

LEISHMANIA INFANTUM

Test immunoenzymatique pour le diagnostic de la leishmaniose viscérale

96 tests sur barrettes sécables destinés à un usage *in vitro*



Instructions d'utilisation pour l'article N° 9500
N° CE: H-CH/CA01/IVD/01756

Utilisations prévues du produit:

Diagnostic sérologique (IgG) de la leishmaniose viscérale. Surveillance épidémiologique. Dépistage systématique chez les patients infectés par le VIH ayant séjourné en zone d'endémie. Suivi post-thérapeutique des patients co-infectés VIH-Leishmania.

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 les antigènes solubles de promastigotes de *Leishmania infantum*. La présence d'anticorps sériques spécifiques vis-à-vis des antigènes parasitaires 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 | 9500-01 | Barrettes sécables sensibilisées avec les antigènes solubles promastigotes de <i>Leishmania infantum</i> | 96 | puits |
| DILB | 9500-02 | Tampon de dilution (concentré 10 x) | 50 | ml |
| WASH | 9500-03 | Solution de lavage (concentrée 10 x) | 50 | ml |
| ENZB | 9500-04 | Tampon de l'enzyme | 50 | ml |
| STOP | 9500-05 | Solution d'arrêt (K ₃ PO ₄) | 25 | ml |
| CONTROL - | 9500-06 | Sérum de contrôle négatif | 200 | µl |
| CONTROL -/+ | 9500-07 | Sérum de contrôle faiblement positif (seuil) | 200 | µl |
| CONTROL + | 9500-08 | Sérum de contrôle positif | 200 | µl |
| CONJ | 9500-09 | Conjugué protéine A – phosphatase alcaline | 300 | µl |
| SUBS | 9500-10 | 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.

Equipement 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 9500-01 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 9500-02, 1/10 dans de l'eau distillée.

Solution de lavage: diluer la solution de lavage concentrée 10 x 9500-03, 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 9500-06 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 9500-09, 1/51 dans la solution de tampon de dilution.

Solution de substrat: équilibrer le tampon de l'enzyme 9500-04 à température ambiante. Avant l'addition du substrat de la phosphatase aux puits ELISA, dissoudre le nombre nécessaire de tablettes de substrat 9500-10 dans le tampon de l'enzyme 9500-04 non dilué (une tablette dans 2.5 ml de tampon). Vortexer jusqu'à dissolution complète de la tablette.

Solution d'arrêt: utiliser le réactif 9500-05 non dilué.



Précautions d'utilisation: Les solutions 9500-02, 9500-03, 9500-04 et 9500-09 contiennent respectivement 0.1%, 0.05%, 0.01% et 0.1% d'azide de sodium (N_3Na). La solution 9500-02 contient 0.02% de merthiolate. Ces substances sont toxiques. La solution d'arrêt 9500-05 (0.5 M K_3PO_4) est irritante.

Les sérums de contrôles négatif, faiblement positif et positif (9500-06 à -08) sont d'origine canine.

Volumes à préparer:

| | | | Nombre de puits à utiliser | | | |
|----------------------------------|------------------------------------|-------------------------------|----------------------------|-----------|-----------|-----------|
| | | | 3-4 | 5-6 | 7-8 | 9-10 |
| Tampon de dilution (10 x) | 9500-02 + H ₂ O | ml + ml | 1 + 9 | 2 + 18 | 3 + 27 | 4 + 36 |
| Sol. de lavage (10 x) | 9500-03 + H ₂ O | ml + ml | 1 + 9 | 2 + 18 | 3 + 27 | 4 + 36 |
| Conjugué | 9500-09 + tampon de dilution | μl + μl | 10 + 500 | 15 + 750 | 20 + 1000 | 25 + 1250 |
| Sérums de contrôles | 9500-06 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 | 9500-10 + 9500-04 | 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 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 < 15% du contrôle positif, DO du blanc contre l'air < 0.350.

La concentration en anticorps du sérum seuil 9500-07 a été ajustée de manière à permettre une distinction optimale entre les sérums de cas cliniques de leishmaniose 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 9500-07. Dans ce cas, la concentration d'anticorps IgG dirigées contre les antigènes solubles de *Leishmania infantum* 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 9500-07. Dans ce cas, la concentration d'anticorps IgG dirigées contre les antigènes solubles de *Leishmania infantum* est considérée comme cliniquement significative.

Sensibilité et spécificité du test:

Chez les patients immunocompétents atteints de leishmaniose viscérale à *L. infantum*, la sensibilité du test est supérieure à 95 %. Elle est comprise entre 60 et 85% chez les patients co-infectés VIH-*Leishmania*. Une sérologie négative en présence d'une culture positive peut être observée chez ces patients notamment lors d'immunodépression ou d'infection par d'autres espèces de leishmanie telles que *L. major* ou *L. braziliensis*.

La spécificité du test est supérieure à 95% avec des sérums de donneurs de sang suisses. Des réactions croisées peuvent avoir lieu avec des sérums de patients ayant eu d'autres infections parasitaires en particulier la trypanosomiase africaine, la maladie de Chagas et les leishmanioses cutanées et muco-cutanées. Une étude interne a montré que les sérums lipémiques, ictériques ou hémolysés ne présentaient pas de problèmes pour la réalisation de ce test.

Le test est applicable chez le chien dans les mêmes conditions.

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) | 1.005 | 1.766 | 1.381 | 2.187 |
| Ecart-type (densité optique) | 0.061 | 0.086 | 0.097 | 0.114 |
| Coefficient de variation (%) | 6.1 | 4.9 | 7.1 | 5.2 |

Références:

Badaro, R., Reed, S.G., Barral, A., Orge, G., Jones, T.C. (1986) Evaluation of the micro enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies in american visceral leishmaniasis : antigen selection for detection of infection specific responses. Am. J. Trop. Med. Hyg. **35**: 72-78.

Daleine, G., Deniau, M., Matheron, S., Lepout, C., Lebras, J. (1994) Leishmaniose viscérale au cours de l'infection à VIH : avantages du sérodiagnostic par technique ELISA. Pres. Med. **23** : 672-673.

Nassar, N., Gangneux, J.P., Sulahian, A., Derouin, F. (1996) Leishmaniose viscérale au cours du sida : Difficultés du diagnostic sérologique, évaluation d'une nouvelle trousse ELISA. Feuilles de Biologie. **37**: 39-42.

Senaldi, G., Xiao-su, H., Hoessli, D.C., Bordier, C. (1996) Serological diagnosis of visceral leishmaniasis by a dot-enzyme immunoassay for the detection of a *Leishmania donovani*-related circulating antigen. Journal of Immunological Methods. **193**: 9-15.

Maia, C., Nunes, M., Cristovao, J., Campino, L. (2010) Experimental canine leishmaniasis: Clinical, parasitological and serological follow-up. Acta Tropica. **116**: 193-199.



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

