

VIROTECH Bordetella pertussis Toxin (PT) IgM ELISA (B. pertussis PT IgM ELISA)

Référence: EC215M00

Code couleur : bleu métallisé/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>**



Freigabedatum: 20.03.2020 08:16

REV 12 / VIROTECH B. pertussis PT IgM ELISA FR

Sommaire

1. Usage prévu.....	3
2. Principe du test	3
3. Contenu (Kit de test IgM)	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 Calcul des unités VIROTECH (VE)	6
8.3 Schéma d'interprétation des IgM.....	6
8.4 Limites du test.....	6
9. Littérature	6
10. Schéma du déroulement du test	7

1. Usage prévu

Ce kit ELISA permet la détection qualitative et semi-quantitative des anticorps IgM dans le sérum humain. Il permet de mettre en évidence la présence d'une infection aiguë ou d'une infection ayant eu lieu depuis peu.

2. Principe du test

L'anticorps recherché dans le sérum humain forme un immunocomplexe avec l'antigène coâté sur la plaque. Les immunoglobulines non fixées sont éliminées par 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 IgM)

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. **Contrôle négatif des IgM, 2000 µl**, sérum humain avec stabilisants des protéines et conservateur, prêt à l'emploi
5. **Contrôle cut-off des IgM, 2000 µl**, sérum humain avec stabilisants des protéines et conservateur, prêt à l'emploi
6. **Contrôle positif des IgM, 2000 µl**, sérum humain avec stabilisants des protéines et conservateur, prêt à l'emploi
7. **Conjugué IgM (anti-humain), 11 ml**, conjugué à la peroxydase de raifort (chèvre ou mouton) avec sérum fœtal de veau (FCS) 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	Non dilué, 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 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 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 doivent être préparé directement avant commencer le test.

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 contrôles prêts à l'emploi (contrôle positif, contrôle valeur-seuil, contrôle négatif) sont spécifiques des paramètres et doivent être utilisés exclusivement avec le lot de lames indiqué dans le certificat de contrôle de qualité.

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).
5. Des titrages d'IgG ou des facteurs rhumatismaux élevés peuvent gêner la mise en évidence d'anticorps IgM ou engendrer l'obtention de résultats positifs ou négatifs erronés. **Les sérums doivent être prétraités avec le RF-SorboTech** (agent d'adsorption VIROTECH). Dans le cas de contrôles des IgM, l'adsorption préliminaire n'est pas nécessaire.

7.3 Réalisation du test ELISA VIROTECH

1. Pour chaque série, pipeter 100 µl de tampon de dilution (blanc) prêt à l'emploi de contrôle négatif, de contrôle cut-off et de contrôle positif des IgM, ainsi que des sérums dilués des patients. Nous recommandons d'opter pour une double distribution (blanc, contrôles et sérums patients) : pour le contrôle cut-off, la double distribution est absolument indispensable. Dilution de travail pour les sérums patients : 1+100 ; par ex. 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

Les contrôles prêts à l'emploi sont destinés à une détermination semi-quantitative des anticorps IgM dont la concentration est indiquée en unités VIROTECH (VE). Les fluctuations dues à la réalisation du test sont compensées par la méthode de calcul, ce qui permet d'obtenir une reproductibilité élevée. Pour le calcul des unités VIROTECH (VE), utiliser les moyennes des valeurs de DO.

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 des contrôles négatifs doivent être inférieures aux valeurs de DO indiquées dans le certificat de contrôle-qualité, les valeurs de DO des contrôles positifs et des contrôles cut-off doivent être supérieures aux valeurs de DO indiquées dans le certificat de contrôle-qualité.

b) Unités VIROTECH (VE)

Les unités VIROTECH (VE) du contrôle cut-off sont fixées à 10 VE. Le nombre de VE calculées pour le contrôle positif doit être compris dans la plage indiquée dans le certificat de contrôle-qualité.

Si les exigences (concernant les valeurs de DO et les unités VIROTECH) ne sont pas remplies, répéter le test.

8.2 Calcul des unités VIROTECH (VE)

L'extinction de la valeur à blanc (450/620 nm) doit impérativement être soustraite de toutes les extinctions.

$$\begin{aligned} \text{VE}_{(\text{contrôle positif})} &= \frac{\text{DO}_{(\text{contrôle positif})}}{\text{DO}_{(\text{contrôle cut - off})}} \times 10 \\ \text{VE}_{(\text{sérum patient})} &= \frac{\text{DO}_{(\text{sérum patient})}}{\text{DO}_{(\text{contrôle cut - off})}} \times 10 \end{aligned}$$

8.3 Schéma d'interprétation des IgM

Résultat (VE)	Évaluation
< 9,0	négatif
9,0 à 11,0	plage limite
> 11,0	positif

1. L'organisme ne produit pas toujours d'anticorps IgM, ce qui fait de ces derniers des marqueurs moins fiables que les anticorps IgG dans la détection d'une infection à *Bordetella pertussis*.
2. Si le nombre d'unités VIROTECH (VE) mesurées pour l'échantillon est supérieur à la limite supérieure de la plage limite, les échantillons seront considérés comme positifs.
3. Si le nombre d'unités VIROTECH (VE) mesurées est compris dans la plage limite indiquée, la concentration en anticorps n'est pas significativement élevée; les échantillons seront alors considérés comme étant à la limite. Pour qu'une infection soit mise en évidence de façon sûre, il est nécessaire de déterminer la teneur en anticorps des deux échantillons sériques. Un échantillon sérique doit être testé directement après le début de l'infection, un deuxième échantillon cinq à dix jours plus tard (sérum de convalescent). La concentration des deux échantillons doit être déterminée de façon parallèle. Il n'est pas possible d'établir de diagnostic correct sur la base de l'évaluation d'un seul échantillon sérique.
4. Si les valeurs mesurées sont inférieures à la plage limite définie, l'échantillon ne contient pas d'anticorps spécifiques aux antigènes en quantité décelable. Les échantillons seront alors considérés comme étant négatifs.
5. Si un résultat est compris dans la plage limite pour les IgM et si la valeur obtenue est <18 unités VIROTECH (VE) pour les IgG, il est nécessaire d'analyser un deuxième échantillon sérique pour clarifier si l'on est en présence ou non d'une infection aiguë.

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.

9. Littérature

1. Medizinische Mikrobiologie Hahn, Falke, Klein, Springer-Verlag 1991, p.361 - 363
2. Wiersbitzky S. Pertussis Kostengünstige Prävention zuwenig genutzt Therapiewoche 25 (1995), p.1485 - 1486
3. Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie, H. Brandis, W. Köhler, H.J. Eggers, G. Pulverer, 7. Auflage, p. 483
4. Mastrantonio et al., 1997, *Bordetella parapertussis* infections., Dev Biol Stand., (89):255-259
5. Mastrantonio et al., 1997, Antibody kinetics and long-term sero-prevalence in the Italian clinical trial of acellular pertussis vaccines, Dev Biol Stand., (89): 275-278
6. Wirsing von König et al., 1999, Evaluation of a single-Sample Serological Technique for Diagnosing Pertussis in Unvaccinated Children, Eur J Clin Microbiol Infect Dis, (18)341-345
7. De Melker, H.E. et al, Specificity and sensitivity of high levels of immunoglobulin G against pertussis toxin in a single serum sample for diagnosis of infection with *Bordetella pertussis*. J. Clin. Microbiol. 2000, 38(2), 800-806
8. Swidsinski, S. Diagnostische Bibliothek, Nr. 47, April 1997
9. Bruce D. Meade, Chrisanna M. Mink, and Charles R. Manclark. 1994. Serodiagnosis of Pertussis, Center for Biologics and Research, Food and Drug Administration, Bethesda, Maryland 20892.
10. B. Meijer, Oktober 2002, Numerical Comparison of 4 Pertussis Toxin IgG-ELISAs, nicht publiziert, Krankenhaus Groningen, NL

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 IgM à 1:101**

Adsorption du facteur rhumatoïde avec RF-SorboTech

Exemple :

Incuber 5 µl de sérum/plasma + 450 µl de tampon de dilution +
1 goutte RF-SorboTech pendant 15 minutes

Réalisation du test

Incubation des échantillons	30 minutes à 37 °C	100 µl d'échantillons patients blanc (tampon de dilution) 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 IgM
↓		
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)