

**RIDASCREEN® Zika Virus IgG capture,
RIDASCREEN® Zika Virus IgM μ -capture**

REF K8421
K8431



1. Application

Pour usage diagnostique *in vitro*. RIDASCREEN® Zika Virus est un test immunoenzymatique destiné à la détection qualitative des anticorps IgG ou IgM dirigés contre le virus Zika dans le sérum ou le plasma humains.

Il est destiné à être utilisé en cas d'infection présumée par le virus Zika.

2. Résumé et explication du test

Le virus Zika est un virus à ARN simple brin de la famille des Flaviviridae, du genre Flavivirus, principalement transmis par les moustiques appartenant aux espèces *A. aegypti* et *A. albopictus*. Il existe cependant des rapports faisant état de modes de transmission moins communs (par transfusions sanguines, transmission périnatale et contact sexuel, notamment).

La période d'incubation précise de la fièvre Zika n'est pas connue mais se situe probablement autour de quelques jours.

On estime que sur cinq personnes infectées par le virus Zika, une seule développera des symptômes. Les manifestations cliniques de la fièvre Zika sont semblables à celles de la dengue ou du chikungunya, mais leur évolution est généralement plus modérée.

Les symptômes les plus courants sont les suivants : éruption maculopapuleuse, fièvre légère, arthralgie, myalgie, céphalée et conjonctivite. Plus rarement, elle peut se manifester par des œdèmes, des douleurs cervicales, une toux, des vomissements et une hémospérme. Chez les humains, l'infection est généralement légère et spontanément résolutive ; en général, les symptômes disparaissent spontanément en l'espace de trois à sept jours. L'arthralgie peut durer jusqu'à un mois. Dans de rares cas, l'infection par le virus Zika peut entraîner le développement du syndrome de Guillain-Barré (SGB) qui est une atteinte du système nerveux périphérique.

La corrélation entre l'infection par le virus Zika pendant la grossesse et les anomalies cérébrales chez l'enfant à naître est désormais considérée comme probable.

Après infection par le virus Zika, le corps produit des anticorps spécifiques dirigés contre le pathogène en réponse à la réaction du système immunitaire. Ces anticorps peuvent être détectés dans le sérum à l'aide de tests immunologiques. Le choix de l'antigène spécifique adapté à l'agent pathogène et la méthode de test utilisée ont une forte incidence sur la validité du test.

3. Principe du test

Les anticorps anti-IgG et anti-IgM humaines sont liés sur une plaque de microtitrage. Les anticorps IgG ou IgM présents dans les échantillons des patients se lient aux anticorps anti-IgG ou anti-IgM humaines. Les éléments non fixés de l'échantillon sont éliminés par lavage. Les antigènes du virus Zika marqués par une enzyme sont

ensuite ajoutés. Ce conjugué antigénique se lie aux anticorps IgG ou IgM spécifiques liés. Au deuxième lavage, le conjugué **Conjugate** non lié est éliminé. Le substrat incolore (H_2O_2 /TMB) est transformé par l'enzyme en un produit final de couleur bleue.

La réaction enzymatique est stoppée par l'ajout d'acide sulfurique. La couleur vire alors du bleu au jaune. La mesure finale est relevée à l'aide d'un photomètre à 450 nm (longueur d'onde de référence ≥ 620 nm).

4. Contenu du paquet

Tableau 1 : Réactifs fournis (les réactifs fournis dans la trousse permettent de faire 96 tests.)

			K8421 IgG	K8431 IgM
Plate	96 tests	Plaque de microtitrage ; plaque de 12 barrettes de microtitrage (sécables) ; revêtue d'anticorps anti-IgG humaines	X	
Plate	96 tests	Plaque de microtitrage ; plaque de 12 barrettes de microtitrage (sécables) ; revêtue d'anticorps anti-IgM humaines		X
Diluent	100 ml	Tampon de dilution de l'échantillon, prêt à l'emploi ; tampon phosphaté, couleur jaune	X	X
Wash	50 ml	Tampon de lavage, concentration 20X ; tampon phosphaté	X	X
Control IgG + Bouchon rouge	2 ml	Contrôle positif IgG, prêt à l'emploi ; sérum ou plasma humain dilué ; couleur jaune	X	
Control IgG - Bouchon bleu	2 ml	Contrôle négatif IgG, prêt à l'emploi ; sérum ou plasma humain dilué ; couleur jaune	X	
Cut-off IgG Bouchon vert	3 ml	Contrôle IgG de valeur seuil, prêt à l'emploi ; sérum ou plasma humain dilué ; couleur jaune	X	
Control IgM + Bouchon rouge	2 ml	Contrôle positif IgM, prêt à l'emploi ; sérum ou plasma humain dilué ; couleur jaune		X
Control IgM - Bouchon bleu	2 ml	Contrôle négatif IgM, prêt à l'emploi ; sérum ou plasma humain dilué ; couleur jaune		X
Cut-off IgM Bouchon vert	3 ml	Contrôle IgM de valeur seuil, prêt à l'emploi ; sérum ou plasma humain dilué ; couleur jaune		X
Conjugate IgG Bouchon noir	15 ml	Conjugué de virus Zika ; prêt à l'emploi ; antigène du virus Zika conjugué à la peroxydase ; couleur bleue	X	
Conjugate IgM Bouchon noir	15 ml	Conjugué de virus Zika ; prêt à l'emploi ; antigène du virus Zika conjugué à la peroxydase ; couleur rouge		X
Substrate Bouchon jaune	15 ml	Substrat, prêt à l'emploi ; H ₂ O ₂ /tétraméthylbenzidine	X	X
Stop Bouchon rouge	15 ml	Solution d'arrêt, prête à l'emploi : acide sulfurique à 0,2 mol/l.	X	X

Les informations sur les substances dangereuses sont conformes aux exigences d'étiquetage. Pour en savoir plus, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) sur www.r-biopharm.com.

5. Instructions de conservation des réactifs

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

Ouvrir le sachet en aluminium contenant la plaque de microtitrage sans déchirer le joint d'étanchéité. Remettre les barrettes de microtitrage non nécessaires dans le sachet en aluminium fermé.

Veiller à éviter toute contamination des réactifs et toute exposition du substrat incolore à la lumière directe.

6. Réactifs requis, mais non fournis

6.1. Réactifs

–Eau distillée ou déionisée

6.2. Accessoires

–Flacons d'échantillon

–Incubateur 37 °C

–Agitateur-mélangeur vortex

–Micropipettes de 10 - 100 µl et 100 - 1 000 µl de volume

–Éprouvette graduée (1 000 ml)

–Appareil de lavage pour plaques de microtitrage ou pipettes multicanaux

–Photomètre pour plaques de microtitrage (450 nm, filtre de référence ≥ 620 nm)

–Papier filtre (lingettes de laboratoire)

–Conteneur de déchets avec une solution d'hypochlorite à 0,5 %

7. Mesures de précaution

Uniquement pour le diagnostic *in vitro*.

Ce test doit uniquement être réalisé par un personnel de laboratoire formé.

Respecter les directives de travail dans les laboratoires médicaux. Les instructions d'exécution du test doivent être rigoureusement appliquées. Ne pas pipeter les échantillons ou les réactifs à la bouche. Éviter tout contact avec les plaies ou les membranes muqueuses. Lors de la manipulation des réactifs et des échantillons, porter un équipement de protection individuelle (gants adaptés, blouse, lunettes de protection) et se laver les mains à l'issue du test. Ne pas fumer, manger, ni boire dans les zones où des échantillons sont manipulés.

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

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. Ils doivent cependant 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 touchés.

Après utilisation, les utilisateurs sont responsables de la mise au rebut appropriée de tous les réactifs et matériaux. Respecter les réglementations nationales applicables en matière d'élimination.

8. Prélèvement et conservation des échantillons

Ce test a été développé dans le but d'examiner le sérum et le plasma humains. Après prélèvement du sang, le sérum doit être séparé du caillot dès que possible pour éviter l'hémolyse. Les échantillons doivent être conservés au frais ou congelés jusqu'à leur analyse. Éviter de congeler et décongeler les échantillons plusieurs fois et éviter 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 ou plasma non dilué		Sérum ou plasma dilué
2 à 8 °C	-20 °C	2 à 8 °C
1 semaine	> 1 semaine	7 heures

9. Réalisation du test

9.1. Informations générales

Avant utilisation, tous les réactifs et barrettes de microtitrage doivent être ramenés à température ambiante (20 à 25 °C). Sortir les barrettes de microtitrage du sachet en aluminium une fois qu'elles ont atteint la température ambiante. Bien mélanger les réactifs juste avant utilisation. Après utilisation, stocker rapidement la trousse à une température comprise entre 2 et 8 °C.

Prélever uniquement la quantité de réactifs nécessaire à la réalisation du test. Les excédents de réactifs ne doivent pas être remis dans le contenant pour éviter tout risque de contamination.

Les barrettes de microtitrage ne doivent être utilisées qu'une seule fois. Ne pas utiliser les réactifs ou les barrettes de microtitrage si l'emballage est endommagé ou si les contenants fuient.

9.2. Préparation du tampon de lavage

Mélanger 1 volume de concentré de tampon de lavage [Wash] avec 19 volumes d'eau distillée. Pour cette étape, verser 50 ml de concentré dans une éprouvette de 1 000 ml, puis compléter le volume avec de l'eau distillée jusqu'à 1 000 ml. Les cristaux éventuellement présents dans le concentré doivent être préalablement dissous à chaud (bain-marie à 37 °C). Le tampon de lavage dilué a une durée de vie de cinq jours lorsqu'il est conservé à température ambiante (20 à 25 °C).

9.3. Préparation de l'échantillon

Les échantillons de sérum ou de plasma testés doivent être dilués à l'aide du tampon de dilution de l'échantillon [Diluent] 1 + 100 avant le début du test.

Par exemple, 10 µl de sérum + 1 ml de diluant [Diluent] .

Attention !

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 placé un nombre suffisant de puits dans la plaque, pipeter 100 µl de chaque sérum dilué et de chaque contrôle prêt à l'emploi ([Control -] , [Control +] et valeur seuil [Cut-off]) dans les puits appropriés ; la position A1 (valeur du blanc substrat) reste vide. Il est recommandé d'effectuer le contrôle de valeur seuil [Cut-off] en double. La plaque doit ensuite être placée dans un incubateur à 37 °C pendant 60 minutes.

La base des puits ne doit pas être en contact avec des matériaux conduisant facilement la chaleur. Pendant l'incubation, la plaque de microtitrage doit être recouverte de la feuille de protection fournie.

A1	Valeur du blanc substrat
B1	Contrôle négatif
C1	Contrôle de valeur seuil
D1	Contrôle de valeur seuil
E1	Contrôle positif
F1, G1	Sérum du patient 1, 2, etc.

Attention !

Ne pas placer la plaque de microtitrage dans un récipient d'incubation froid qui n'atteindra pas 37 °C avant l'incubation. Le récipient doit être préalablement amené à 37 °C.

9.5. Lavage

Vider les puits dans un conteneur de déchets contenant une solution d'hypochlorite à des fins de désinfection. Ensuite, tapoter la plaque sur du papier absorbant pour

éliminer l'humidité restante. Puis laver la plaque trois fois en utilisant 300 µl de tampon de lavage à chaque fois. Après chaque lavage, tapoter la plaque sur une partie sèche du papier absorbant afin de la vider complètement.

Lorsqu'un appareil de lavage est utilisé, vérifier qu'il est correctement réglé sur le type de plaque utilisé. Après lavage, tapoter la plaque sur un papier absorbant propre pour éliminer l'humidité résiduelle.

9.6. Seconde incubation

Ajouter 100 µl de conjugué **Conjugate** dans les puits appropriés (exception faite du puits A1 qui correspond à la valeur du blanc substrat). Ensuite, incuber la plaque dans un incubateur à 37 °C pendant 30 minutes (voir paragraphe 9.4.).

9.7. Lavage

Laver trois fois en procédant comme indiqué au paragraphe 9.5.

9.8. Troisième incubation

Ajouter 100 µl de substrat **Substrate** dans tous les puits, y compris le puits A1 (valeur du blanc substrat). Ensuite, incuber la plaque à température ambiante (20 à 25 °C), dans le noir, pendant exactement 15 minutes. Ajouter ensuite 100 µl de solution d'arrêt **Stop** dans tous les puits pour arrêter la réaction, ce qui fera virer la couleur du bleu au jaune. Après avoir soigneusement mélangé la plaque (en tapotant doucement sur le bord de la plaque), mesurer l'extinction à l'aide d'un photomètre à plaques à 450 nm (longueur d'onde de référence ≥ 620 nm). La comparaison de la valeur nulle est effectuée par rapport à la valeur du blanc substrat (position A1).

10. Contrôle qualité - signes d'instabilité ou de détérioration des réactifs

Les contrôles positifs, négatifs et de valeur seuil doivent être effectués à chaque exécution du test à des fins de contrôle qualité. Le contrôle de valeur seuil est effectué en double et la valeur moyenne déterminée à partir des deux mesures. Le test a été correctement exécuté lorsque les valeurs d'extinction (DO) des contrôles répondent aux critères suivants :

Tableau 3 : Critères de contrôle qualité

	DO
Valeur du blanc substrat	< 0,100
Contrôle négatif	< valeur seuil
Contrôle de valeur seuil	0,150 - 1,300
Contrôle positif	> valeur seuil

Tout écart par rapport aux valeurs attendues, ainsi que toute turbidité ou coloration bleue du substrat incolore avant remplissage des puits peut indiquer une dénaturation des réactifs.

Si les valeurs spécifiées ne sont pas obtenues, vérifier les points suivants avant de renouveler le test :

- Date de péremption des réactifs utilisés
- Performances fonctionnelles 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 le fabricant.

11. Évaluation et interprétation

11.1. Calcul de la valeur seuil

1. Consiste à calculer la valeur d'extinction moyenne du contrôle de valeur seuil.
2. Pour ce faire, diviser la valeur d'extinction de l'échantillon par la valeur moyenne d'extinction du contrôle de valeur seuil calculée.

Par exemple :

Contrôle de valeur seuil 1	DO = 0,440
Contrôle de valeur seuil 2	DO = 0,420
Valeur moyenne :	= 0,430
Échantillon	DO = 1,591

$$\text{Valeur seuil} = \frac{1,591}{0,430} \times 10 = 37$$

Tableau 4 : Analyse de la valeur seuil

	Négatif	Limite	Positif
Valeur seuil	< 9	09 - 11	> 11

12. Limites de la méthode

RIDASCREEN® Zika Virus IgG capture et IgM μ -capture ELISA détectent les anticorps IgG ou IgM dirigés contre les virus Zika. Aucune corrélation ne peut être établie entre la valeur d'extinction mesurée et la présence de symptômes cliniques ou leur gravité. Les résultats obtenus doivent toujours être interprétés conjointement aux signes et symptômes cliniques.

Un résultat négatif n'exclut pas l'existence d'une infection. À un stade précoce de l'infection, la production d'anticorps peut être si faible que le test de détection peut

s'avérer négatif. En cas de suspicion clinique, un autre échantillon de sérum doit donc être testé.

Pour les tests sérologiques, il convient généralement de tester deux échantillons de sérum consécutifs pour améliorer la validité du diagnostic. L'évolution du titre est essentielle à l'interprétation d'un résultat.

Un résultat positif n'exclut pas la présence d'un autre pathogène infectieux à l'origine d'une maladie.

Tester un panel d'échantillons en s'appuyant sur l'activité des anticorps par rapport à des paramètres susceptibles de présenter des réactions croisées ne permet pas de détecter des indices significatifs de résultats faussement positifs dus à des réactivités croisées. Dans les zones endémiques, il convient cependant de tenir compte de l'éventualité d'une double infection ou d'infections passées dues à d'autres Flavivirus.

13. Performances

Tableau 5 : Variation inter-essais (n = 12)

Variation inter-essais	IgG		IgM	
	U/ml	CV	U/ml	CV
Sérum 1	32,6	6,2 %	25,2	10,7 %
Sérum 2	22,6	5,7 %	11,4	5,3 %
Sérum 3	23,8	5,9 %	6,8	8,8 %

Tableau 6 : Variation intra-essai (n = 24)

Variation intra-essai	IgG		IgM	
	DO	CV	DO	CV
Sérum 1	0,422	6,7 %	1,012	4,0 %
Sérum 2	1,062	2,1 %	0,488	3,0 %
Sérum 3	0,988	2,6 %	0,431	1,8 %

Tableau 7 : Sensibilité et spécificité










	IgG	IgM
Sensibilité	96,0 %	100 %
Spécificité	99,6 %	98,6 %

14. Historique des versions

Numéro de version	Chapitre et désignation
2017-12-13	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

Plate	Plaque de microtitrage
Diluent	Tampon de dilution de l'échantillon
Wash	Tampon de lavage 20x
Control IgG +	Contrôle positif IgG
Control IgG -	Contrôle négatif IgG
Cut-off IgG	Contrôle IgG de valeur seuil
Control IgM +	Contrôle positif IgM
Control IgM -	Contrôle négatif IgM
Cut-off IgM	Contrôle IgM de valeur seuil
Conjugate IgG	Conjugué IgG de virus Zika
Conjugate IgM	Conjugué IgM de virus Zika
Substrate	Substrat
Stop	Solution d'arrêt

16. Bibliographie

1. Lanciotti, R.S.; Kosoy, O.L.; Laven, J.J.; Velez, J.O.; Lambert, A.J.; Johnson, A.J.; Stanfield, S.M.; Duffy, M.R. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis.* 2008 Aug;14(8):1232-1239.
2. Lazear, H.M.; Diamond, M.S. Zika Virus: New Clinical Syndromes and its Emergence in the Western Hemisphere. *J Virol.* 2016 Mar 9. pii: JVI.00252-16.
3. Musso, D.; Gubler, D.J. Zika virus. *Clin. Microbiol. Rev.* 2016. 29:487–524.
4. Petersen, L.R.; Jamieson, D.J.; Powers, A.M.; Honein, M.A. Zika Virus. *N. Engl. J. Med.* March 30, 2016
DOI: 10.1056/NEJMra1602113.
5. Rasmussen, S.A.; Jamieson, D.J.; Honein, M.A.; Petersen, L.R. Zika Virus and Birth Defects — Reviewing the Evidence for Causality. *N. Engl. J. Med.* April 13, 2016. DOI: 10.1056/NEJMr1604338
6. Waggoner, J.J.; Pinsky, B.A. Zika Virus: Diagnostics for an Emerging Pandemic Threat.
J Clin Microbiol. 2016 Apr;54(4):860-867.
7. Weaver, S.C.; Reisen, W.K. Present and future arboviral threats. *Antiviral Res.* 2010 Feb;85(2):328-345.
8. Zammarchi, L.; Stella, G.; Mantella, A.; Bartolozzi, D.; Tappe, D.; Günther, S.; Oestereich, L.; Cadar, D.; Muñoz-Fontela, C.; Bartoloni, A.; Schmidt-Chanasit, J. Zika virus infections imported to Italy: clinical, immunological and virological findings, and public health implications. *J Clin Virol.* 2015 Feb;63:32-35.