

**NovaLisa<sup>®</sup>**

# **Leishmania infantum IgG**

**ELISA**

**CE**

---

---

# FRANÇAIS

## 1. INTRODUCTION

Les Leishmania sont des protozoaires appartenant à la famille des Trypanosomatidae. Ces parasites existent sous deux formes: les promastigotes présent dans les vicères de l'insecte vecteur, et les amastigotes dans les phagolysosomes des macrophages des mammifères hôtes. Dans les macrophages, on les retrouve sous la forme d'amastigotes arrondis non mobiles (3-7 µm de diamètre). Les macrophages sont ingérés par le Phlébotome pendant le repas sanguin et les amastigotes sont libérés dans leur estomac. Presque immédiatement les amastigotes se transforment en promastigote de forme flagellée, ovales (10-20µm) et mobiles, qui migrent vers l'appareil alimentaire de la mouche et après multiplication vers les glandes salivaires de l'insecte. Les Leishmanioses sont un groupe de maladies parasitaires largement répandu; Le "type" est déterminé par le site primaire d'infection des macrophages. Chez l'homme quatre formes différentes de leishmaniose avec une large gamme de manifestations cliniques sont présentes; tous peuvent avoir des conséquences dévastatrices. La leishmaniose touche actuellement environ 12 millions de personnes dans 88 pays, à l'exception de 16 d'entre eux, tous sont dans des pays en voie de développement. On estime que 350 millions de personnes sont exposés au risque d'infection par les différentes espèces de parasite responsable de la Leishmaniose; l'incidence annuelle de nouveaux cas est environ de 2 millions (1-1,5 millions de cas de la forme CL, 500.000 cas de la forme VL). La leishmaniose viscérale (VL) est la forme la plus grave de la maladie, qui, si non traitée, atteint un taux de mortalité d'environ 100%. Comme beaucoup d'autres maladies tropicales, les leishmanioses sont liées au niveau de développement économique et aux changements environnementaux réalisés par l'homme, qui augmentent l'exposition au Phlébotome, vecteur de la maladie. La répartition géographique est limitée par la distribution du Phlébotome. Le SIDA et les autres états entraînant une immunosuppression augmentent le risque d'infection par Leishmania et le développement du type viscérale (VL) chez cette population. Les co-infections Leishmaniose/HIV sont considérées comme une vraie "maladie émergente", particulièrement en Europe du sud-ouest, où 25-70% de cas de VL chez l'adulte sont liés à l'infection par le HIV, et 1,5-9,5% des cas de SIDA souffrent de Leishmaniose de forme VL nouvellement d'acquise ou réactivés. Les toxicomanes s'injectant des drogues par la voie intraveineuse ont été identifiés comme principale population à risque.

Espèce	La maladie	Symptômes (p.ex.)	Modes de transmission
Leishmania infantum Leishmania donovani	Leishmaniose viscérale (VL) ou kala-azar	Pics irréguliers de fièvre, perte substantielle de poids, gonflement de la rate et du foie et anémie.	Transmission (par l'intermédiaire la salive) lors de la piqûre par des femelles infectées du Phlébotome du genre <u>Phlebotomus</u> dans le vieux monde et <u>Lutzomya</u> dans le nouveau monde.
Leishmania major	Leishmaniose cutanée (CL)	Lésions de peau auto-limitantes	
Leishmania brasiliensis	Leishmaniose cutanéomuqueuse (MCL)	Ulcères de la peau pouvant se disséminer et causer des destructions de tissu effroyable	
Leishmania mexicana	Leishmaniose cutanéomuqueuse diffuse (DCL)	Lésions disséminées et chroniques ressemblant à ceux de la lèpre lépromateuse	

L'identification de l'agent pathogène ou d'une infection par:

- Microscopie
- Sérologie: Détection des anticorps par IF, ELISA

## 2. INDICATION D'UTILISATION

La trousse Leishmania infantum IgG ELISA est prévue pour la détection qualitative des anticorps IgG anti-Leishmania infantum dans le sérum humain ou plasma (citrate, héparine).

## 3. PRINCIPE DU TEST

La détermination immunoenzymatique qualitative des anticorps spécifiques est basée sur le la technique ELISA (du anglais, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

Microplaques sont recouvertes d'antigènes spécifiques pour lier les anticorps correspondants de l'échantillon. Après le lavage des puits pour éliminer l'échantillon détaché, le conjugué peroxydase de raifort (HRP) est ajouté. Ce conjugué se lie aux anticorps capturés. Dans une deuxième étape de lavage, le conjugué non lié est éliminé. Le complexe immun formé par le conjugué lié est visualisé par l'addition tétraméthylbenzidine (TMB) qui donne un produit de réaction bleu.

L'intensité de ce produit est proportionnelle à la quantité d'anticorps spécifiques dans l'échantillon. L'acide sulfurique est ajouté pour arrêter la réaction. Cela produit un changement du bleu au jaune. L'absorbance à 450/620 nm est lue en utilisant un lecteur de microplaques ELISA.

## 4. MATERIEL

---

### 4.1. Réactifs fournis

- **Leishmania infantum (IgG) microplaque revêtus:** 12 barrettes de 8 puits sécables revêtus d'antigène d'*Leishmania infantum*; en sachets d'aluminium refermables.
- **Diluant pour échantillon IgG:** 1 flacon contenant 100 ml de tampon phosphaté (10 mM) pour la dilution de l'échantillon; pH  $7,2 \pm 0,2$ ; prêt à l'emploi; couleur jaune; bouchon blanc.
- **Solution d'arrêt:** 1 flacon contenant 15 ml d'acide sulfurique, 0,2 mol/l; prêt à l'emploi; bouchon rouge.
- **Tampon de lavage (concentré x 20):** 1 flacon contenant 50 ml d'un tampon phosphaté (0,2 M) concentré 20 fois (pH  $7,2 \pm 0,2$ ) pour laver les puits; bouchon blanc.
- **Conjugué Leishmania infantum Protéine A:** 1 flacon contenant 20 ml d'protéine A conjugués à de la peroxydase du raifort dans le tampon phosphaté (10 mM); prêt à l'emploi; couleur bleue, bouchon noir.
- **Solution de substrat TMB:** 1 flacon contenant 15 ml de 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB), < 0,1 %; prêt à l'emploi; bouchon jaune; < 5% NMP.
- **Contrôle positif Leishmania infantum IgG:** 1 flacon contenant 2 ml contrôle (sérum humain ou plasma); prêt à l'emploi; couleur jaune; bouchon rouge.
- **Contrôle cut-off Leishmania infantum IgG:** 1 flacon contenant 3 ml contrôle (sérum humain ou plasma); prêt à l'emploi; couleur jaune; bouchon vert.
- **Contrôle négatif Leishmania infantum IgG:** 1 flacon contenant 2 ml contrôle (sérum humain ou plasma); prêt à l'emploi; couleur jaune; bouchon bleu.

Pour les substances potentiellement dangereuses s'il vous plaît vérifiez la fiche de données de sécurité.

### 4.2. Matériel fourni

- 1 couvercle autocollante
- 1 instructions d'utilisation
- 1 présentation de la plaque

### 4.3. Matériel et équipement requis

- Lecteur de microplaques ELISA, pour mesurer l'absorbance à 450/620 nm
- Incubateur 37°C
- Laveur manuel ou automatique pour le lavage des puits
- Pipettes pour utilisation entre 10 et 1000 µl
- Mélangeur Vortex
- Eau distillée
- Tubes jetables

## 5. STABILITE ET CONSERVATION

---

Conserver le kit à 2...8 °C. Les réactifs ouverts sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette lorsqu'il est conservé à 2...8 °C.

## 6. PREPARATION DES REACTIFS

---

Il est très important porter tous les réactifs et échantillons à température ambiante (20 ... 25 °C) et les mélanger avant de commencer le test!

### 6.1. Microplaque revêtues

Les barrettes sécables sont revêtues d'antigène d'*Leishmania infantum*. Immédiatement après avoir prélevé les barrettes nécessaires, les barrette restantes doivent être scellés le vide dans de feuille d'aluminium avec le sac de silicium (le déshydratant) fourni et emmagasiner à 2...8 °C.

### 6.2. Tampon de lavage (conc. x 20)

Diluer le Tampon de lavage 1+19; par exemple 10 ml du Tampon de lavage + 190 ml d'eau distillée. L'échantillon de tampon diluée est stable pendant 5 jours à la température ambiante (20...25 °C). Cas apparaissent des cristaux dans le concentré, chauffer la solution à 37 °C par exemple dans un bain-marie mélangez bien avant dilution.

### 6.3. Solution de substrat TMB

La solution est prête à utiliser et doit être emmagasiné à 2...8 °C, à l'abri de la lumière. La solution doit être incolore ou pourrait avoir une légère couleur bleu clair. Si le substrat devient bleu, il peut avoir été contaminé et ne peut pas être utilisé dans le test.

## 7. PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

---

Utiliser des échantillons humain de sérum ou plasma (citrate, héparine) pour ce test. Les instructions d'utilisation ABVL0001 doit être utilisé pour le LCS. Si le Test est réalisé dans les 5 jours après le prélèvement, les échantillons doivent être conservés à 2...8 °C; autrement ils doivent être aliquotés et conservés surgelés (-70...-20 °C). Si les échantillons sont conservés congelés, bien mélanger les échantillons décongelés avant le Test. Éviter les cycles répétés de congélation et décongélation. L'inactivation par la chaleur des échantillons n'est pas recommandée.

### 7.1. Dilution de l'échantillon

Avant du test, tous les échantillons doivent être dilués 1 + 100 avec diluant de l'échantillon IgG. Diluer 10 µl d'échantillon avec 1 ml I diluant de l'échantillon IgG dans des tubes pour obtenir une dilution 1 + 100 et mélanger soigneusement sur un Vortex.

## 8. PROCEDE DE TEST

---

### 8.1. Préparation du Test

Lire attentivement les instructions d'utilisation **avant de** réaliser le test. La fiabilité des résultats dépend du suivi strict d'utilisation comme décrit. La technique de test suivante a été validée uniquement pour une procédure manuelle. Si le test doit être effectué sur un systèmes automatiques pour ELISA, nous conseillons d'augmenter le nombre d'étapes de lavage de trois à cinq et le volume du Tampon de lavage de 300 à 350 µl. Faites attention au chapitre 12. Avant de commencer le test, le plan de distribution et d'identification de tous les échantillons et les étalons/contrôles (il est recommandé déterminer en double) doivent être soigneusement établi sur la feuille présentation de la plaque prévue dans le conseil de kit. Sélectionner le nombre de barrettes ou de puits nécessaires et les placer sur le support.

Réaliser toutes les étapes du test dans l'ordre donné et sans délai.

Un embout de pipette propre et jetable doit être utilisé pour distribuer chaque étalon/contrôle et échantillon.

Régler l'incubateur à 37 ± 1 °C.

1. Pipeter 100 µl de étalons/contrôles et d'échantillons dilués dans leurs puits respectifs. Garder le puits A1 pour le blanc substrat.
2. Couvrir les puits avec le couvercle, fourni dans le kit.
3. **Incuber pendant 1 heure ± 5 minutes à 37 ± 1 °C.**
4. A la fin de l'incubation, enlever le couvercle, aspirer le contenu des puits et laver chaque puits trois fois avec 300 µl du Tampon de lavage. Éviter les débordements des puits de réaction. L'intervalle entre le cycle de lavage et l'aspiration doit être > 5 sec. À la fin, enlever soigneusement le liquide restant en tapotant les barrettes sur du papier absorbant avant la prochaine étape.  
Note: L'étape de lavage est très importante! Un lavage insuffisant peut conduire à une précision faible et de faux résultats !
5. Pipeter 100 µl du conjugué dans tous les puits sauf le puits Blanc A1.
6. **Incuber pendant 30 minutes à température ambiante (20...25°C).** N'exposer pas à la lumière directe du soleil.
7. Répéter l'étape numéro 4.
8. Pipeter 100 µl de la solution de substrat TMB dans tous les puits.
9. **Incuber pendant exactement 15 minutes à température ambiante (20...25°C) dans l'obscurité.** Une couleur bleue se produit en raison d'une réaction enzymatique.
10. Pipeter 100 µl de la solution d'arrêt dans tous les puits dans le même ordre et à la même vitesse que pour la solution de substrat TMB, ainsi, il y a un changement du bleu au jaune.
11. Mesurer l'absorbance à 450/620 nm dans les 30 minutes après l'addition de la solution d'arrêt.

### 8.2. Mesure

Réglez le lecteur de microplaques ELISA à **zéro** en utilisant le **Blanc substrat**.

Si - pour des raisons techniques - le lecteur de microplaques ELISA ne peut pas être ajusté à zéro en utilisant le Blanc substrat, la valeur d'absorbance de cette doit être soustraire la valeur d'absorbance de toutes les autres valeurs d'absorbance mesurées afin d'obtenir des résultats fiables!

**Mesurer l'absorbance** de tous les puits à **450 nm** et enregistrer les valeurs d'absorbance pour chaque étalon/contrôle et échantillon dans la présentation de la plaque.

Il est recommandé d'effectuer la mesure **dichromatique** utilisant 620 nm comme longueur d'onde de référence.

Si doubles déterminations ont été effectuées, calculer **les valeurs moyennes d'absorbance**.

## 9. RESULTATS

### 9.1. Critères de validation

Afin de valider le Test, les critères suivants doivent être respectés:

- **Blanc Substrat:** Valeur d'absorbance < **0,100**
- **Contrôle négatif:** Valeur d'absorbance < **0,200** et < **Cut-off**
- **Contrôle cut-off:** Valeur d'absorbance **0,150 – 1,300**
- **Contrôle positif:** Valeur d'absorbance > **Contrôle cut-off**

Lorsque ces critères ne sont pas remplis, le test n'est pas valide et doit être recommencé.

### 9.2. Calcul des résultats

La valeur seuil correspond à la moyenne des valeurs d'absorbance du Contrôle cut-off.

Exemple:  $0,44 \text{ OD Contrôle cut-off} + 0,42 \text{ OD Contrôle cut-off} = 0,86 : 2 = 0,43$   
Cut-off = 0,43

#### 9.2.1. Résultats en unités [NTU]

$\frac{\text{Valeur (moyenne) d'absorbance de l'échantillon} \times 10}{\text{Cut-off}} = [\text{unités NovaTec} = \text{NTU}]$

Exemple:  $\frac{1,591 \times 10}{0,43} = 37 \text{ NTU}$

### 9.3. Interprétation des résultats

Cut-off	10 NTU	-
Positif	> 11 NTU	Les anticorps dirigés contre l'agent pathogène sont présents. Il ya eu un contact avec l'antigène (pathogène resp. vaccin).
Zone grise	9 – 11 NTU	Les anticorps dirigés contre l'agent pathogène ne pouvaient pas être détectés clairement. Il est recommandé de répéter le test avec un échantillon frais dans 2 à 4 semaines. Si le résultat est encore dans la zone grise l'échantillon est jugé <b>négatif</b> .
Négatif	< 9 NTU	L'échantillon ne contient pas d'anticorps contre l'agent pathogène. Un contact préalable avec l'antigène (pathogène resp. vaccin) est peu probable.

Le diagnostic d'une maladie infectieuse ne devrait pas être établi sur la base du résultat d'une seule analyse. Un diagnostic précis devrait prendre en considération l'histoire clinique, la symptomatologie ainsi que les données sérologiques. Les données sérologiques sont de valeur limitée dans le cas des patients immunodéprimés et des nouveaux-nés.

## 10. PERFORMANCES DU TEST

Ces résultats s'appuient sur les groupes d'échantillons étudiés; il n'agit pas de caractéristiques techniques garanties.

Pour plus d'informations sur les performances du Test s'il vous plaît contactez NovaTec Immundiagnostica GmbH.

### 10.1. Précision

<b>Intra-essai</b>	<b>n</b>	<b>moyenne (E)</b>	<b>CV (%)</b>
#1	24	0,463	4,25
#2	24	1,245	5,95
#3	24	0,727	3,59
<b>Inter-essai</b>	<b>n</b>	<b>moyenne (NTU)</b>	<b>CV (%)</b>
#1	12	27,34	4,94
#2	12	29,33	6,54
#3	12	1,23	14,19

### 10.2. Spécificité diagnostique

La spécificité diagnostique est définie comme la probabilité d'obtenir un résultat négatif en l'absence d'un analyte spécifique. Elle est 92,59% (95% Intervalle de confiance: 82,11% - 97,94%).

### 10.3. Sensibilité diagnostique

La sensibilité diagnostique est définie comme la probabilité d'obtenir un résultat positif en présence d'un analyte spécifique. Elle est 90,91% (95% Intervalle de confiance: 70,84% - 98,88%).

#### 10.4. Interférences

Des échantillons hémolytiques ou lipémiques ou ictériques n'ont pas montré d'interférences, avec des concentrations jusqu'à 10 mg/ml de hémoglobine, 5 mg/ml de triglycérides et 0,5 mg/ml de bilirubine.

#### 10.5. Réaction croisée

Une réaction croisée d'antigène de Leishmania avec les anticorps de Chagas ne peut pas être exclue.

### 11. LIMITES DE LA TECHNIQUE

---

Une contamination bactérienne ou des cycles de congélation/décongélation répétés de l'échantillon peuvent affecter les valeurs d'absorption.

### 12. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

---

- En accord avec l'article 1 paragraphe 2b de la directive européenne 98/79/EC, l'utilisation des dispositifs médicaux de diagnostic in vitro est destinée par le fabricant à garantir le bien-fondé, les performances et la sécurité du produit. Par conséquent, la procédure de test, l'information, les précautions et mises en garde de la notice d'emploi, doivent être suivies de façon stricte. L'utilisation de ces trousse avec des automates ou dispositifs similaires doit être validée. Aucun changement de la conception, composition et procédure de test, ainsi que l'utilisation avec d'autres produits non approuvés par le fabricant, ne sont pas autorisés; seul l'utilisateur est responsable de tels changements. Le fabricant n'est pas responsable des faux résultats et des incidents dus à ces motifs. Le fabricant n'est pas responsable des résultats fournis par analyse visuelle des échantillons des patients.
- Uniquement pour diagnostic in vitro.
- Tous les matériaux d'origine humaine ou animale doivent être considérés et traités comme étant potentiellement infectieux.
- Tous les composants d'origine humaine utilisés pour la fabrication de ces réactifs ont été analysés et ont été trouvés non réactifs en Ag HBs, en anticorps anti-VHI 1 et 2 et en anticorps anti-VHC.
- Ne pas échanger les réactifs ou les barrettes provenant de différents lots de production.
- Ne pas utiliser de réactifs provenant d'autres fabricants avec les réactifs de cette trousse.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
- Utiliser seulement des embouts de pipette, des distributeurs et du matériel de laboratoire propres.
- Ne pas échanger les bouchons des flacons, pour éviter la contamination croisée.
- Fermer soigneusement les flacons après utilisation pour éviter l'évaporation et la contamination microbienne.
- Avant une nouvelle utilisation, vérifier les flacons de conjugué et de étalon/contrôle, déjà utilisés, pour exclure une contamination microbienne.
- Pour éviter la contamination croisée et des résultats faussement élevés, introduire les échantillons de patients et les réactifs exactement au fond des puits sans éclabousser.
- Le ELISA est uniquement destinée à l'utilisation par un personnel compétent, maîtrisant parfaitement les techniques de travail.

#### 12.1. Elimination des déchets

Les résidus des produits chimiques et des préparations sont considérés en général comme des déchets dangereux. L'élimination de ce type de déchet est réglementée par des lois et réglementations nationales et régionales. Contacter les autorités compétentes ou les sociétés de gestion des déchets pour obtenir des renseignements sur l'élimination des déchets dangereux.

### 13. INFORMATION POUR LES COMMANDES

---

Référence: LEIG0310 Leishmania infantum IgG ELISA (96 déterminations)