



RIDASCREEN[®] Leishmania IgG
Réf. K7321



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, 64297 Darmstadt, Allemagne
Téléphone : +49 (0) 61 51 81 02-0 / Fax : +49 (0) 61 51 81 02-20



1. Application

Pour usage diagnostique *in vitro*. Le test RIDASCREEN® Leishmania IgG est un test immunoenzymatique destiné à la détermination qualitative des anticorps IgG spécifiques contre *Leishmania infantum* dans le sérum humain.

Il devrait être utilisé à des fins de confirmation en cas de suspicion de leishmaniose.

2. Résumé et explication du test

Après une infection par *Leishmania*, des anticorps spécifiques de l'agent pathogène sont produits à cause de la réponse du système immunitaire. Grâce aux tests immunologiques, il est possible de déterminer les anticorps dans le sérum.

La méthode de test utilisée et le choix de l'antigène spécifique adapté à l'agent pathogène ont une incidence importante sur la pertinence du test.

3. Principe du test

Une microplaque est revêtue d'un antigène recombiné purifié de *Leishmania infantum*. Les anticorps de l'échantillon du patient se lient à l'antigène et sont détectés pendant la deuxième phase d'incubation à l'aide d'anti-anticorps humains marqués par une enzyme (le conjugué). Le substrat incolore (peroxyde d'urée/TMB) est converti par l'enzyme en un produit final de couleur bleue. La réaction de l'enzyme est arrêtée en ajoutant de l'acide sulfurique et la couleur du mélange passe simultanément du bleu au jaune. La mesure finale est relevée sur un photomètre à 450 nm avec une longueur d'onde de référence ≥ 620 nm pendant 20 minutes après l'ajout d'une solution d'arrêt.

4. Contenu du paquet

Tableau 1 : Contenu du paquet (les réactifs fournis permettent de réaliser 96 tests)

			K7321 IgG
Plate	96 dét.	Microplaque, 12 barrettes à micropuits (sécables) sur support ; revêtue d'antigènes recombinants de <i>Leishmania infantum</i>	X
Diluent	100 ml	Tampon de dilution d'échantillon, solution de NaCl tamponnée au phosphate, prête à l'emploi	X
SeroWP	100 ml	Tampon de lavage, concentré 10 fois ; solution de NaCl tamponnée au Tris	X
Control IgG + <i>Bouchon rouge</i>	1,2 ml	Contrôle IgG positif, sérum humain, prêt à l'emploi	X
Control IgG - <i>Bouchon incolore</i>	1,2 ml	Contrôle IgG négatif, sérum humain, prêt à l'emploi	X
Control IgG co <i>Bouchon bleu</i>	2,5 ml	Contrôle de valeur seuil IgG, sérum humain, prêt à l'emploi	X
Conjugate <i>Bouchon orange</i>	12 ml	Conjugué anti-IgG humaine, prêt à l'emploi ; anti-IgG humaine conjuguée à de la peroxydase dans une solution protéique stabilisée	X
SeroSC	12 ml	Substrat H ₂ O ₂ /tétraméthylbenzidine ; prêt à l'emploi	X
Stop	12 ml	Réactif d'arrêt Acide sulfurique 0,5 M ; prêt à l'emploi	X

Informations sur les substances dangereuses selon les exigences d'étiquetage. Pour en savoir plus : Consulter les fiches de données de sécurité (FDS) ou les informations sur le produit sur www.r-biopharm.com.

5. Instructions de conservation des réactifs

La trousse de test doit être conservée entre 2 et 8 °C et elle peut être utilisée jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette. La durée de conservation du tampon de lavage dilué est de 4 semaines maximum à une température comprise entre 2 et 8 °C ou de 5 jours lorsqu'il est conservé à température ambiante (20 à 25 °C). Après la date de péremption, la qualité n'est plus garantie.

Le sachet en aluminium contenant la microplaque doit être ouvert sans arracher le joint d'étanchéité. Les barrettes à micropuits qui ne sont pas nécessaires doivent être conservées dans le sachet en aluminium. Les réactifs ne doivent pas être contaminés et le substrat incolore doit être protégé de toute exposition directe à la lumière.

6. Matériel nécessaire mais non fourni

6.1. Réactifs

- Eau distillée ou désionisée

6.2. Accessoires

- Tubes à essai
- Agitateur-mélangeur vortex
- Micropipettes d'une capacité de 10 à 100 µl et 100 à 1 000 µl
- Éprouvette graduée (1 000 ml)
- Chronomètre
- Laveur de microplaque ou pipette multicanaux
- Lecteur de microplaque (450 nm, longueur d'onde de référence \geq 620 nm)
- Papier filtre (serviettes de laboratoire)
- Conteneur de déchets contenant 0,5 % de solution d'hypochlorite

7. Mesures de précaution

Pour usage diagnostique *in vitro*.

Ce test ne doit être réalisé que par un personnel de laboratoire formé. Il convient de respecter les directives de travail dans les laboratoires médicaux. Suivre le manuel d'instructions pour la procédure de test. Ne pas pipeter les échantillons ou les réactifs à la bouche. Éviter tout contact avec une peau meurtrie ou les membranes muqueuses. Lors de la manipulation de réactifs ou d'échantillons, porter des vêtements de protection appropriés (gants adaptés, blouse, lunettes de protection) et se laver les mains à l'issue de la procédure de test. Ne pas fumer, manger, ni boire dans les zones où des échantillons ou des réactifs sont utilisés.

Pour en savoir plus, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) sur www.r-biopharm.com.

Après utilisation, tous les réactifs et matériaux utilisés doivent être éliminés de façon appropriée. Veuillez vous conformer aux règlements nationaux applicables concernant la mise au rebut.

Les sérums de contrôle de la trousse (contrôle positif, contrôle de valeur seuil et contrôle négatif) ont été testés négatifs pour les anticorps du VIH et du VHC, ainsi que pour l'antigène HBs. Cependant, ils doivent être traités comme s'ils étaient potentiellement infectieux et manipulés conformément aux règlements nationaux applicables en matière de sécurité, tout comme les échantillons de patients et tous les matériaux avec lesquels ils sont entrés en contact.

Après utilisation, tous les réactifs et matériaux utilisés doivent être éliminés de façon appropriée. Veuillez vous conformer aux règlements nationaux applicables concernant la mise au rebut.

8. Prélèvement et conservation des échantillons

Le test a été développé dans le but de tester des échantillons de sérum humain. Après prélèvement, le sang doit être séparé des caillots dès que possible pour éviter l'hémolyse. Les échantillons doivent être conservés dans un endroit frais ou congelés jusqu'à ce qu'ils soient soumis à un test. Éviter de congeler et décongeler les échantillons plusieurs fois et éviter absolument toute contamination microbienne. L'utilisation d'échantillons inactivés par la chaleur, lipémiques, hémolytiques, ictériques ou troubles risque de donner lieu à des résultats erronés.

Tableau 2 : Conservation des échantillons

Sérum non dilué		Sérum dilué
2 – 8 °C	-20 °C	2 – 8 °C
1 semaine	> 1 semaine	7 heures

9. Réalisation du test

9.1. Informations générales

Tous les réactifs et la microplaque doivent être ramenés à température ambiante (20 – 25 °C) avant utilisation. Les barrettes à micropuits ne doivent pas être retirées du sachet en aluminium avant d'avoir atteint la température ambiante. Les réactifs doivent être bien mélangés immédiatement avant leur utilisation. Après utilisation, la trousse doit immédiatement être conservée entre 2 et 8 °C.

Prélever uniquement le volume de réactifs nécessaire à la procédure de test. Ne pas remettre les réactifs dans les flacons pour éviter tout risque de contamination. Ne pas remettre les réactifs dans les flacons au risque d'entraîner une contamination.

Les barrettes à micropuits ne doivent être utilisées qu'une seule fois. Les réactifs et les barrettes à micropuits ne doivent pas être utilisés si l'emballage est endommagé ou si les flacons fuient.

Le tampon de lavage, le tampon de dilution de l'échantillon, le réactif d'arrêt et le substrat ne sont pas spécifiques au test ; ils peuvent aussi être utilisés avec d'autres tests RIDASCREEN® ELISA afin de déterminer les anticorps contre les parasites.

9.2. Préparation du tampon de lavage

Mélanger 1 volume de concentré de tampon de lavage **SeroWP** avec 9 volumes d'eau distillée. Pour ce faire, mettre 100 ml de concentré dans une éprouvette graduée de 1 000 ml et compléter la solution jusqu'à 1 000 ml avec de l'eau distillée. Les cristaux présents dans le concentré doivent être préalablement dissous à chaud dans un bain-marie à 37 °C. Le tampon dilué peut être utilisé pendant 4 semaines maximum à condition d'être conservé entre 2 et 8 °C ou pendant 5 jours lorsqu'il est conservé à température ambiante (20 à 25 °C).

9.3. Préparation des échantillons

Avant de commencer le test, diluer les échantillons de sérum avec le tampon de dilution de l'échantillon **Diluent** à 1:50.

Par ex. 10 µl de sérum + 490 µl de tampon de dilution

Remarque :

Le contrôle de valeur seuil, le contrôle négatif et le contrôle positif sont prêts à l'emploi et ne doivent PAS être dilués.

9.4. Première incubation

Après avoir inséré une quantité suffisante de puits dans le support, pipeter 100 µl de sérum dilué et de contrôle négatif **Control IgG | -** , valeur seuil **Control IgG | co** et contrôle positif **Control IgG | +** prêts à l'emploi dans chacun des puits correspondants et incuber à température ambiante (20 à 25 °C) pendant 15 minutes. Nous recommandons d'effectuer le contrôle de valeur seuil **Control | co** en double.

9.5. Lavage

Les puits doivent être vidés dans un conteneur de déchets contenant une solution d'hypochlorite à des fins de désinfection. Retourner ensuite la plaque sur du papier absorbant pour éliminer l'humidité résiduelle. Puis laver la plaque 5 fois systématiquement avec 300 µl de tampon de lavage. S'assurer que les puits sont complètement vidés en les tapotant après chaque lavage sur un morceau de papier absorbant inutilisé.

Lorsqu'un laveur de microplaques est utilisé, s'assurer qu'il est correctement réglé par rapport au type de plaque utilisé. Après lavage, retourner la plaque et la tapoter sur un papier absorbant propre pour éliminer l'humidité résiduelle.

9.6. Seconde incubation

Ajouter 100 µl du conjugué anti-IgG humaine **Conjugate** dans chaque puits. Ensuite, incuber la plaque à température ambiante (20 – 25 °C) pendant 15 minutes.

9.7. Lavage

Laver 5 fois conformément à la section 9.5.

9.8. Troisième incubation

Mettre 100 µl de substrat **SeroSC** dans chaque puits. Ensuite, incuber la plaque à température ambiante (20 – 25 °C) pendant 15 minutes. Puis arrêter la réaction en ajoutant 50 µl de réactif d'arrêt **Stop** dans chaque puits et effectuer les mesures à 450/620 nm pendant 20 minutes.

10. Contrôle qualité – signes d’instabilité ou de détérioration

À des fins de contrôle qualité, le contrôle négatif, le contrôle de valeur seuil et le contrôle positif doivent être utilisés à chaque exécution du test. Le contrôle de valeur seuil doit être effectué en double et si les deux mesures individuelles diffèrent de la moyenne de plus de 25 %, le test doit être recommencé. Le test a été correctement exécuté si les moyennes d’extinction des contrôles répondent aux critères suivants :

Tableau 3 : Critères de contrôle qualité

	DO
Contrôle négatif	< 0,15
Contrôle de valeur seuil	0,2 à 0,5
Contrôle positif	≥ indice 20

Si les valeurs diffèrent des valeurs requises, si le substrat est trouble ou a viré au bleu avant d’être ajouté dans les puits, cela peut indiquer que les réactifs sont périmés.

En cas d’écart par rapport aux valeurs indiquées, les points suivants doivent être contrôlés avant de recommencer le test :

- Date de péremption des réactifs utilisés
- Capacité de fonctionnement de l’équipement utilisé (par ex. étalonnage)
- Procédure de test correcte
- Inspection visuelle des composants de la trousse à la recherche d’une contamination ou de fuites ; une solution de substrat devenue bleue ne doit pas être utilisée.

Si les conditions ne sont toujours pas satisfaites après avoir recommencé le test, contacter votre distributeur R-Biopharm local.

11. Évaluation et interprétation

11.1. Calcul de la valeur seuil de l'échantillon

1. L'absorbance moyenne est calculée pour le contrôle de valeur seuil.
2. La valeur seuil de l'échantillon est obtenue en divisant l'absorbance de l'échantillon par la valeur seuil.

Par exemple : Contrôle de valeur seuil 1 DO = 0,44
 Contrôle de valeur seuil 2 DO = 0,42
 Échantillon DO = 1,591

$$\text{Contrôle de valeur seuil moyenne} = \frac{DO \text{ Valeur-seuil } 1 + DO \text{ Valeur seuil } 2}{2} = \frac{0,44+0,42}{2} = 0,43$$

$$\text{Valeur seuil de l'échantillon} = \left(\frac{DO \text{ échantillon}}{DO \text{ contrôle de valeur seuil moyenne}} \right) * 10 = \left(\frac{1,591}{0,43} \right) * 10 = 37$$

11.2. Résultats du test

Tableau 4 : Évaluation de la valeur seuil de l'échantillon

	Négatif	Équivoque	Positif
Valeur seuil de l'échantillon	< 9	9 à 11	> 11

12. Limites de la méthode

Le test immunoenzymatique RIDASCREEN® Leishmania IgG détermine les anticorps IgG spécifiques contre *Leishmania infantum* et il devra être effectué en cas de suspicion de leishmaniose. Les résultats obtenus doivent toujours être interprétés conjointement au tableau clinique et aux autres résultats diagnostiques.

Les signaux des anticorps dépendent de la localisation des parasitoses et peuvent varier d'un patient à l'autre.

Des résultats équivoques et faiblement positifs peuvent être obtenus dans les cas suivants :

- chez des personnes ayant été piquées par des phlébotomes infectés dans des régions où la maladie est endémique et qui produisent des titres faibles d'anticorps sans déclaration de l'infection ;
- chez des personnes qui sont guéries ou qui viennent juste de se rétablir suite à une infection asymptomatique et qui produisent encore des titres faibles d'anticorps ;
- chez des personnes qui ont souffert de cette maladie par le passé et qui produisent encore des titres résiduels
- chez des personnes à un stade précoce de la maladie ;
- en cas de facteurs non identifiables et non spécifiques.

Ces cas devraient être ré-examinés en testant un autre échantillon, en tenant compte des symptômes cliniques et par d'autres méthodes de diagnostic. En l'absence d'un autre diagnostic exact, le test devra être recommencé 2 à 4 semaines après avec un nouvel échantillon.

Des résultats positifs moyens et élevés peuvent être obtenus avec des personnes ayant été victimes de la maladie aiguë ou ayant récemment souffert de cette maladie. Les taux d'anticorps peuvent aussi être plutôt élevés après des infections assez longues s'étant produites par le passé. Dans les cas qui ne sont pas clairs, le résultat peut être interprété à la lumière des antécédents et des symptômes cliniques et d'autres méthodes de diagnostic.

Un résultat négatif n'exclut pas nécessairement la leishmaniose. Pendant les premières phases de l'infection, le nombre d'anticorps est encore si faible que le test peut rendre un résultat négatif. En cas de suspicion de la leishmaniose sur la base de l'anamnèse clinique, un autre échantillon de sérum devra être testé après 4 semaines.

Une réaction croisée avec des sérums contenant des anticorps contre *T. cruzi* (maladie de Chagas) a été observée dans certains cas en Amérique du sud. Il convient d'en tenir compte lors de la réalisation du test dans certaines régions d'Amérique du sud où la maladie de Chagas est endémique.

Un résultat positif n'exclut pas la présence d'autres agents pathogènes infectieux.

13. Performances

Tableau 5 : Variation inter-essais (n = 30)

Variation inter-essais	IgG	
	Indice	CV
Sérum 1	44,7	5,8 %
Sérum 2	15,4	9,6 %
Sérum 3	13,1	8,3 %
Sérum 4	0,6	s/o

Tableau 6 : Variation inter-essais (n = 23)

Variation inter-essais	IgG	
	Indice	CV
Sérum 1	39,1	3,0 %
Sérum 2	15,7	3,6 %
Sérum 3	12,3	2,0 %
Sérum 4	0,2	s/o

Tableau 7 : Sensibilité et spécificité en comparaison avec trois autres tests ELISA disponibles dans le commerce

	IgG
Sensibilité	100 %
Spécificité	100 %

Tableau 8 : Résultat des tests de sérums de 200 donneurs de sang provenant d'un centre de don du sang en Allemagne










Sérums de 200 donneurs de sang	IgG
Négatif	100 %
Équivoque	0 %
Positif	0 %

14. Historique des versions



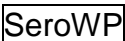
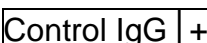
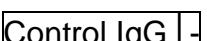
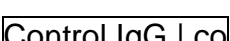
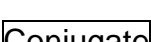
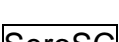

Numéro de version	Chapitre et désignation
15/12/2017	Version pour la publication

15. Signification des symboles

Symboles généraux

	Pour usage diagnostique in vitro
	Respecter le mode d'emploi
	Numéro de lot
	Date de péremption
	Température de stockage
	Référence
	Nombre de tests
	Date de fabrication
	Fabricant

Symboles spécifiques au test

	Plaque de microtitrage
	Tampon de dilution d'échantillon
	Tampon de lavage 10x
	Contrôle IgG positif
	Contrôle IgG négatif
	Contrôle IgG de valeur de seuil
	Conjugué anti-IgG humaine
	Substrat TMB
	Réactif d'arrêt

16. Bibliographie

1. *Bray, R.S. and Lainson, R.*, Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 60, 605-609 (1966).
2. *Bray, R.S. and Lainson, R.*, Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 61, 490-505 (1967).
3. *Bray, R.S.*, Ecol. Dis., 4, 257-267 (1982).
4. *Hommel, M., Peters, W., Ranque, J., Quilici, M. and Lanotte, G.*, Ann. Trop. Med. Parasitol., 72, 213-218 (1978).
5. *Kager, P.A., Rees, P.H., Welde, B.T., Hockmeyer, W.T. and Lyerly, W.H.*, Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 75, 556-559 (1981).
6. *Lainson, R.*, Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 77, 569-596 (1983).
7. *Low-A-Chee, R.M., Rose, P. and Ridley, D.S.*, Ann. Trop. Med. Parasitol., 77, 255-260 (1986).
8. *Ranque, J. and Quilici, M.*, Journal of Parasitology, 56, 277-278 (1970).