

**VIROTECH Tetanus IgG ELISA
(Tetanus IgG ELISA)**

Référence: EC124.00

Code couleur : blanc/transparent

POUR DIAGNOSTIC IN-VITRO UNIQUEMENT

**VIROTECH Diagnostics GmbH
Löwenplatz 5
D- 65428 Rüsselsheim**

**Tél. : +49-6142-6909-0
Télécopie : +49-6142-966613
<http://www.virotechdiagnostics.com>**



Sommaire

1. Usage prévu.....	3
2. Principe du test	3
3. Contenu (Kit de test IgG).....	3
4. Stockage et conservation du kit et des réactifs prêts à l'emploi	3
5. Mesures de précaution et mises en garde	4
6. Matériel et produits supplémentaires nécessaires (non livrés avec le produit)	4
7. Réalisation du test	4
7.1 Echantillons	4
7.2 Préparation des réactifs	4
7.3 Réalisation du test ELISA VIROTECH	5
7.4 Utilisation de dispositifs de traitement automatisé des tests ELISA	5
8. Interprétation du test	5
8.1 Contrôle du bon fonctionnement du test.....	5
8.2 Evaluation.....	5
8.3 Interprétation.....	6
8.4 Limites du test.....	7
9. Evaluation de test IgG avec méthode à 4 paramètres.....	7
9.1 Contrôle de fonctionnement du test.....	7
9.2 Conversion des résultats quantitatifs en unités internationales par millilitre (IU/ml)	8
10. Littérature	8
11. Schéma du déroulement du test	9

1. Usage prévu

Ce test ELISA est destiné à la détection quantitative d'anticorps IgG anti-anatoxine tétanique en vue de la surveillance du succès du vaccin et de la détermination de l'état vaccinal.

2. Principe du test

L'anticorps recherché dans le sérum humain forme un immunocomplexe avec l'antigène coaté sur la plaque. Les immunoglobulines non fixées sont éliminées lavage. Le conjugué enzymatique se fixe à cet immunocomplexe. Les immunoglobulines non fixées sont à leur tour éliminées par lavage. Après l'ajout de substrat TMB en solution, l'activité enzymatique (peroxydase) engendre l'apparition d'un colorant bleu qui tourne au jaune lorsque l'on y ajoute la solution d'arrêt.

3. Contenu (Kit de test IgG)

1. **Une microplaque** composée de 96 puits détachables à revêtement antigénique, lyophilisée
2. **Tampon de dilution PBS (bleu, prêt à l'emploi) 2 x 50 ml**, pH 7,2, avec conservateur et Tween 20
3. **Solution de lavage PBS (concentrée au facteur 20) 50 ml**, pH 7,2, avec conservateur et Tween 20
4. Sérums à anticorps IgG pour la courbe standard, six flacons de 2 ml chacun, prêts à l'emploi, sérum humain avec conservateur ; 0,001 UI/ml, 0,002 UI/ml, 0,005 UI/ml, 0,01 UI/ml, 0,02 UI/ml, 0,05 UI/ml (UI = unités internationales).
5. **Contrôles IgG hautement positifs, 2 ml**, sérum humain avec conservateur, prêts à l'emploi
6. **Contrôles IgG faiblement positifs, 2 ml**, sérum humain avec conservateur, prêts à l'emploi
7. **Conjugué IgG (anti-humain), 11 ml**, conjugué à la peroxydase de raifort (chèvre ou mouton) avec stabilisants des protéines et conservateur en tampon tris, prêt à l'emploi
8. **Substrat de tétraméthylbenzidine en solution (TBM 3,3',5,5'), 11 ml**, prêt à l'emploi
9. **Solution d'arrêt au citrate, 6 ml**, contient un mélange à l'acide.

4. Stockage et conservation du kit et des réactifs prêts à l'emploi

Stocker le kit à une température comprise entre 2 et 8 °C. La durée de conservation des différents composants est indiquée sur leur étiquette ; la durée de conservation du kit est indiquée sur le certificat de contrôle-qualité.

1. Après avoir détaché les puits individuels nécessaires, remettre les puits restants dans un sachet fermé hermétiquement et contenant un dessiccateur, puis stocker ce sachet à une température comprise entre 2 et 8 °C. Stocker à nouveau les réactifs à une température comprise entre 2 et 8 °C immédiatement après leur utilisation.
2. Le conjugué prêt à l'emploi et le substrat TMB en solution sont photosensibles et doivent donc être conservés à l'abri de toute lumière. Si la solution de substrat se colore suite à une exposition à la lumière, jeter la solution.
3. Prélever uniquement la quantité de conjugué prêt à l'emploi ou de TMB nécessaire à la réalisation du test. Si un excédent de conjugué ou de TMB a été prélevé, ne pas le réinjecter dans son récipient, mais l'éliminer.

Matériel	Etat	Conservation	Date de péremption
Echantillons d'essai	Dilué	+2 jusqu'à +8° C	max. 6 h
	Non dilué	+2 jusqu'à +8° C	1 semaine
Contrôles	Après ouverture	+2 jusqu'à +8° C	3 mois
Plaque de microtitration	Après ouverture	+2 jusqu'à +8° C (conservation dans le sachet fourni avec un sachet d'agent de dessiccation)	3 mois
Absorbant facteur rhumatoïde	Après ouverture	+2 jusqu'à +8° C	3 mois
	Dilué	+2 jusqu'à +8° C	1 semaine
Conjugué	Après ouverture	+2 jusqu'à +8° C (protégé contre la lumière)	3 mois
Tétraméthylbenzidine (TMB)	Après ouverture	+2 jusqu'à +8° C (protégé contre la lumière)	3 mois
Solution d'arrêt	Après ouverture	+2 jusqu'à +8° C	3 mois
Solution de lavage	Après ouverture	+2 jusqu'à +8° C	3 mois
	Dilué final (prêt à l'emploi)	+2 jusqu'à +25° C	4 semaines

5. Mesures de précaution et mises en garde

1. Les sérums de contrôle et les sérums standard utilisés ont réagi négativement aux tests de détection des anticorps du HIV1, du HIV2, de l'hépatite C ainsi que de l'antigène HBs. Toutefois, tous les échantillons, les échantillons dilués, les sérums standard, les contrôles, les conjugués et la microplaque doivent être considérés comme potentiellement infectieux et manipulés comme tels. Les dispositions légales respectives en vigueur pour les laboratoires doivent être appliquées.
2. Les composants contenant des conservateurs, la solution d'arrêt au citrate et la tétraméthylbenzidine (TBM), ont un effet irritant sur la peau, les yeux et les muqueuses. En cas de contact, rincer immédiatement les parties du corps touchées à l'eau courante et consulter éventuellement un médecin.
3. Eliminer le matériel et les produits utilisés dans le respect des directives nationales en vigueur.

6. Matériel et produits supplémentaires nécessaires (non livrés avec le produit)

1. Eau distillée/déminéralisée
2. Pipette à plusieurs conduits 50 µl, 100 µl
3. Micropipettes : 10 µl, 100 µl, 1000 µl
4. Tubes à essai
5. Chiffons en cellulose
6. Couvercles pour les plaques ELISA
7. Poubelle pour les déchets infectieux
8. Dispositif de lavage manuel pour test ELISA, ou dispositif de lavage automatique des plaques de microtitrage
9. Spectrophotomètre pour plaques de microtitration avec filtre 450/620 nm (longueur d'onde de référence 620-690nm)
10. Incubateur

7. Réalisation du test

Le respect scrupuleux des consignes de travail de VIROTECH Diagnostics est le préalable à obtenir des résultats corrects.

7.1 Echantillons

Le sérum ou le plasma (en l'occurrence, le type d'anticoagulants n'est pas important) peut être utilisé comme matériel à analyser, même lorsque seul le sérum est mentionné dans la notice.

Les échantillons des patients peuvent être conservés pendant 1 semaine à 2-8° C.

Les échantillons doivent être préparés directement avant commencer le test; les sérums dilués se conservent pendant une durée maximale de 6 heures lorsqu'ils sont stockés à une température comprise entre 2 et 8 °C.

Lorsque les sérums doivent être conservés pendant une période prolongée, ceux-ci doivent être congelés. Il est déconseillé de décongeler les sérums plusieurs fois.

1. N'utiliser que des sérums frais non inactivés.
2. Ne pas utiliser d'échantillons hyperlipémiques, hémolytiques ou contaminés par des bactéries, ni de sérums à l'aspect trouble (résultats positifs/négatifs faussés).

7.2 Préparation des réactifs

Le système de diagnostic VIROTECH Diagnostics offre une grande flexibilité, grâce à la possibilité d'utiliser le tampon de dilution et de lavage, le TMP, la solution d'arrêt au citrate ainsi que le conjugué pour tous les paramètres et les lots. **Les sérums standard ainsi que les contrôles faiblement et hautement positifs sont exclusivement destinés à être utilisés avec le kit utilisé.** Ne jamais les utiliser avec d'autres lots.

1. Régler l'incubateur à 37 °C et vérifier que cette température règne bien à l'intérieur de celui-ci avant de commencer l'incubation.
2. Amener tous les réactifs à la température ambiante ; ouvrir ensuite l'emballage avec les barettes.
3. Bien agiter les composants liquides avant leur utilisation.
4. Compléter le concentré de solution de lavage avec de l'eau distillée / déminéralisée pour obtenir 1 litre (au cas où le concentré formerait éventuellement des cristaux, portez-le à température ambiante avant de le diluer et agitez bien avant utilisation).

7.3 Réalisation du test ELISA VIROTECH

1. Pour chaque série, déposer 100 µl du tampon de dilution (valeur à blanc) prêt à l'emploi, du sérum standard prêt à l'emploi et du sérum de contrôle prêt à l'emploi, ainsi que des sérums dilués des patients. Nous recommandons de déposer en double les valeurs à blanc, sérums standards, contrôles et sérums patients. Une double approche est impérative en cas d'utilisation du standard de 0,01 UI/ml à titre de contrôle de calibrage pour l'analyse du test à l'aide de la méthode à 4 paramètres. Dilution de travail pour les sérums patients : 1+100 ; par exemple : 10 µl de sérum + 1 ml de tampon de dilution.
2. Après la distribution, incuber la plaque à 37 °C pendant 30 minutes (avec couvercle).
3. Mettre fin à la période d'incubation par quatre lavages effectués chacun à l'aide de 350 à 400 µl de solution de lavage pour chaque puits. Ne pas laisser de solution de lavage dans les puits, mais en éliminer les derniers restes en tapotant la plaque sur une protection en cellulose étendue à cet effet sur le plan de travail.
4. Déposer 100 µl de conjugué prêt à l'emploi dans tous les puits.
5. Incubation des conjugués : 30 minutes à 37 °C (avec couvercle).
6. Mettre fin à l'incubation du conjugué en effectuant quatre lavages (voir le point 3).
7. Déposer 100 µl de substrat TMB dans chacun des puits.
8. Incubation de la solution de substrat : 30 minutes à 37 °C (avec couvercle, placer dans un endroit sombre).
9. Arrêt de la réaction : déposer 50 µl de solution d'arrêt dans chacun des puits. Agiter la plaque avec précaution, jusqu'à ce que les liquides se soient complètement mélangés et qu'ils présentent une couleur jaune uniforme.
10. Mesurer les extinctions à 450/620 nm (longueur d'onde de référence 620-690nm). Régler le photomètre de façon à ce que la valeur à blanc mesurée soit déduite de toutes les autres extinctions. La mesure photométrique doit être réalisée en l'espace d'une heure à partir de l'ajout de la solution d'arrêt.

Schéma du déroulement du test, voir dernière page

7.4 Utilisation de dispositifs de traitement automatisé des tests ELISA

Tous les tests ELISA de VIROTECH Diagnostics peuvent être effectués à l'aide de dispositifs de traitement automatisé des tests ELISA. L'utilisateur s'engage à procéder à une validation de l'appareil à intervalles réguliers.

VIROTECH Diagnostics recommande la procédure suivante :

1. Lors de la mise à disposition de l'appareil ou lorsque des réparations importantes ont été effectuées sur le dispositif de traitement automatisé des tests ELISA, VIROTECH Diagnostics recommande de réaliser la validation du dispositif en se conformant aux directives du fabricant de l'appareil.
2. Il est recommandé de contrôler ensuite le dispositif de traitement automatisé des tests ELISA à l'aide du kit de validation (EC250.00). Ce contrôle régulier à l'aide du kit de validation doit être effectué au moins une fois par trimestre.
3. Lors de chaque cycle d'essai, les critères de validation du certificat de contrôle-qualité du produit doivent impérativement être remplis.

Cette manière de procéder assure le fonctionnement irréprochable de votre processeur ELISA et sert de plus à la garantie de qualité du laboratoire.

8. Interprétation du test

8.1 Contrôle du bon fonctionnement du test

- a) Valeurs de DO
La valeur de DO de la valeur à blanc doit être <0,15.
Les valeurs de DO du standard inférieur (0,001 UI/ml), doivent être supérieures à la valeur de DO indiquée dans le certificat de contrôle qualité et les valeurs de DO du standard supérieur (0,050 UI/ml) doivent être inférieures à la valeur de DO indiquée dans le certificat de contrôle qualité.
- b) Les concentrations déterminées pour le contrôle faiblement positif et pour le contrôle hautement positif doivent se trouver dans la plage indiquée sur le certificat de contrôle-qualité (UI/ml).
- c) Le test doit être répété si les exigences (DO / UI/ml) ne sont pas satisfaites.

8.2 Evaluation

A l'aide des standards fournis, créer une courbe standard sur le papier millimétré semi-logarithmique fourni. Cette courbe est destinée au calcul du taux d'anticorps IgG anti-anatoxine antitétanique dans le sérum. Pour cela, inscrire les valeurs moyennes des extinctions des sérums standard fournis en double sur l'axe des ordonnées (axe des Y) et inscrire les concentrations

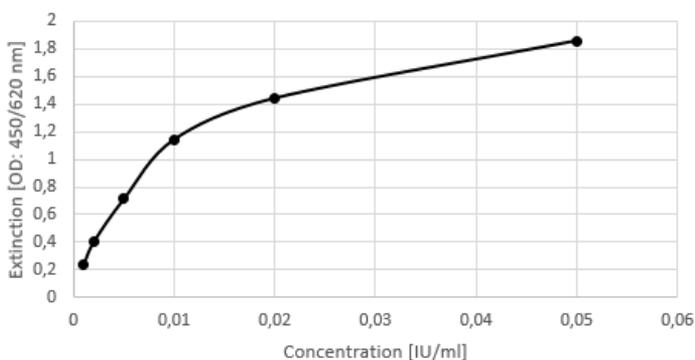
(UI/ml des standards prêts à l'emploi) sur l'axe des abscisses (axe des X). Tenir compte du fait que les sérums des patients sont dilués à 1:100 pour la réalisation du test. C'est pourquoi le résultat lu sur le diagramme doit être multiplié par 100. Pour l'établissement de la courbe standard, on peut choisir un calcul de la courbe point à point ou un calcul de la courbe à quatre paramètres.

Respecter les points suivant :

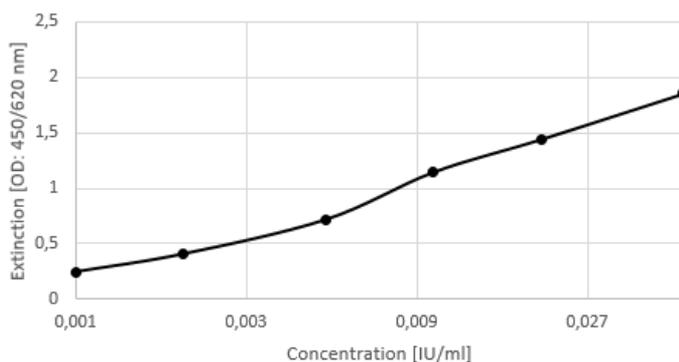
Les échantillons dont les concentrations calculées en UI/ml sont inférieures à 0,1 UI/ml peuvent être retestés en recourant à une dilution 1:10. Les différences au niveau de la dilution doivent être prises en compte lors de l'évaluation.

Les échantillons dont les valeurs d'extinction sont plus importantes que le standard de 0,05 UI/ml devront être dilués à un facteur plus élevé (par exemple : 1:200, 1:400 etc.) avant de pouvoir être utilisés dans le test. Pour les valeurs DO > 2,00, la précision de mesure décroît à mesure que la densité optique augmente. De ce fait, il est recommandé d'utiliser les sérums qui visent des valeurs DO > 2,00 avec un facteur de dilution de 1:100 en employant un facteur de dilution supérieur lors des tests, p. ex. 1:200, 1:400 etc. Il faudra tenir compte des écarts de dilutions lors de l'interprétation.

Exemple d'une courbe standard du tétanos - lin/lin



Exemple d'une courbe standard du tétanos - lin/log



8.3 Interprétation

Les concentrations en anti-anatoxine tétanique sont exprimées en unités internationales (UI/ml), comme cela est prescrit par les directives de l'OMS. Un taux d'anticorps IgG anti-anatoxine tétanique supérieur à 0,1 UI/ml est considéré comme étant une protection immunitaire (2,11) ou comme protection immunitaire sûre (9,10). Les vaccinations de rappel ne sont pas indiquées en cas de concentrations d'anticorps > 0,5 UI/ml (10). Nous souhaiterions attirer votre attention sur les vaccinations de rappel suivantes. Elles sont fabriquées conformément aux recommandations du groupe de travail sur l'immunoprophylaxie (13) :

UI/ml	Interprétation et mesures à prendre
< 0,01	- Aucune protection par la vaccination - Selon l'anamnèse, effectuer une vaccination de base ou de rappel - Contrôle sérologique après 4 à 8 semaines
0,01 – 0,1	- La protection par la vaccination n'est pas garantie - Vaccination de rappel nécessaire - Contrôle sérologique après 4 à 8 semaines
0,11 – 0,5	- La protection par la vaccination est garantie à court terme - Vaccination de rappel recommandée - La vaccination de rappel entraîne une protection à long terme
0,51 – 1,0	- La protection par la vaccination est garantie - Vaccination de rappel ou contrôle sérologique après 3 ans recommandé(e) - Remarque : en cas de concentrations d'anticorps > 0,5 UI/ml, les vaccinations peuvent provoquer des réactions indésirables
> 1,0 – 5,0	- La protection par la vaccination est garantie à long terme - Vaccination de rappel ou contrôle sérologique après 5 ans recommandé(e)
> 5,0 – 10,0	- La protection par la vaccination est garantie à long terme - Vaccination de rappel ou contrôle sérologique après 8 ans recommandé(e)
> 10	- La protection par la vaccination est garantie à long terme - Vaccination de rappel ou contrôle sérologique après 10 ans recommandé(e)

8.4 Limites du test

1. L'interprétation des résultats sérologiques doit toujours inclure le tableau clinique, les données épidémiologiques et les éventuels autres résultats d'analyses existants.
2. L'ELISA VIROTECH de détection des anticorps anti-anatoxine tétanique n'est pas adapté à l'établissement d'un diagnostic de laboratoire.
3. Pour interpréter le titre d'anti-anatoxine, il faudra impérativement tenir compte des données mentionnées dans le carnet de vaccination ou des informations sur la dernière vaccination antitétanique (7).
4. Il est déconseillé d'interpréter les titres de d'anti-anatoxine inférieurs à 0,1 UI/ml, car ceux-ci se trouvent en dessous de la limite de sensibilité techniquement reproductible lors de l'utilisation d'un système de test ELISA. Au niveau individuel, il est donc conseillé de déterminer les antécédents vaccinaux en vue de décider si l'on doit réaliser une primo-immunisation ou un vaccin de rappel.

9. Evaluation de test IgG avec méthode à 4 paramètres

Il est possible de réaliser une analyse quantitative avec le VIROTECH antitétaniques IgG ELISA sur base de la méthode à 4 paramètres. Le standard 0,01 IU/ml est utilisé à cet égard comme contrôle de calibrage. Le contrôle de calibrage compense les variations dues à l'exécution du test. Les valeurs moyennes des valeurs DO sont utilisées pour le calcul.

9.1 Contrôle de fonctionnement du test

a) Valeurs DO

La valeur DO de la valeur à blanc doit être <0,15.

La valeur DO du contrôle de calibrage doit se situer dans la zone de validité indiquée dans le certificat de contrôle de validité.

b) IU/ml

Les concentrations en anticorps IgG antitétaniques (IU/ml) du contrôle faiblement positif et du contrôle hautement positif doivent se situer dans l'intervalle de validité indiquée dans le certificat de contrôle de qualité.

Si les exigences ne sont pas remplies (valeurs DO, IU/ml), le test doit être recommencé.

9.2 Conversion des résultats quantitatifs en unités internationales par millilitre (IU/ml)

L'extinction de la valeur à blanc (450/620nm) doit être déduite de l'ensemble des extinctions.

La quantification des sérums s'effectue après conversion des résultats dans l'unité internationale. La courbe standard est déterminée suite à des tests approfondis par régression non linéaire et décrite par la formule mathématique suivante (12)

$$IU/ml = \exp(-(\ln((D-A)/((DO \text{ corr})-A)-1)-B)/C)$$

à savoir :

A:	DO attendue pour une concentration d'anticorps IgG antitétaniques de 0
B :	facteur de croissance
C :	point d'inflexion
D:	DO attendue pour une concentration immense d'anticorps IgG antitétaniques
DO corr	DO corrigée du sérum du patient

La DO mesurée du sérum du patient est corrigée sur base du contrôle de calibrage pour prendre en compte les variations au cours de la réalisation du test.

$$DO \text{ corr.} = \text{sérum du patient DO} * \frac{\text{Indication DO contrôle de calibrage}}{\text{DO contrôle de calibrage mesuré}}$$

Les valeurs des paramètres A, B, C et D ainsi que l'indication pour la DO du contrôle de calibrage figurent dans le certificat. Six paires de valeur standard – qui décrivent également la courbe standard – sont définies de manière complémentaire pour les logiciels d'exploitation incompatibles avec la présente méthode de calcul.

La plage quantifiable se situe entre 0,01 UI/ml et 15 UI/ml.

Détermination de l'IU/ml

La détermination de l'IU/ml peut s'effectuer à l'aide d'un logiciel pouvant être mis à disposition par VIROTECH. Il est également possible d'obtenir un fichier modèle pour des feuilles de calcul simples. Les concentrations calculées indiquent toujours les concentrations réelles du sérum non dilué, si celui-ci a été dilué selon un ratio de 1:100 lors du test. Pour analyser un sérum dilué selon un autre ratio, il faut convertir les concentrations en conséquence.

10. Littérature

1. Epidemiologisches Bulletin, 27/2002
2. Stark K, Schonfeld C, Barg J, Molz B, Vornwald A, Bienzle U, Seroprevalence and determinants of diphtheria, tetanus and poliomyelitis antibodies among adults in Berlin, Germany, Vaccine 17(7-8): 844-50 (1999)
3. Pietsch M et.al. , Influence of information campaigns on the vaccination immunity among the population of a small town area – seroepidemiological results of the „Wittlich Vaccination Study“; Gesundheitswesen 64 (1): 60-4 (2002)
4. Epidemiologisches Bulletin, 7/2002
5. Epidemiologisches Bulletin, 19/1999
6. Epidemiologisches Bulletin, 40/1998
7. Epidemiologisches Bulletin, 28/2001
8. Epidemiologisches Bulletin, 23/1999
9. Werner, G. T., et. al., Tetanusimmunität im Alter, Zeitschrift für Gerontologie, 16, 130-133 (1983)
10. Müller, H. E. et al., Tetanus-Schutzimpfung-Indikation und Kontraindikation, Dtsch. med. Wsch. 113 (1988), 1326-1328
11. Schröder, J. P. et al., Vermeidung hyperergischer Reaktionen bei Tetanus-Impfungen durch Einsatz eines wissensbasierten Systems bei Fragen der Impfnotwendigkeit, Klin. Lab. 1992, 38:229-233
12. Pliakytis et al., Comparisons of Standard Curve-Fitting Methods To Quantitate Neisseria meningitidis Group A Polysaccharide Antibody Levels by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, 1991, J Clin Microbiol, 29, p1439-1446
13. Arbeitskreis Immunprophylaxe, Koordinator M. Pietsch: Infektionsschutz durch Impfprophylaxe, Storck Medien & Verlag KG, Bruchsal 1999

Préparation des échantillons patients et de la solution de lavage

▼ **Solution de lavage :** ajouter de l'eau distillée/déminéralisée au concentré pour obtenir un volume total d'un litre.

▼ **Dilution du Échantillons IgG à 1:101**

Exemple :

10 µl de sérum/plasma + 1000 µl de tampon de dilution
(le tampon de dilution est prêt à l'emploi)

Réalisation du test

Incubation des échantillons	30 minutes à 37 °C	100 µl d'échantillons patients blanc (tampon de dilution), standards et contrôles
↓		
Laver 4 fois		400 µl de solution de lavage bien tapoter
↓		
Incubation du conjugué	30 minutes à 37 °C	100 µl de conjugué IgG
↓		
Laver 4 fois		400 µl de solution de lavage bien tapoter
↓		
Incubation du substrat	30 minutes à 37 °C	100 µl de substrat
↓		
Arrêt		50 µl de solution d'arrêt agiter avec précaution
↓		
Mesure de l'extinction		photomètre à 450/620 nm (longueur d'onde de référence 620-690nm)