

Fasciola hepatica IgG ELISA

Test immunoenzymatique pour le diagnostic de la distomatose humaine

96 tests sur puits individuels pour utilisation diagnostique in vitro par des laboratoires professionnels



BORDIER
AFFINITY
PRODUCTS

Instructions d'utilisation pour l'article N° 9650
N° CE: CH-201504-0006 - UDI-DI: 07640158219652



Utilisations prévues du produit:

Le kit ELISA Bordier *Fasciola hepatica* IgG ELISA est destiné à la détection quantitative des anticorps IgG contre *Fasciola hepatica* dans le sérum humain. La sérologie est une aide au diagnostic et ne doit pas être utilisée comme seule méthode de diagnostic.

Contexte:

La distomatose est principalement causée par le trématode *Fasciola hepatica* (douve du foie). Les humains peuvent être infectés en mangeant du cresson cru ou d'autres plantes aquatiques contaminées par des stades larvaires parasitaires infectieux. Les douves larvaires immatures migrent d'abord à travers le parenchyme hépatique, provoquant un dysfonctionnement hépatique traumatique, et plus tard dans les canaux biliaires, où elles se transforment en douves adultes, qui produisent des œufs. Dans la phase précoce, les symptômes peuvent inclure des problèmes gastro-intestinaux tels que des nausées, des vomissements et une douleur/sensibilité abdominale. Pendant la phase chronique, les manifestations cliniques peuvent être similaires ou plus discrètes, reflétant l'inflammation et le blocage des canaux biliaires, qui peuvent être intermittents. Le diagnostic est basé sur la détection des œufs dans les selles et un résultat positif par des tests sérologiques.

Principe du test et présentation:

La trousse contient le matériel nécessaire pour effectuer 96 tests immuno-enzymatiques (tests ELISA) sur des barrettes sécables sensibilisées avec un antigène recombinant de *Fasciola hepatica*. Les anticorps spécifiques de l'échantillon se lieront à ces antigènes et les anticorps non spécifiques seront éliminés par lavage. La présence d'anticorps spécifiques vis-à-vis des antigènes parasitaires est détectée avec un conjugué protéine A - phosphatase alcaline. Une deuxième étape de lavage éliminera le conjugué non lié. La révélation des anticorps liés est faite par l'addition du substrat pNPP qui devient jaune en présence de phosphatase alcaline. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la quantité d'anticorps spécifiques de *Fasciola hepatica* dans l'échantillon. Le phosphate de potassium ajouté arrêtera la réaction. L'absorbance à 405 nm est lue avec un lecteur de microplaques ELISA.

Le test peut être réalisé avec un système automatisé mais doit être validé par l'utilisateur.

Matériel contenu dans la trousse (96 tests):

WELL	9650-01	Barrettes sécables sensibilisées avec un antigène recombinant de <i>Fasciola hepatica</i>	96	puits
DILB	9650-02	Tampon de dilution (concentré 10 x), coloré en violet	50	ml
WASH	9650-03	Solution de lavage (concentrée 10 x)	50	ml
ENZB	9650-04	Tampon de l'enzyme	50	ml
STOP	9650-05	Solution d'arrêt (0.5M K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9650-06	Sérum de contrôle négatif (20 x), bouchon vert	200	µl
CONTROL -/+	9650-07	Sérum de contrôle faiblement positif (seuil, 20 x), bouchon jaune	200	µl
CONTROL +	9650-08	Sérum de contrôle positif (20 x), bouchon rouge	200	µl
CONJ	9650-09	Conjugué protéine A – phosphatase alcaline (50 x), bouchon violet	300	µl
SUBS	9650-10	Substrat de la phosphatase (para-nitrophénylphosphate)	20	tablettes
		Réservoir de réactifs pour multipipettes, 25 ml	1	pièce
		Cadre pour les supports de puits	1	cadre

Durée de vie et conservation:

Conserver la trousse entre 2° et 8°C (transport à température ambiante), éviter l'exposition prolongée des composants à la lumière directe. La date de péremption et le numéro de lot sont imprimés sur le côté de la boîte. Après ouverture initiale, tous les réactifs sont stables jusqu'à la date d'expiration lorsqu'ils sont conservés entre 2° et 8°C.

Équipement nécessaire ne se trouvant pas dans la trousse:

Pipettes (μl et ml). Récipients. Tubes de dilution. Bande adhésive pour couvrir les puits pendant les incubations. Eau distillée. Incubateur à 37°C. Lecteur ELISA ajusté à une longueur d'onde de 405 nm. Équipement manuel ou automatique pour le rinçage des puits. Vortex. Minuteur.

Préparation des réactifs avant l'usage:

Équilibrer tous les réactifs à température ambiante et mélanger avant utilisation.

Barrettes sensibilisées: ouvrir le côté du sachet d'aluminium 9650-01 et retirer le nombre de puits nécessaires (un pour le blanc sans sérum, trois pour les contrôles plus le nombre d'échantillons). Placer les puits dans un support. Si nécessaire, compléter les positions inutilisées du support avec des puits usagés. Placer le support dans un cadre en respectant son orientation. Conserver les barrettes inutilisées scellées dans le sachet avec le dessicatif.

Tampon de dilution: diluer le tampon de dilution concentré 10x 9650-02, 1/10 dans de l'eau distillée. Il est utilisé pour la dilution des sérums de contrôle, des échantillons et du conjugué. Le tampon dilué est stable pendant 2 mois à 2-8°C.

Solution de lavage: diluer la solution de lavage concentrée 10x 9650-03, 1/10 dans de l'eau distillée. Si vous désirez utiliser votre propre solution de lavage, évitez les tampons contenant du phosphate qui pourrait inhiber par la suite l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline. La solution de lavage diluée est stable pendant 2 mois à 2-8°C.

Sérums de contrôle: diluer 10 μl de chaque sérum 9650-06 à -08 dans 190 μl de la solution de tampon de dilution (dilution finale 1/20). Les sérums de contrôle dilués sont stables pendant 2 mois à 2-8°C.

Conjugué: diluer le conjugué 9650-09, 1/50 dans la solution de tampon de dilution. Diluer le conjugué le jour du test. Ne pas stocker le conjugué dilué.

Solution de substrat: dissoudre le nombre nécessaire de tablettes de substrat 9650-10 dans le tampon de l'enzyme 9650-04 non dilué (une tablette dans 2.5 ml de tampon). Vortexer jusqu'à dissolution complète de la tablette. Diluer le substrat le jour du test et protéger le tube de la lumière directe. Les tablettes et les solutions de substrat doivent être incolores ou ne présenter qu'une légère teinte jaune. Si une tablette ou une solution de substrat devient jaune, elle peut avoir été partiellement hydrolysée et doit être jetée. Ne pas stocker la solution de substrat.

Solution d'arrêt: utiliser le réactif 9650-05 non dilué.

Collecte et préparation des échantillons:

Utiliser du sérum humain. Le conserver à 2-8°C s'il est analysé dans les jours suivant le prélèvement, sinon le conserver à -20°C ou moins. Éviter les cycles de congélation/décongélation. Mélanger les échantillons et diluer 1/201 dans la solution de tampon de dilution (par ex. 5 μl d'échantillon dans 1 ml).

Avertissements et précautions:

Les composés toxiques sont trouvés dans les concentrations suivantes:

Composant	Référence	Azide de sodium (Na_3N_3)	Merthiolate
Tampon de dilution (10 x)	9650-02	0.1 %	0.02 %
Solution de lavage (10 x)	9650-03	0.05 %	/
Tampon de l'enzyme	9650-04	0.01 %	/
Sérums de contrôle (20 x)	9650-06 to -08	0.1 %	0.02 %
Conjugué (50 x)	9650-09	0.1 %	/

Aux concentrations utilisées, l'azide de sodium et le merthiolate ne présentent aucun risque toxicologique au contact de la peau et des muqueuses.

- La solution d'arrêt 9650-05 (0.5 M K_3PO_4) est irritante.
- Les sérums de contrôle négatif, seuil et positif (9650-06 à -08) proviennent de lapins.
- Traiter tous les réactifs et les échantillons comme des matières potentiellement infectieuses.
- Ne pas intervertir les réactifs de différents lots ou kits ELISA Bordier.
- Ne pas utiliser de réactifs d'autres fabricants avec ce kit.
- Ne pas utiliser les réactifs après leur date de péremption.
- Fermer les flacons de réactif immédiatement après utilisation et ne pas intervertir les bouchons à vis pour éviter toute contamination.
- Utiliser des pointes de pipettes séparées et propres pour chaque échantillon.
- Ne pas réutiliser les micropuits.
- Éviter la détérioration des micropuits par action mécanique (cônes, buses).

- Les descriptions des symboles utilisés sur les étiquettes se retrouvent sur le site internet www.bordier.ch.

Informations d'élimination:

Tous les matériaux utilisés pour ce test sont généralement considérés comme des déchets dangereux. Se reporter aux lois et règlements nationaux et régionaux pour l'élimination des déchets dangereux.

Méthode:

Lors de l'exécution du test, éviter la formation de bulles dans les puits.

Etape 1: Blocage:

Remplir complètement les puits avec la solution de tampon de dilution.

Incuber **5 à 15 minutes** à température ambiante (blocage des puits).

Éliminer le tampon de dilution par aspiration ou en secouant les barrettes au-dessus d'un évier.

Etape 2: Incubation avec les échantillons:

Remplir le premier puits de la première barrette avec 100 µl de tampon de dilution (blanc sans sérum).

Remplir les trois puits suivants avec respectivement 100 µl de sérum de contrôle dilués négatif, faiblement positif (seuil) et positif. Pour des essais de plus de 25 échantillons, nous recommandons de remplir les trois derniers puits avec des sérums de contrôle comme doublon.

Remplir les autres puits avec les échantillons dilués (100 µl).

Couvrir les puits avec de la bande adhésive et incuber **30 minutes** à 37°C.

Éliminer les sérums et laver 4 x avec ~ 250 µl de solution de lavage.

Etape 3: Incubation avec le conjugué:

Distribuer 100 µl du conjugué dilué dans chaque puits (blanc sans sérum inclut).

Couvrir les puits avec de la bande adhésive et incuber **30 minutes** à 37°C.

Éliminer le conjugué et laver 4 x avec ~ 250 µl de solution de lavage.

Etape 4: Incubation avec le substrat:

Distribuer 100 µl de la solution de substrat dans chaque puits.

Couvrir les puits avec de la bande adhésive et incuber **30 minutes** à 37°C.

Arrêter la réaction en ajoutant 100 µl de la solution d'arrêt à chaque puits.

Etape 5: Mesure de la densité optique:

Si besoin, essuyer le dessous des puits et éliminer les bulles éventuelles. Mesurer la densité optique (DO) à une longueur d'onde de 405 nm dans l'heure qui suit l'addition de la solution d'arrêt.

Interprétation:

Soustraire la valeur du blanc sans sérum de toutes les autres valeurs. Le cas échéant, calculer les moyennes des valeurs de DO des sérums de contrôle dupliqués. Le test est valable si les critères suivants sont remplis:

- DO contrôle positif > 1.200
- DO contrôle seuil > 8 % de la DO du contrôle positif
- DO contrôle négatif < 8 % de la DO du contrôle positif
- DO du blanc sans sérum < 0.350

Les contrôles de qualité des lots actuels sont publiés sur notre site internet: www.bordier.ch.

La concentration en anticorps du sérum seuil 9650-07 a été ajustée de manière à permettre une distinction optimale entre les sérums de cas cliniques de distomatose et les sérums de sujets sains.

L'index cut off de chaque échantillon est défini, après soustraction du blanc sans sérum, par la formule suivante:

$$\text{Index} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO sérum seuil}}$$

Le résultat est **négatif** lorsque l'index du sérum à tester est inférieur à 1.0. Dans ce cas, la concentration d'anticorps IgG dirigés contre l'antigène de *Fasciola hepatica* n'est pas cliniquement significative.

Le résultat est **positif** lorsque l'index du sérum à tester est supérieur à 1.0. Dans ce cas, la concentration d'anticorps IgG dirigés contre l'antigène de *Fasciola hepatica* est considérée comme cliniquement significative. Cela indique que le patient a eu un contact avec le parasite.

Une zone grise pourra être définie par chaque laboratoire en fonction de sa population de patients. En cas de résultats limites ou douteux, nous recommandons de répéter le test 2 à 4 semaines plus tard avec un nouvel échantillon.

En cas de résultat positif ou douteux, nous recommandons de réaliser un test de confirmation (le plus souvent par western blot) si un tel test est disponible ou requis par un règlement national.

Performances analytiques:

Spécificité analytique:

Une spécificité de 97% a été obtenue avec 30 sérums de patients atteints d'autres infections parasitaires. Les réactions croisées surviennent principalement chez les patients atteints d'échinococcose alvéolaire.

Aucune interférence positive ou négative n'a été observée avec des concentrations supra-physiologiques d'hémoglobine, de lipides ou de bilirubine dans des sérums supplémentés en interférents.

Fidélité:

La répétabilité a été évaluée en testant 2 sérums humains dans 24 puits d'une microplaque en un essai unique. La reproductibilité a été évaluée en testant ces 2 échantillons lors de 10 essais différents.

	Répétabilité		Reproductibilité	
	Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon 1	Echantillon 2
Moyenne (densité optique)	0.459	1.491	0.469	1.547
Ecart-type (densité optique)	0.023	0.089	0.028	0.069
Coefficient de variation (%)	5.0	6.0	5.9	4.5

Les performances suivantes ne peuvent pas être évaluées car il n'existe pas de matériel de référence certifié pour cette analyse:

- Sensibilité analytique (limite de détection et seuil de détection)
- Justesse
- Exactitude
- Plage de mesure
- Linéarité

Performances cliniques:

Sensibilité diagnostique:

Une sensibilité de 77% a été obtenue avec 13 sérums de patients atteints de distomatose.

Spécificité diagnostique:

Une spécificité de 99% a été obtenue avec 99 sérums de donneurs de sang suisses. Une spécificité de 98% a été obtenue avec 100 sérums de patients d'un service clinique d'infectiologie suisse.

Valeur prédictive positive et négative:

Une VPP de 77% et une VPN de 98% ont été obtenues avec les populations mentionnées ci-dessus.

Valeurs attendues dans la population normale et touchée:

Une valeur attendue d'index 0.46 a été obtenue dans la population normale avec 99 sérums de donneurs de sang suisse et 100 sérums d'un service d'infectiologie suisse. Une valeur attendue d'index 5.01 a été obtenue dans la population touchée avec 13 sérums de patients atteints de distomatose.

Limitations:

Le diagnostic d'une maladie infectieuse ne doit pas être établi sur la base du résultat d'un seul test. Un diagnostic précis doit prendre en compte la situation endémique, l'histoire clinique, la symptomatologie, l'imagerie ainsi que les données sérologiques. Chez les patients immunodéprimés et les nouveau-nés, les données sérologiques ont une valeur limitée.

Incidents:

Tout incident grave survenu en lien avec le dispositif fait 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.

Références:

Figuroa-Santiago, O., Delgado, B. and Espino, A.M. (2011) Fasciola hepatica saposin-like protein-2-based ELISA for the serodiagnosis of chronic human fascioliasis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 70, 355-361.

Gottstein B, Schneeberger M, Boubaker G, Merkle B, Huber C, et al. (2014) Comparative Assessment of ELISAs Using Recombinant Saposin-Like Protein 2 and recombinant Cathepsin L-1 from Fasciola hepatica for the Serodiagnosis of Human Fasciolosis. *PLoS Negl Trop Dis* 8(6): e2860. doi:10.1371/journal.pntd.0002860



BORDIER AFFINITY PRODUCTS SA
Bâtiment Biokema, Chatanerie 2, CH-1023 Crissier, Switzerland.
Phone: + 41 21 633 31 67, Fax: + 41 21 633 31 78, www.bordier.ch

