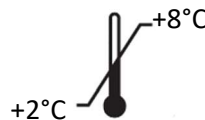


Notice d'utilisation

eZYDIAG® ELISA ANTHRAX

Dosage quantitatif du facteur létal de l'anthrax.



Laboratoire Aguetant
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 patient (dilution au ½)

Les échantillons testés sont les plasmas issus des prélèvements de sang sur :

- **Anti-coagulant EDTA et citrate,**
- **Sérums** prélevés sur tube sec. :

Les populations ciblées sont les patients potentiellement infectés par *Bacillus Anthracis* et les patients recevant un traitement contre l'anthrax.

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
CAL1	Solution étalon 1 : 200 pg/mL de toxine LF. Prêt à l'emploi.	1 x 800 µL
CAL2	Solution étalon 2 : 100 pg/mL de toxine LF. Prêt à l'emploi.	1 x 800 µL
CAL3	Solution étalon 3 : 50 pg/mL de toxine LF. Prêt à l'emploi.	1 x 800 µL
CAL4	Solution étalon 4 : 25 pg/mL de toxine LF. Prêt à l'emploi.	1 x 800 µL
CAL5	Solution étalon 5 : 12.5 pg/mL de toxine LF. Prêt à l'emploi.	1 x 800 µL
CAL6	Solution étalon 6 : 6.25 pg/mL de toxine LF. Prêt à l'emploi.	1 x 800 µL
CONJUGUÉ 100X	Solution de streptavidine couplée à la peroxydase du raifort (HRP). Solution 100 fois concentrée (100X) A diluer avant utilisation.	1 x 200 µL
QC	Contrôle positif à 30 pg/mL de toxine LF. Prêt à l'emploi.	1 x 800 µL
DILUANT DES ÉCHANTILLONS	Tampon pour la dilution des échantillons. Prêt à l'emploi.	1 x 10 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 puits 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 puits. 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.	1 x 4.8 mL

NOTICE D'UTILISATION

eZYDIAG® ELISA Anthrax

Nom	Description	Quantité
	A diluer avant utilisation selon protocole de préparation échantillon.	
TRACEUR 100X	Solution contenant un anticorps spécifique de la toxine LF marquée à la biotine. A diluer avant utilisation.	1 x 200 µL
PLAQUE ANTHRAX eZYDIAG®	Microplaque : 12 barrettes de 8 puits (96 puits) coatées avec un anticorps monoclonal spécifique du facteur létal de l'anthrax.	1

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 :

Les solutions étalon et le QC sont préparés 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.
- Laveur de plaque automatique (cf §8.4 pour le programme de lavage)
- Agitateur de plaque
- Spectrophotomètre (lecteur de plaque 96 puits) avec lecture à 450 nm et 630 nm.
- Tubes en polypropylène
- Eau purifiée

IL EST ESSENTIEL DE DISPOSER D'UN LAVEUR DE MICROPLAQUES. IL EST FORTEMENT DECONSEILLE DE FAIRE LES LAVAGES PAR RETOURNEMENT

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.

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.

NOTICE D'UTILISATION

eZYDIAG® ELISA Anthrax

Étape 2 : un second anticorps monoclonal spécifique à un autre épitope de la toxine LF facteur létal 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.

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 grâce aux étalons fournis dans le kit et le fichier tableur, et permet de quantifier la concentration de toxine LF dans l'échantillon.

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.

NB : un échantillon est considéré stable pendant 48h à température ambiante.

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.

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 patients doivent être traités comme infectieux et manipulés selon les précautions appropriées définies au sein du laboratoire.
- Une suspicion d'infection à *Bacillus anthracis* doit être signalée sans délai au centre national de référence ou tout autre autorité de santé.
- Le diagnostic de l'anthrax doit être fondé sur l'historique, les signes, les symptômes, la probabilité d'exposition, des résultats de laboratoire complémentaires et les procédures de confirmation définies par le centre national de référence ou tout autre autorité de santé.

NOTICE D'UTILISATION

eZYDIAG® ELISA Anthrax

- La concentration de facteur létal dans le sang provenant d'individus présentant une infection précoce peut être insuffisante pour être détectée. Un résultat négatif ne présume donc pas d'une absence d'infection et ne doit pas être utilisé comme seul élément pour le diagnostic, le traitement ou tout autre décision relative à la prise en charge du patient.
- 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 0.
- 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
- Ne pas vortexer les flacons « Traceur » et « Conjugué » ainsi que leur dilution (mélanger par aspiration – refoulement).
- 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 0 pour assurer la performance du test.
- Eliminer les composants du kit selon la procédure décrite en section 0.

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 patients doivent être traités comme infectieux et manipulés selon les précautions appropriées définies au sein du laboratoire.

Protocole détaillé

Préparation des réactifs

Les réactifs ci-dessous doivent être dilués avant utilisation.

NOTICE D'UTILISATION

eZYDIAG® ELISA Anthrax

Le kit est à usage unique, l'intégralité de chaque réactif doit être préparé.

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
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.		
CONTROL -	En même temps que les échantillons	Dilution au 1/2 avec le DILUANT DES ÉCHANTILLONS	Selon le protocole de préparation des échantillons

Préparation des échantillons

Diluer les échantillons patients au 1/2 avec le DILUANT DES ÉCHANTILLONS. Prévoir minimum 50 µL par échantillon et par puits et un test en duplicat.

Préparation du plan de plaque

Les solutions étalons, les solutions de contrôle qualité et les échantillons doivent être testés en duplicat.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CAL1	CAL1	S1	S1	S9	S9	S17	S17	S25	S25	S33	S33
B	CAL2	CAL2	S2	S2	S10	S10	S18	S18	S26	S26	S34	S34
C	CAL3	CAL3	S3	S3	S11	S11	S19	S19	S27	S27	S35	S35
D	CAL4	CAL4	S4	S4	S12	S12	S20	S20	S28	S28	S36	S36
E	CAL5	CAL5	S5	S5	S13	S13	S21	S21	S29	S29	S37	S37
F	CAL6	CAL6	S6	S6	S14	S14	S22	S22	S30	S30	S38	S38
G	C-	C-	S7	S7	S15	S15	S23	S23	S31	S31	S39	S39
H	QC	QC	S8	S8	S16	S16	S24	S24	S32	S32	S40	S40

C- = **CONTROL -**

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

Protocole de lavage de la plaque

Le lavage de la plaque doit être effectué impérativement avec un laveur de plaque pour garantir la performance du test. Deux programmes sont nécessaires :

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

NOTICE D'UTILISATION

eZYDIAG® ELISA Anthrax

ATTENTION : Ne pas effectuer de lavage manuel par inversion/retournement.

Réalisation du test

PRÉPARER LA SOLUTION DE LAVAGE (voir section 0)

- 1) Sortir la **PLAQUE ELISA ANTHRAX** de son sachet.
- 2) Laver les puits selon le **PROGRAMME DE LAVAGE 1**.
- 3) Déposer immédiatement **100 µL** de chaque solution étalon, QC, **CONTROL -** dilué et d'échantillons dilués selon le plan de plaque défini. Le dépôt doit être réalisé en 30 minutes maximum.

LES SOLUTIONS ÉTALONS, LE QC, LE **CONTROL -** ET LES ÉCHANTILLONS DOIVENT ÊTRE TESTÉS EN DUPLICAT.

- 4) Recouvrir la plaque avec un film adhésif.
- 5) Placer la plaque **sous agitation** (1000 rpm) pendant **30 minutes à température ambiante 20 (+/-3°C)**.

PRÉPARER LA DILUTION DU TRACEUR (voir section 0)

- 6) Laver les puits selon le **PROGRAMME DE LAVAGE 1**.
- 7) Déposer **100 µL** de **TRACEUR** (préalablement dilué) dans chaque puits.
- 8) Recouvrir la plaque avec un film adhésif.
- 9) Placer la plaque sous **agitation** (1000 rpm) pendant **30 minutes à température ambiante**.

PRÉPARER LA DILUTION DU CONJUGUÉ (voir section 0)

- 10) Laver les puits selon le **PROGRAMME DE LAVAGE 1**.
- 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 selon le **PROGRAMME DE LAVAGE 2**.

ATTENTION : NE PAS RETIRER LE VOLUME DU DERNIER LAVAGE (voir section 0)

- 15) Placer la plaque **sous agitation** (1000 rpm) pendant **5 minutes à température ambiante**. Recouvrir d'un adhésif.

NOTICE D'UTILISATION

eZYDIAG® ELISA Anthrax

- 16) Laver les puits selon le **PROGRAMME DE LAVAGE 1**.
- 17) Dans chaque puits, déposer **100 µL** de **SUBSTRAT**.
- 18) Placer la plaque à l'abri de la lumière pendant **15 minutes** à **température ambiante sans agitation**.

ATTENTION : NE PAS AGITER

- 19) Dans chaque puits, déposer **100 µL** de **SOLUTION D'ARRÊT**.
- 20) 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 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.

Calculs des résultats

Un fichier de type tableur pouvant être utilisé pour le traitement des données est disponible sur le site : www.aguettant.fr/kit-anthrax

Un facteur de correction est défini par numéro de lot. Il est utilisé et renseigné dans le fichier de calculs sous la mention "COEFF". Il est appliqué à la DO de chaque calibrant (CAL1 à CAL6) et permet de déterminer la concentration de chaque échantillon.

Ce facteur est disponible sur le site www.aguettant.fr/kit-anthrax

Soustraire la valeur de densité optique lue à **450 nm** à celle lue à **630 nm**. Le traitement des données se fait avec le résultat de cette soustraction.

Calculer la moyenne de chaque duplicat.

Soit y le résultat de densité optique ($DO_{630}-DO_{450}$) et x la concentration de facteur létal dans la solution.

Etablir une courbe d'étalonnage polynomiale de degré 2 ($y=ax^2+bx+c$) en mettant en abscisse (axe des X) la quantité de facteur létal de l'anthrax (pg/mL) de chaque étalon et en ordonnée (axe des Y), le résultat de densité optique ($DO_{630}-DO_{450}$) correspondant.

Calculer les valeurs des paramètres **a**, **b** et **c** de l'équation de la courbe d'étalonnage.

Calculer le coefficient de corrélation **R²** de la courbe d'étalonnage.

A partir de l'équation de la courbe d'étalonnage déterminée ci-avant, calculer la concentration de la solution de contrôle qualité et de chaque échantillon testé :

$$x = \frac{-b + \sqrt{b^2 - 4 \times a \times (c - y)}}{2 \times a}$$

Ce facteur **a** est déterminé par la concentration calculée à partir de la courbe d'équation et comparé avec la concentration théorique des calibrants lors du contrôle interne du kit.

Le tableau de résultats est exprimé en concentration **en pg/ml**. **L'échantillon testé est une dilution au 1/2 de l'échantillon patient.**

NOTICE D'UTILISATION

eZYDIAG® ELISA Anthrax

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

- La densité optique moyenne du **CONTROL** doit être au maximum égale à 0,025.
- La densité optique du CAL1 (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 CAL6/C- (Moyenne) ≥ 6
- La concentration obtenue pour le QC doit être égale à 30 pg/mL $\pm 20\%$ (± 6 pg/mL)

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

NB : la LOQ du kit est de 6.25 pg/mL en puits, soit 12.5 pg/mL par échantillon. Un fichier de type tableur pouvant être utilisé pour le traitement des données est disponible sur le site : www.aguettant.fr/kit-anthrax

Interprétation des résultats

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

Effectuer un second test si le résultat est incohérent avec les symptômes du patient ou si un doute persiste.

Une suspicion d'infection à *Bacillus anthracis* doit être signalée sans délai au centre national de référence ou tout autre autorité de santé.

Le diagnostic de l'anthrax doit être fondé sur l'historique, les signes, les symptômes, la probabilité d'exposition, des résultats de laboratoire complémentaires et les procédures de confirmation définies par le centre national de référence ou tout autre autorité de santé.

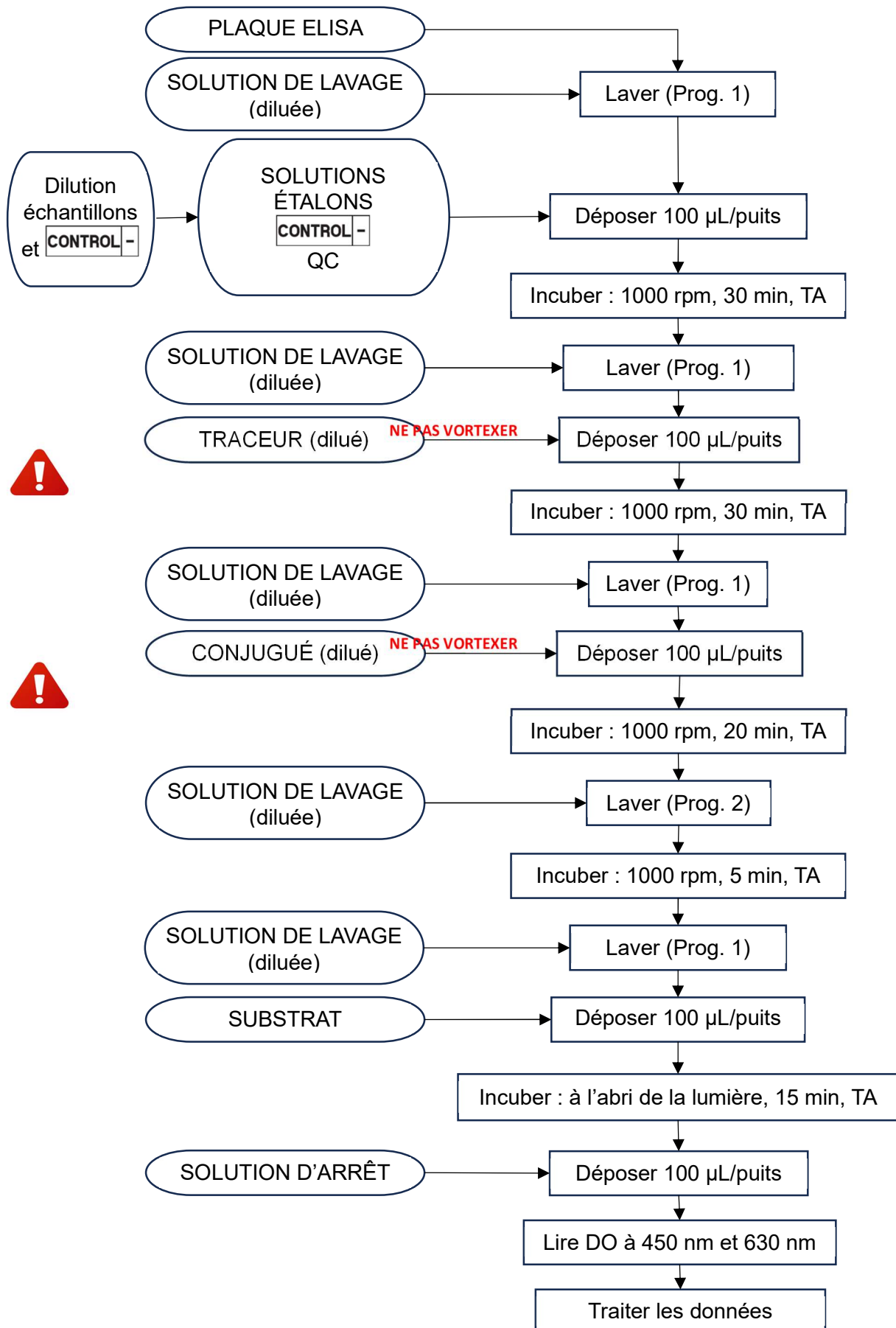
La concentration de facteur létal dans le sang provenant d'individus présentant une infection précoce peut être insuffisante pour être détectée. Un résultat négatif ne présume donc pas d'une absence d'infection et ne doit pas être utilisé comme seul élément pour le diagnostic, le traitement ou tout autre décision relative à la prise en charge du patient.

NOTICE D'UTILISATION

eZYDIAG® ELISA Anthrax

Protocole

résumé



NOTICE D'UTILISATION

eZYDIAG® ELISA Anthrax

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.

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 patients peut potentiellement impacter les immunodosages utilisant la technologie Streptavidine - Biotine.

Contact





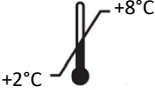

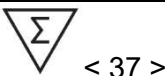

Fabricant	LABORATOIRE AGUETTANT 1 rue Alexander Fleming 69007 LYON FRANCE
Assistance technique	www.aguettant.fr +33 4 78 61 51 41
Information médicale	infoscientifique@aguettant.fr
Réclamations	reclamations@aguettant.fr
Incidents	materiovigilanceAGT@aguettant.fr

Tout incident grave survenu en lien avec le produit doit faire l'objet d'une notification au fabricant et à l'autorité compétente de l'État membre dans lequel l'utilisateur et/ou le patient est établi.

NOTICE D'UTILISATION

eZYDIAG® ELISA Anthrax

Symbole

Symbole	Définition
	Fabricant
	Date limite d'utilisation
LOT	Code de lot
	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
 www.aguettant.fr/kit-anthrax	Consulter les instructions d'utilisation électroniques
	Contenu suffisant pour < 37 > essais
	Contient un matériau biologique d'origine animale
CONTROL -	Contrôle négatif
RUO	Destiné à la recherche uniquement.

Termes et abréviations

CAL	Étalon
CI	Intervalle de confiance
DO	Densité optique
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
HRP	Horseradish peroxidase
LF	Lethal factor = Facteur létal de l'anthrax
LOD	Limite de détection
LOQ	Limite de quantification
QC	Contrôle Qualité
REF	Référence
RPM	Rotation par minute
S	Sample = Echantillon
TA	Température ambiante
TMB	3,3',5,5'-Tétraméthylbenzidine
TN	Témoin négatif