45 minutes à température ambiante.
7. Laver avec 3 distributions successives de 300 µL de **SOLUTION DE LAVAGE DILUÉE** (voir §8.2.3) par puits (programme n°1, voir §4).
8. Distribuer 100 µL par puits de **CONJUGUÉ DILUÉ** (voir §8.2.2).
9. Incuber sous agitation (1000 rpm) pendant 30 minutes à température ambiante.
10. Laver avec 3 distributions successives de 300 µL de **SOLUTION DE LAVAGE DILUÉE** (voir §8.2.3) **sans aspiration finale** (programme n°2, voir §4).
11. Agiter 5 minutes à 1000 rpm (puits contenant les 300 µL de solution de lavage 1X).
12. Laver avec 3 distributions successives de 300 µL de **SOLUTION DE LAVAGE DILUÉE** (voir §8.2.3) par puits (programme n°1, voir §4).
13. Distribuer 100 µL par puits de **SUBSTRAT**.
14. Incuber dans l'obscurité 30 minutes sans agitation.
15. Distribuer 100 µL par puits de **SOLUTION D'ARRÊT**.
16. Lire l'absorbance à 450 et 630 nm (ou 620 nm selon les filtres disponibles).

Si applicable, programmer le lecteur pour obtenir directement les valeurs correspondant à la soustraction des absorbances mesurées à 450 nm avec celles mesurées à 630 nm. Dans le cas contraire, il faudra faire cette soustraction, sur un tableur ou manuellement, à partir des données brutes du lecteur.

## 9.5 Calcul et interprétation des résultats (protocole qualitatif)

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 à <https://www.aguettant.fr/kit-ricine/>. Le fichier comporte 3 feuilles, « Informations générales », « Plan de plaque - Saisie lectures » et « Résultats »

### 9.5.1 Feuille « Informations générales »

Cette feuille permet de saisir librement les informations que vous souhaitez.

### 9.5.2 Feuille « Plan de Plaque - Saisie lectures »

Cette feuille vous permet de renseigner le nom de votre laboratoire, la date, l'identité de l'opérateur, la référence du kit utilisé.

Elle vous 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 de vos échantillons.

Le tableau du bas vous 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, il faut respecter le format des nombres (notamment le séparateur de décimaux « , » ou « . ») selon le paramétrage de votre système d'exploitation et/ou d'Excel.

**Attention**, en cas d'erreur de format des nombres lors de la saisie ou de la copie (séparateur des décimaux erroné), aucun calcul ne pourra se faire. Dans ce cas, il apparaît la mention « Pb saisie » en rouge au-dessus de la colonne sur le tableau de saisie des résultats (test d'erreur réalisé uniquement sur la ligne « A » du tableau).

Il vous est possible d'invalider des valeurs qui vous paraîtront aberrantes (à définir sous votre responsabilité), que ce soit sur les témoins ou les échantillons. Pour cela il faut supprimer la valeur en question dans le tableau de saisie des résultats.

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

### 9.5.3 Feuille « Résultats »

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

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 vous avez bien utilisé le séparateur des décimaux approprié lors de la saisie des données.

Les critères d'acceptation pour les témoins sont les suivants :

<b>Témoins négatif</b>	DO (450-630nm) ≤ <b>0,050</b>
<b>Témoins positif</b>	DO (450-630 nm) ≥ <b>0,700</b>

Après validation de ces critères, est calculé pour chaque échantillon, le rapport suivant :

$$\frac{[\text{Moyenne (DO450nm - DO630 nm Echantillon)}]}{[\text{Moyenne (DO450nm - DO630 nm témoin négatif)}]}$$

**Si ce rapport est inférieur ou égal à 2,00, l'échantillon est négatif.**

**Si ce rapport est supérieur à 2,00 l'échantillon est potentiellement positif et doit être réanalysé en utilisant le protocole quantitatif.**

En cas de non-validation d'un ou des 2 témoins, les résultats des échantillons ne peuvent pas être considérés et validés (mention « **Résultat invalide** » dans la feuille de résultats). Il est alors nécessaire de refaire un dosage en vérifiant, au préalable et a minima, les éléments suivants :

- Vérifier l'absence d'un point aberrant parmi les 4 points de témoin négatif.
- Le respect général des préconisations et protocoles de la présente notice.
- La préparation des réactifs en respect du protocole fourni.
- La programmation du laveur de plaque utilisé.
- Le bon fonctionnement de ce laveur.
- Le respect du prélavage des barrettes en tout début de protocole.
- L'utilisation des 2 programmes de lavages en accord avec le protocole fourni.
- La température ambiante.
- Les longueurs d'ondes utilisées lors des lectures.

## **10 PROTOCOLE ESSAI QUANTITATIF**

### **10.1 Préparation de la gamme d'étalonnage**

Les volumes sont calculés en considérant un test des standards en duplicata.

<b>Identification du point</b>	<b>Dilution à réaliser</b>	<b>Réactif 1</b>	<b>Volume Réactif 1 (µL)</b>	<b>Réactif 2</b>	<b>Volume Réactif 2 (µL)</b>
<i>Standard 0</i>	$\frac{1}{2}$	<b>CONTROL -</b>	1300	DILUANT DES ÉCHANTILLONS	1300
<i>Standard 500 pg/mL</i>	$\frac{1}{4}$	CONTRÔLE POSITIF	120	<i>Standard 0</i>	360
<i>Standard 250 pg/mL</i>	$\frac{1}{2}$	<i>Standard 500</i>	240	<i>Standard 0</i>	240
<i>Standard 125 pg/mL</i>	$\frac{1}{2}$	<i>Standard 250</i>	240	<i>Standard 0</i>	240
<i>Standard 62.5 pg/mL</i>	$\frac{1}{2}$	<i>Standard 125</i>	240	<i>Standard 0</i>	240
<i>Standard 31.2 pg/mL</i>	$\frac{1}{2}$	<i>Standard 62.5</i>	240	<i>Standard 0</i>	240
<i>Standard 15.6 pg/mL</i>	$\frac{1}{2}$	<i>Standard 31.2</i>	240	<i>Standard 0</i>	240

## 10.2 Préparation des échantillons

Les échantillons doivent être testés en duplicata.

Identification du point	Dilution à réaliser	Réactif 1	Volume Réactif 1 (µL)	Réactif 2	Volume Réactif 2 (µL)
Echantillon x	1/2	Echantillon x	125	DILUANT DES ÉCHANTILLONS	125

## 10.3 Plan de plaque (quantitatif)

Le plan de plaque proposé, ci-dessous, doit être respecté afin de permettre une utilisation simplifiée du fichier Excel de traitement des résultats. 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 à <https://www.aguettant.fr/kit-ricine/>.

	Standards			Saisir l'identifiant de chacun de vos échantillons dans les cases								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	STD 500	STD 31.25	STD 0	ECH n°3	ECH n°7	ECH n°11	ECH n°15	ECH n°19	ECH n°23	ECH n°27	ECH n°31	ECH n°35
<b>B</b>												
<b>C</b>	STD 250	STD 15.6	STD 0	ECH n°4	ECH n°8	ECH n°12	ECH n°16	ECH n°20	ECH n°24	ECH n°28	ECH n°32	ECH n°36
<b>D</b>												
<b>E</b>	STD 125	STD 0	STD 0	ECH n°1	ECH n°5	ECH n°9	ECH n°13	ECH n°17	ECH n°21	ECH n°25	ECH n°29	ECH n°33
<b>F</b>												
<b>G</b>	STD 62.5	STD 0	STD 0	ECH n°2	ECH n°6	ECH n°10	ECH n°14	ECH n°18	ECH n°22	ECH n°26	ECH n°30	ECH n°34
<b>H</b>												

(STD : Standard / ECH : échantillon)

## 10.4 Protocole quantitatif détaillé

Avant toute incubation recouvrir la plaque d'un film adhésif propre (inclus dans le kit).

1. Laver le nombre nécessaire de barrettes avant utilisation avec 3 distributions successives de 300 µL de **SOLUTION DE LAVAGE DILUÉE** (voir §8.2.3) par puits (programme n°1, voir §4).
2. Selon le plan de plaque, distribuer en duplicata, 100 µL des *standards 500 pg/mL à 15.6 pg/mL* (voir §10.1) et distribuer 100 µL du *standard 0* (voir §10.1) dans les 8 puits indiqués et distribuer en duplicata 100 µL de chaque *échantillon dilué* à analyser (voir §10.2).
3. Incuber sous agitation (1000 rpm) pendant 45 minutes à température ambiante.
4. Laver avec 3 distributions successives de 300 µL de **SOLUTION DE LAVAGE DILUÉE** (voir §8.2.3) par puits (programme n°1, voir §4).
5. Distribuer 100 µL par puits de **TRACEUR DILUÉ** (voir §8.2.1).
6. Incuber sous agitation (1000 rpm) pendant 45 minutes à température ambiante.
7. Laver avec 3 distributions successives de 300 µL de **SOLUTION DE LAVAGE DILUÉE** (voir §8.2.3) par puits (programme n°1, voir §4).
8. Distribuer 100 µL par puits de **CONJUGUÉ DILUÉ** (voir §8.2.2).
9. Incuber sous agitation (1000 rpm) pendant 30 minutes à température ambiante.
10. Laver avec 3 distributions successives de 300 µL de **SOLUTION DE LAVAGE DILUÉE** (voir §8.2.3) par puits **sans aspiration finale** (programme n°2, voir §4).
11. Agiter 5 minutes à 1000 rpm (puits contenant les 300 µL de **SOLUTION DE LAVAGE DILUÉE**).
12. Laver avec 3 distributions successives de 300 µL de **SOLUTION DE LAVAGE DILUÉE** (voir §8.2.3) par puits (programme n°1, voir §4).
13. Distribuer 100 µL par puits de **SUBSTRAT**.
14. Incuber à l'obscurité 30 minutes sans agitation.
15. Distribuer 100 µL par puits de **SOLUTION D'ARRÊT**.
16. Lire l'absorbance à **450 et 630 nm** (ou 620 nm selon les filtres disponibles).  
Si vous en avez la possibilité, programmer votre lecteur pour obtenir directement les valeurs correspondant à la soustraction des absorbances mesurées à 450 avec celles mesurées à 630 nm. Dans le cas contraire, il faudra faire cette soustraction, sur un tableur ou manuellement, à partir des données brutes du lecteur.

## 10.5 Interprétation des résultats (protocole quantitatif)

L'interprétation des résultats du protocole quantitatif 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 à <https://www.aguettant.fr/kit-ricine/>

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

### 10.5.1 Feuille « Informations générales »

Cette feuille permet de saisir librement les informations que vous souhaitez.

### 10.5.2 Feuille « Plan de Plaque - Saisie lectures »

Cette feuille vous permet de renseigner le nom de votre laboratoire, la date, l'identité de l'opérateur, la référence du kit utilisé.

Elle vous 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 de vos échantillons.

Le tableau du bas vous 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, il faut respecter le format des nombres (notamment le séparateur de décimaux « , » ou « . ») selon le paramétrage de votre système d'exploitation et/ou d'Excel.

**Attention**, en cas d'erreur de format des nombres lors de la saisie ou de la copie (séparateur des décimaux erroné), aucun calcul ne pourra se faire. Dans ce cas, il apparaît la mention « Pb saisie » en rouge au-dessus de la colonne sur le tableau de saisie des résultats (test d'erreur réalisé uniquement sur la ligne « A » du tableau).

Il vous est possible d'invalider des valeurs qui vous paraîtront aberrantes (à définir sous votre responsabilité), que ce soit sur les témoins ou les échantillons. Pour cela il faut supprimer la valeur en question dans le tableau de saisie des résultats.

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

### 10.5.3 Feuille « Résultats »

Sur cette feuille, les seuls champs accessibles à la saisie de l'utilisateur sont les cellules « Visa opérateur » et « Validation » (à remplir suivant vos procédures).

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 vous avez bien utilisé le « . » comme séparateur des décimaux lors de la saisie des données.



Les critères d'acceptation pour la gamme standard sont les suivants :

<b>Standard 0</b>	Moyenne DO (450-630nm) Std 0	≤ <b>0,050</b>
<b>Standard 500</b>	Moyenne DO (450-630 nm) Std 500	≥ <b>0,700</b>
<b>Limite de détection &lt; Limite de quantification</b>		

Après validation de ces critères, la concentration des échantillons est calculée.

- Tout échantillon dont le résultat est inférieur à la Limite de Détection (LOD) est considéré comme **négatif**.
- Tout échantillon dont le résultat est compris entre la limite de détection (LOD) et la limite de quantification (LOQ) est considéré comme « **positif non quantifiable** ». Il est recommandé de le ré-analyser pour vérification.
- Tout échantillon dont le résultat est supérieur à la limite de quantification (LOQ) est considéré comme **positif** et la concentration affichée dans le tableau résultat doit être multipliée par 2 pour avoir la concentration finale dans l'échantillon patient.



Les résultats indiqués dans le fichier de calcul sont des concentrations par puits. Ainsi, l'échantillon étant dilué au demi lors de la préparation, il convient de multiplier le résultat obtenu par deux pour obtenir la concentration réelle dans l'échantillon patient.

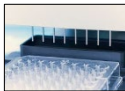


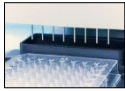


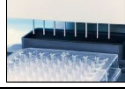


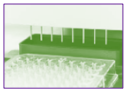

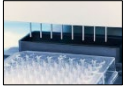




La mention « **Résultat invalide** » dans la feuille de résultats indique que les critères d'acceptation de la gamme standard ne sont pas atteints. La source de ces anomalies peut essentiellement être liée à :

- Des résultats anormaux au niveau du Standard 500.
  - Vérifier l'absence d'un point aberrant parmi sur le duplicata du Standard 500.
  - Eliminer le point aberrant dans le tableau de saisie.
  - Vérifier le respect du protocole de dilution de la gamme standard.
- Des résultats anormaux au niveau du Standard 0.
  - Vérifier le respect du pré lavage des barrettes en tout début de protocole.
  - Il faut alors vérifier l'absence de point aberrant parmi les répliqués du Standard 0.
  - Eliminer les points aberrants dans le tableau de saisie (ne pas supprimer plus de 2 points).
  - En cas de manque important de reproductibilité (plus de 2 points aberrants), il est recommandé de refaire le dosage avec la plus grande rigueur, notamment au niveau des lavages.
- Un niveau général de signal très élevé au niveau de tous les Standards 0.
  - Vérifier la programmation du laveur de plaque utilisé.
  - Vérifier le bon fonctionnement de ce laveur.
  - Vérifier le respect du pré lavage des barrettes en tout début de protocole.
  - Vérifier l'utilisation des 2 programmes de lavage en accord avec le protocole fourni.
  - Vérifier la température ambiante.
  - Vérifier les paramètres de l'agitation.

Les trois feuilles du fichier Excel sont imprimables.

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

## 11 PROTOCOLE GENERAL SCHEMATIQUE

1 – Laver la PLAQUE ELISA RICINE juste avant dépôt des échantillons	3 fois 300 µL/puits (Prog 1)	
2 – Déposer les témoins ou les standards (selon protocole choisi) et déposer les échantillons dilués	100 µL/puits	
3 - Incuber sous agitation (1000 rpm)	<b>45 minutes</b> Température ambiante	
4 - Laver les plaques	3 fois 300 µL/puits (Prog 1)	
5 - Déposer le TRACEUR DILUÉ	100 µL/puits du TRACEUR 100X dilué au 1/100	
6 -Incuber sous agitation (1000 rpm)	<b>45 minutes</b> Température ambiante	
7 - Laver les plaques	3 fois 300 µL/puits (Prog 1)	
8 - Déposer le CONJUGUÉ DILUÉ	100 µL/puits du CONJUGUÉ 100X dilué au 1/100	
9 -Incuber sous agitation (1000 rpm)	<b>30 minutes</b> Température ambiante	
10 - Laver les plaques (Prog 2)	3 fois 300 µL/puits <b>sans aspiration finale (Prog 2)</b>	
11 - Incuber	<b>5 minutes</b> à température ambiante sous agitation (sans film adhésif) (1000 rpm)	
12 – Laver les plaques	3 fois 300 µL/puits (Prog 1)	
13 - Déposer le SUBSTRAT	100µL/ puits	
14 - Incuber	<b>30 minutes</b> Température ambiante - à l'abri de la lumière	
15 – Déposer la SOLUTION D'ARRÊT	100 µL/ puits	
16 - Lire en bi-chromatisme	450/630 nm	
17 – Soustraire les signaux des 2 longueurs d'onde	[DO 450 nm - DO 630 nm]	
18 - Interpréter	Qualitatif : voir §9.5 Quantitatif : voir §10.5	

## **12 CONSIGNES D'HYGIENE ET DE SECURITE**

D'une façon générale : les conditions d'hygiène, de sécurité et de bonnes pratiques de laboratoire devront être en accord avec les différentes réglementations applicables.

- Tous les réactifs du kit sont exclusivement destinés au diagnostic *in vitro*.
- Porter des gants à usage unique pendant la manipulation des réactifs et des échantillons et se laver les mains soigneusement après la manipulation.
- Ne jamais pipeter à la bouche.
- Utiliser les équipements de protection individuelle préconisés dans les procédures de votre laboratoire.

Les déchets issus de l'utilisation du kit sont à éliminer comme des déchets biologiques et chimiques.

## **13 CARACTERISTIQUES DES PERFORMANCES**

### **13.1 Performance**

Répétabilité	Écart-type de la densité optique $\leq 20 \%$
Précision intermédiaire	Coefficient de variation de la densité optique $\leq 25 \%$
Sensibilité analytique (Limite de détection)	15.25 pg/mL Échantillons négatifs: DO $\leq 0,050$ Échantillons positifs: DO $\geq 0,700$ Ratio du seuil de positivité [moyenne(DO 450nm- DO 630nm échantillon)] / [moyenne(DO 450nm- DI 630nm témoin négatif)] $> 2$ .
Plage de mesure (test quantitatif)	15.625 pg/mL - 500 pg/mL
Spécificité analytique	$> 95 \%$
Performance clinique	Seules des études de performance analytiques sur des échantillons spikés ont été effectuées.

### **13.2 Substances interférentes et limitations**

Certains échantillons contenant des concentrations importantes de facteur rhumatoïde (RF) peuvent conduire à des résultats positifs non spécifiques. De tels cas doivent être identifiés avant la réalisation du test.

Le test est conçu pour éliminer les éventuelles interférences avec les anticorps humains anti-anticorps de souris (HAMA). Néanmoins, de fortes concentrations de HAMA peuvent donner des résultats faussement positifs.

Comme c'est le cas avec toute procédure diagnostique, le médecin doit évaluer le résultat obtenu par l'intermédiaire de ce kit à la lumière d'autres informations cliniques et diagnostiques disponibles.

Ne pas utiliser d'échantillons héparinés.

Les patients montrant des résultats douteux doivent être testés à nouveau en utilisant un nouveau prélèvement.

RA35 a été sélectionné comme anticorps détecteur avec RB37 comme anticorps de capture pour leur capacité à reconnaître la ricine avec la plus grande sensibilité dans les immunoessais en sandwich. Ainsi cette méthode de dosage immunologique est très spécifique et limite le risque de réactions croisées avec d'autres composants (médicaments, substances endogènes, substances alimentaires, anticoagulants ou conservateurs ou autre composant similaire).

## 14 ASSISTANCE ET RECLAMATION

Pour une assistance technique, veuillez contacter le LABORATOIRE AGUETTANT :

- [www.aguettant.fr](http://www.aguettant.fr) ou
- Par téléphone :(33) 04 78 61 51 41














Information médicale : [infoscientifique@aguettant.fr](mailto:infoscientifique@aguettant.fr)

Les réclamations sont à rapporter à : [reclamations@aguettant.fr](mailto:reclamations@aguettant.fr)

Les incidents sont à rapporter à : [materiovigilanceAGT@aguettant.fr](mailto:materiovigilanceAGT@aguettant.fr)

Tout incident grave en rapport avec le dispositif doit être rapporté au fabricant et aux autorités compétentes de l'État Membre dans lequel réside l'utilisateur et/ou le patient.

## 15 INDEX DES SYMBOLES

	Dispositif médical de diagnostic in vitro		Marque de conformité CE
	Lire la notice d'utilisation Notice disponible à l'adresse <a href="http://www.aguettant.fr/kit-ricine">www.aguettant.fr/kit-ricine</a>		Attention
	Numéro de lot		Risques biologiques
	Date de péremption		Contient du matériel biologique d'origine animale
	Fabricant		Ne pas utiliser si l'emballage est endommagé et consulter la notice d'utilisation
	Stocker entre +2°C et +8°C		Référence produit
	Danger: corrosive (GHS05)		

## 16 BIBLIOGRAPHIE

N/A

## **17 HISTORIQUE DES MODIFICATIONS**

<b>Version</b>	<b>Date</b>	<b>Résumé des modifications</b>
05	07/2024	Harmonisation du nom des composants. Revue de la section performance. Ajout d'un avertissement concernant le risque d'infection et le risque biologique. Modifications rédactionnelles.
04	04/2024	Ajout d'un avertissement de multiplier par 2 pour obtenir le résultat final du patient.
03	08/2023	Péremption : retrait du 24 mois pour se référer à la date de péremption sur l'étiquette du kit à la place.
02	10/2022	Extension de la péremption de 12 mois à 24 mois. Mise à jour des symboles. Modifications rédactionnelles.
01	05/2022	Création