

ECHINOCOCCUS GRANULOSUS

Test immunoenzymatique pour le diagnostic des echinococcoses chez l'humain

96 tests sur barrettes sécables destinés à un usage in vitro

Instructions d'utilisation pour l'article N° 9350
N° CE : H-CH/CA01/IVD/01757



Utilisations prévues du produit:

Diagnostic sérologique (IgG) du kyste hydatique (Echinococcose à *E. granulosus*) chez l'homme.

L'utilisation de ce test peut être également recommandée pour le diagnostic de l'Echinococcose alvéolaire (Echinococcose à *E. multilocularis*). Les cas positifs et douteux seront retestés sur l'antigène Em2-Em18 (Article N° 9300, Bordier Affinity Products SA) afin d'identifier l'espèce infectieuse.

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 de l'antigène préparé à partir de liquide hydatique provenant de kystes fertiles de *Echinococcus granulosus*. La présence d'anticorps sériques spécifiques vis-à-vis de l'antigène parasitaire est détectée avec un conjugué protéine A - phosphatase alcaline. Les barrettes sécables en puits individuels permettent de tester économiquement de petites séries d'échantillons.

Matériel contenu dans la trousse (96 tests):

WELL	9350-01	Barrettes sécables sensibilisées avec l'antigène d' <i>Echinococcus granulosus</i> (liquide hydatique)	96	puits
DILB	9350-02	Tampon de dilution (concentré 10 x)	50	ml
WASH	9350-03	Solution de lavage (concentrée 10 x)	50	ml
ENZB	9350-04	Tampon de l'enzyme	50	ml
STOP	9350-05	Solution d'arrêt (K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9350-06	Sérum de contrôle négatif	200	µl
CONTROL -/+	9350-07	Sérum de contrôle faiblement positif (seuil)	200	µl
CONTROL +	9350-08	Sérum de contrôle positif	200	µl
CONJ	9350-09	Conjugué protéine A – phosphatase alcaline	300	µl
SUBS	9350-10	Substrat de la phosphatase	20	tablettes
		Réservoir de réactifs pour multipipettes, 25 ml	1	pièce
		Cadre pour les supports de puits	1	cadre

Conservation:

Conserver la trousse entre 2° et 8° C (transport à température ambiante). La date de péremption et le numéro de lot sont imprimés sur le côté de la boîte.

Équipement nécessaire ne se trouvant pas dans la trousse:

Pipettes (μl et ml). Récipients. Tubes pour la dilution des sérums. 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.

Préparation des réactifs avant l'usage:

Barrettes sensibilisées: ouvrir le côté du sachet d'aluminium 9350-01 et retirer le nombre de puits nécessaires. 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 10 x 9350-02, 1/10 dans de l'eau distillée.

Solution de lavage: diluer la solution de lavage concentrée 10 x 9350-03, 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.

Sérums de contrôles négatif, faiblement positif (seuil) et positif: diluer 10 μl de chaque sérum de contrôle 9350-06 à -08 dans 190 μl de la solution de tampon de dilution (dilution finale: 1/20).

Sérums à tester: diluer 10 μl de sérum dans 2.0 ml de la solution de tampon de dilution (dilution finale: 1/201).

Conjugué protéine A – phosphatase alcaline: diluer le conjugué 9350-09, 1/51 dans la solution de tampon de dilution.

Solution de substrat: équilibrer le tampon de l'enzyme 9350-04 à température ambiante. Avant l'addition du substrat de la phosphatase aux puits ELISA, dissoudre le nombre nécessaire de tablettes de substrat 9350-10 dans le tampon de l'enzyme 9350-04 non dilué (une tablette dans 2.5 ml de tampon). Vortexer jusqu'à dissolution complète de la tablette.

Solution d'arrêt: utiliser le réactif 9350-05 non dilué.



Précautions d'utilisation: Les solutions 9350-02, 9350-03, 9350-04 et 9350-09 contiennent respectivement 0.1%, 0.05%, 0.01% et 0.1% d'azide de sodium (NaN_3). La solution 9350-02 contient 0.02% de merthiolate. Ces substances sont toxiques. La solution d'arrêt 9350-05 (0.5 M K_3PO_4) est irritante.

Les sérums de contrôles négatif, faiblement positif et positif (9350-06 à -08) proviennent de lapins.

Volumes à préparer:

			Nombre de puits à utiliser			
			3-4	5-6	7-8	9-10
Tampon de dilution (10 x)	9350-02 + H_2O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Sol. de lavage (10 x)	9350-03 + H_2O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Conjugué	9350-09 + tampon de dilution	μl + μl	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Sérums de contrôles	9350-06 à -08 + tampon de dilution	μl + μl	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Sérums à tester	Sérum + tampon de dilution	μl + μl	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
Solution de substrat	9350-10 + 9350-04	tabl. + ml	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5

Méthode:

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 en dessus d'un évier.

Etape 2: Incubation avec les échantillons de sérum:

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

Remplir les trois puits suivants avec 100 µl des sérums contrôles dilués (sérum négatif, faiblement positif (seuil) et positif).

Remplir les autres puits avec les sérums à tester 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 la solution de lavage.

Etape 3: Incubation avec le conjugué:

Distribuer 100 µl du conjugué protéine A - phosphatase dilué dans chaque puits.

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

Éliminer le conjugué et laver 4 x avec la 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:

Essuyer le dessous des puits, éliminer les bulles éventuelles et mesurer la densité optique (Absorbance) à une longueur d'onde de 405 nm.

Interprétation:

Soustraire la valeur du blanc en absence de sérum de toutes les autres valeurs. Le test est valable si les trois critères suivants sont remplis: DO contrôle positif > 1.200, DO contrôle négatif < 12 % du contrôle positif, DO du blanc contre l'air < 0.350.

La concentration en anticorps du sérum seuil 9350-07 a été ajustée de manière à permettre une distinction optimale entre les sérums de cas cliniques d'échinococcoses et les sérums de sujets sains.

Le résultat est **négatif** lorsque la densité optique du sérum à tester est plus basse que celle du sérum seuil 9350-07. Dans ce cas, la concentration d'anticorps IgG dirigées contre l'antigène de ***Echinococcus granulosus*** n'est pas cliniquement significative.

Le résultat est **positif** lorsque la densité optique du sérum à tester est plus élevée que celle du sérum seuil 9350-07. Dans ce cas, la concentration d'anticorps IgG dirigées contre l'antigène de ***Echinococcus granulosus*** est considérée comme cliniquement significative.

Sensibilité et spécificité du test:

Une sensibilité diagnostique de 96 % a été observée avec un groupe de 24 patients présentant un kyste hydatique (*E. granulosus*). La majorité (90 %) des patients souffrant d'échinococcose alvéolaire (*E. multilocularis*) sont aussi positifs avec ce test.

La spécificité de la réaction vis-à-vis d'autres parasitoses est de 82 % pour les patients souffrant d'helminthiases (toxocarose, bilharziose, cysticercose, filariose, anguillulose et distomatose; n=51) et de 83 % pour les patients atteints de protozooses (amibiase, leishmaniose et paludisme; n=23). La spécificité de la réaction avec des sérums de donneurs de sang suisses est de 97 % (n=150). Une étude interne a montré que les sérums lipémiques, ictériques ou hémolysés ne présentaient pas de problèmes pour la réalisation de ce test.

Dans les conditions de recrutement habituel d'un laboratoire d'analyses biologiques en Europe, la valeur prédictive d'un test négatif est proche de 100 %. Par contre un résultat positif devra dans tous les cas être confirmé par un test possédant une plus grande spécificité (ELISA Em2-Em18 (Art. N° 9300) et immunoblot sur la protéine de 8 kD).

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

	Répétabilité		Reproductibilité	
	Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon 1	Echantillon 2
Moyenne (densité optique)	0.586	1.416	0.684	1.654
Ecart-type (densité optique)	0.027	0.064	0.024	0.079
Coefficient de variation (%)	4.6	4.5	3.5	4.8

Références:

Gottstein, B. (1992) Molecular and Immunological diagnosis of Echinococcosis. Clin. Microbiol. Rev. **5** : 248-261.

Gottstein, B., Jacquier, P., Bresson-Hadni, S. and Eckert, J. (1993) Improved primary immunodiagnosis of Alveolar Echinococcosis in humans by an enzyme-linked immunosorbent assay using the Em2^{plus} antigen. J. Clin. Microbiol. **31**: 373-376.

Poretti, D., Felleisen, E., Grimm, F., Pfister, M., Teuscher, F., Zuercher, C., Reichen, J. and Gottstein, B. (1999) Differential immunodiagnosis between cystic hydatid disease and other cross-reactive pathologies. Am. J. Trop. Med. Hyg. **60**: 193-198.



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

