

TEST IMMUNO-ENZYMATIQUE POUR LA DÉTECTION DES ANTICORPS IgM ANTI-*Brucella* spp. DANS LE SÉRUM OU LE PLASMA HUMAIN PAR TECHNIQUE IMMUNOENZYMATIQUE

1 - USAGE PRÉVU

Test immuno-enzymatique pour la détection des anticorps IgM anti-*Brucella* spp. Dans le sérum ou le plasma humain par technique immuno-enzymatique.

2 - GÉNÉRALITÉS CLINIQUES ET EXPLICATION DU TEST

La brucellose est une maladie infectieuse causée par des bactéries *Brucella* spp. Il existe quatre germes différents : *Br. melitensis*, *Br. abortus*, *Br. suis* et *Br. canis*.

L'infection chez les humains est principalement causée par *Brucella melitensis* ("Fièvre de Malte"), *Brucella abortus* ("Maladie de Bang") et *Brucella suis*. Le pathogène est transmis par les animaux infectés (zoonose), leurs excréments, la nourriture contaminée, tout particulièrement les produits laitiers non pasteurisés. Les personnes pouvant être touchées sont les bouchers, fermiers, propriétaires d'animaux, vétérinaires et touristes des pays du sud.

La maladie commence avec des symptômes généraux progressant vers une fièvre modérée qui annonce le début de la phase aiguë. Cette phase est caractérisée par une augmentation de la fièvre le soir, l'hépatomégalie et la splénomégalie ou des ganglions lymphatiques gonflés. Une fièvre ondulante, interrompue par des épisodes afebriles, est caractéristique des infections à *Brucella melitensis* et *Brucella suis*.

La rémission spontanée ou la transition vers un stade chronique accompagné d'une grande diversité de symptômes est possible. Lors du stade chronique, de multiples organes ou systèmes d'organes, des os et des articulations peuvent être touchés.

L'endocardite bactérienne est mortelle si elle n'est pas traitée. Des signes neurologiques ou même psychiatriques peuvent se manifester au cours des stades tardifs de la brucellose.

Le diagnostic peut être réalisé par détection directe du pathogène ou par des méthodes de sérologie indirectes telles que les tests d'agglutination, les tests de fixation du complément ou des techniques EIA.

La présence dans le sérum des anticorps IgM anti-*Brucella* spp. est dans la majorité des cas significatif d'une forme de brucellose aiguë.

3 - PRINCIPE DU TEST

Les puits de la microplaque sont sensibilisés par des antigènes de *Brucella abortus* purifiés incluant des épitopes communs à *B. abortus*, *B. melitensis* et *B. suis*. Si les anticorps contenus dans l'échantillon de sérum du patient sont présents, ils se lient à l'antigène fixé. Un anticorps secondaire, qui a été préalablement conjugué avec l'enzyme phosphatase alcaline, détecte le complexe immun et s'y lie. Le substrat incolore p-nitrophénylphosphate est ensuite transformé en un produit coloré, le p-nitrophénol. L'absorbance mesurée par une méthode photométrique pour un échantillon permet de conclure quant à la présence ou l'absence d'anticorps dans l'échantillon testé. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité d'anticorps IgM anti-*Brucella* spp. liés sur la phase solide.

4 - RÉACTIFS

4.1 Composition

Identification sur étiquetage		Nature des réactifs	Présentation/Préparation 72523 96 tests
R1	Microplate	Microplaque 12 barrettes de huit puits unitaires sensibilisés avec des Ag de <i>Brucella abortus</i> purifiés incluant des épitopes communs à <i>B. abortus</i> , <i>B. melitensis</i> et <i>B. suis</i>	1 plaque Prêt à l'emploi
R2	Concentrated Washing Solution (30X)	Solution de lavage (concentrée 30X) Solution de chlorure de sodium avec Tween 20 et 30 mM Tris/HCl, pH 7,4 Conservateur < 0,1 % azoture de sodium	33,3 ml A diluer
R3	Negative Control	Contrôle négatif (Humain) Protéine sérique humaine contenant du tampon phosphate Conservateur : < 0,1 % azoture de sodium Colorant : Vert de lissamine V	2 ml Prêt à l'emploi
R4	Standard	Standard (Humain) Protéine sérique humaine contenant du tampon phosphate Conservateur : < 0,1 % azoture de sodium Colorant : Amaranth O	2 x 2ml Prêt à l'emploi

R5	Sample Diluent	Diluent échantillon Protéine contenant du tampon phosphate avec Tween 20 Conservateur : < 0,1 % azoture de sodium Colorant : 0,01 g/l bleu de bromophénol	3 x 30ml Prêt à l'emploi
R6	Conjugate	Conjugué Anti-IgG humain conjugué à la Phosphatase Alcaline, stabilisé avec une solution contenant des protéines Conservateur : 0,01 % méthylisothiazolone, 0,01 % bromnitrodioxane	13 ml Prêt à l'emploi
R7	Substrate	Substrat Para-nitrophénylphosphate dans un solvant ne contenant pas de tampon Conservateur : < 0,1 % azoture de sodium	13 ml Prêt à l'emploi
R8	Stopping solution	Solution d'arrêt Hydroxyde de sodium NaOH < 0.1 N	15 ml Prêt à l'emploi
R9	Rf Absorbent	Absorbant du facteur rhumatoïde Le sérum anti-IgG humain immunitaire transformé à base de moutons ou de chèvres Conservateur : < 0,1% d'azoture de sodium	7 ml Prêt à l'emploi

4.2 Conditions de conservation et recommandation de manipulation

La trousse doit être gardée à +2-8°C et peut être utilisée après ouverture jusqu'à la date de péremption si les réactifs sont conservés dans leur emballage d'origine.

Identification	Conservation
R1 - Microplate	Après ouverture, 4 semaines à +2-8°C si elle est conservée dans le sachet fourni
R2 - Concentrated Washing Solution (30X)	Après dilution, 1 semaine à température ambiante ou 2 semaines à +2-8°C

Le substrat est prêt à l'emploi. Ne pas exposer le substrat à une lumière directe.

5 - PRECAUTIONS ET CONSIGNES D'HYGIÈNE ET DE SÉCURITÉ

Tous les réactifs de la trousse sont destinés à l'usage du diagnostic "in vitro" et à usage professionnel seulement.

5.1 Précautions

- Tous les composants du sang humain ont été testés et trouvés négatifs pour le VIH, le VHB et le VHC. Toutefois ils doivent être traités comme potentiellement infectieux, manipulés et éliminés avec les précautions d'usage.
- Les échantillons sanguins peuvent contenir des agents pathogènes. Des gants doivent être portés pendant toute la procédure. Tous les déchets doivent être décontaminés et éliminés selon les règles appropriées.
- Tous les équipements doivent faire l'objet d'une maintenance et calibration selon les instructions du fabricant.
- Ne pas mélanger des réactifs de lots différents au cours d'un même test.
- Remarque : La solution de lavage, le substrat et la solution d'arrêt sont interchangeables entre les lots et seulement entre les trousse fabriquées par Institut Virion\Serion sans affecter significativement les performances du produit.
- Assurez-vous que les bouchons soient remis sur les flacons d'origine.
- Ne pas utiliser de réactifs après la date d'expiration.
- Le test n'est valable que si les critères de validation, spécifiques au lot en question, et figurant sur le certificat de contrôle de la qualité sont respectés.
- Le substrat, dans le flacon non ouvert, peut avoir une coloration légèrement jaunâtre, qui ne réduit pas la qualité du produit.

5.2 Consignes d'hygiène et de sécurité

- Ces trousse sont destinées à être utilisées par un personnel dûment formé et qualifié.
- Tous les réactifs de la trousse et les prélèvements humains doivent être manipulés avec précaution, en usant des bonnes pratiques de laboratoire.
- Il ne faut pas pipeter à la bouche.
- Il ne faut pas fumer, consommer de la nourriture ou des boissons dans les endroits où les réactifs de la trousse ou les échantillons sont manipulés.
- Utilisez des gants jetables et portez une blouse et des lunettes de protection lors de la manipulation des réactifs de la trousse ou des échantillons. Lavez-vous bien les mains après la manipulation.
- Les échantillons de patients et autres produits potentiellement infectieux doivent être décontaminés après chaque série de tests.
- Les réactifs doivent être stockés dans un endroit sûr et doivent être inaccessibles pour les personnes non autorisées, comme des enfants.

- La fiche technique de sécurité est disponible sur www.bio-rad.com.
- Utilisez des lunettes de protection, des gants et une blouse lors de la manipulation.
- Élimination : Veuillez respecter les dispositions légales pertinentes.

6 - ÉCHANTILLONS

Les échantillons de sérum ou plasma (collectés sur EDTA, citrate, héparine) peuvent être utilisés. Ils peuvent être conservés à +2-8°C pendant une semaine avant le test. Si une conservation plus longue est requise, les échantillons doivent être congelés à -20°C ou moins et bien homogénéisés après décongélation. Ils peuvent être congelés et décongelés 5 fois. Les échantillons dilués peuvent être stockés entre +2-8°C pendant une semaine.

Les échantillons lipémique, hémolytique ou ictérique (sérum ou plasma) doivent être analysés avec réserve seulement. Les échantillons qui sont à l'évidence contaminés ne doivent pas être analysés. Les échantillons ne doivent pas être inactivés thermiquement.

7 - PROCÉDURE

7.1 Matériel nécessaire mais non fourni

- Equipement général de laboratoires.
- Pipettes, multipipettes automatiques ou semi-automatiques, réglables ou fixes, pour mesurer et délivrer les échantillons et les réactifs.
- Plaques standard (96 puits) ou plaques deep well (96 puits) ou tubes à échantillons
- Appareil de lecture pour microplaques équipé de filtres 405 nm, longueur d'onde de référence recommandée entre 620 nm à 690 nm.
- Incubateur de microplaques thermostaté à 37°C.
- Les équipements doivent être en mesure d'assurer les tolérances suivantes :
Volume distribué $\pm 10\%$.
Température d'incubation $\pm 2^\circ\text{C}$.
Durée d'incubation ± 2 minutes.

7.2 Interférence avec les facteurs rhumatoïdes

Les facteurs rhumatoïdes sont des auto-anticorps principalement de la classe des IgM, ils sont préférentiellement liés aux complexes immuns IgG. La présence des anticorps non-spécifique IgM (facteurs rhumatoïdes) peuvent être le résultat de faux positifs lors des tests IgM. De plus, il est possible que les des faibles liaisons spécifiques à l'anticorps IgM puissent être supplantées par des liaisons d'anticorps IgG conduisant à un résultat de faux négatifs lors du test IgM. Il est donc nécessaire, de prétraiter les échantillons avec l'absorbant de facteurs rhumatoïdes juste avant la détection des IgM. Pour une meilleure utilisation du Rf Absorbant, l'échantillon du patient est incubé avec le Rf absorbant pendant 15 minutes à température ambiante ou toute la nuit à 4°C.

7.3 Préparation des réactifs

Tous les réactifs doivent être à température ambiante avant leur utilisation. Immédiatement après utilisation, procéder aux conditions de conservation recommandées. Préparer la solution de lavage au 1/30^e avec de l'eau distillée.

7.4 Protocole du test (Manuel)

Suivez les bonnes pratiques de laboratoire.

Avant de démarrer le test, l'absorbant Rf (R9) doit être dilué au 1/4^e avec le diluant d'échantillon (R5).

L'échantillon du patient doit être dilué au 1/100^e avec la solution tampon du Rf dilué précédemment.

Incuber pendant 15 minutes à température ambiante ou toute la nuit à 4°C.

Après dilution et avant pipetage de micro-titration dans la plaque, les échantillons doivent être mélangés pour préparer une solution homogène.

Sortir de l'emballage protecteur, le cadre support, barrettes et puits (R1) nécessaires pour les échantillons et les contrôles. Réfermez soigneusement le sachet pour qu'il soit étanche à l'air.

Utiliser 1 puits blanc de substrat, le contrôle négatif (en simple) et le standard en double à chaque série de tests.

Établir soigneusement le plan de distribution et d'identification des échantillons (plan de plaque conseillé).

Un puits blanc du substrat dans A1.

Déposez **100 µl d'échantillon dilué ou de contrôles prêts à l'emploi** successivement :

- 100 µl de Contrôle Négatif dans B1
- 100 µl de Standard dans C1 et D1
- 100 µl d'échantillon dilué dans E1, etc...

Lorsque cela est possible recouvrir d'un film adhésif et incubez pendant 60 minutes ± 5 mn à 37°C $\pm 1^\circ\text{C}$.

Lavez 4 fois avec un minimum de 370 µl de la solution de lavage diluée. Tapoter pour évacuer l'excès de liquide.

Distribuer 100 µl de conjugué aux puits appropriés **sauf le blanc du substrat en A1**.

Lorsque cela est possible recouvrir d'un film adhésif et incubez pendant 30 minutes ± 2 mn à 37 °C $\pm 1^\circ\text{C}$.

Lavez 4 fois avec un minimum de 370 µl de la solution de lavage diluée. Tapoter pour évacuer l'excès de liquide.

Distribuer 100 µl de substrat à chaque puits **y compris le puits pour le blanc de**

substrat.

Lorsque cela est possible recouvrir d'un film adhésif et incubez pendant 25 minutes ± 2 mn à 37°C $\pm 1^\circ\text{C}$ (plaque couverte).

Ajoutez 100 µl de solution d'arrêt à chaque puits, secouez doucement la plaque de micro-titration pour mélanger.

Lire la densité optique (DO) dans les 30 minutes à 405 nm par rapport à un blanc de substrat et avec une longueur de référence entre 620 nm et 690 nm (ex. 650 nm).

Le blanc du substrat doit être soustrait des valeurs de DO.

7.5 Calcul et interprétation des résultats

7.5.1 Etablissement de la zone grise

1 - Calculer la moyenne des standards.

2 - Calcul de la limite inférieure de la zone grise (LGZ)

LGZ = Moyenne des standards x Lower Coefficient (qui se trouve sur le certificat de contrôle fourni avec la trousse).

3 - Calcul de la limite supérieure de la zone grise (UGZ)

UGZ = Moyenne des standards x Upper Coefficient (qui se trouve sur le certificat de contrôle fourni avec la trousse).

7.5.2 Validation du test

	Critères de validation
Blanc du substrat	DO < 0,25
R3- Negative Control	Un résultat de test négatif
R4- Standard	La moyenne des DO du Standard (après soustraction du blanc du substrat) doit être comprise dans la zone de validité du Standard indiquée sur le certificat de contrôle fourni avec la trousse
R4- Standard	La variation des DO de chaque Standard ne doit pas dépasser 20% $0.9 \times \text{Moyenne des Standards} \leq \text{Standard}^i \leq 1.1 \times \text{Moyenne des Standards}$

En cas de non respect de ces critères, le test n'est pas valide et doit être refait.

7.5.3 Interprétation des résultats

OD échantillon	Interprétation	Procédure de Retest
OD < LGZ	Négatif	Pas de retest
OD \geq UGZ	Positif	Pas de retest
LGZ \leq OD < UGZ	Douteux	Retester en parallèle avec un échantillon prélevé une ou deux semaines plus tard

8 - LIMITATIONS

Le diagnostic d'une infection *Brucella* active ne doit pas être établi d'après le résultat d'un seul dosage positif. Il faut donc prendre en considération les autres résultats sérologiques et les informations cliniques du patient.

Les réactions croisées entre *Brucella* et *Yersinia enterocolitica* 09, *Francisella tularensis*, *Vibrio cholerae* doivent être prises en compte. Des réactions positives après une vaccination contre le choléra sont également possibles.

9 - PERFORMANCES

9.1 Fidélité

La répétabilité et la fidélité intermédiaire ont été déterminées à l'aide de 3 échantillons à différentes concentrations en anticorps IgM anti *Brucella*. Les échantillons ont été testés à 20 reprises lors d'une même série pour déterminer la répétabilité.

Les échantillons ont également été testés en simple pendant 5 jours à raison de 2 essais par jour pour déterminer la fidélité intermédiaire.

Les moyennes, les écart-types et les CV ont été déterminés sur les ratios.

Répétabilité

Echantillon	N	DO moyen	ET	CV%
Négatif	20	0,228	0,016	6,8%
Faiblement positif 1	20	0,859	0,057	6,6%
Faiblement positif 2	20	0,862	0,030	3,5%
Positif	20	1,536	0,035	2,3%
Fortement positif	20	2,398	0,046	1,9%

Fidélité intermédiaire

Echantillon	N	DO moyen	ET	CV%
Négatif	10	0,219	0,019	8,7%
Faiblement positif 1	10	0,847	0,050	5,9%
Faiblement positif 2	10	0,801	0,025	3,1%
Positif	10	1,380	0,058	4,2%
Fortement positif	10	2,443	0,054	2,2%

9.2 Sensibilité et Spécificité

Afin de déterminer les caractéristiques de performance du test *Brucella* IgM SERION ELISA classic, une étude comprenant 108 sérums provenant de donneurs sains, 132 sérums provenant d'enfants (patient hospitalisés dans un hôpital pour enfant), 44 sérums provenant de patients hospitalisés souffrant d'autres maladies et 27 patients avec une infection suspectée à la Brucellose ont été testés et comparés à l'aide d'un test ELISA disponible dans le commerce. Les résultats limites n'ont pas été inclus dans les calculs de la sensibilité et la spécificité.

La spécificité a été déterminée sur 279 échantillons et trouvée à 99,3% (277/279) avec un intervalle de confiance à 95% de [97,5 – 99,9%].

La sensibilité déterminée sur 23 échantillons a été trouvée à 91,3% (21/23).

9.3 Réaction croisée

Pour la sérologie Brucellose, il est connu que ce sont les anticorps qui ont des réactions croisées avec *Yersinia*, *Francisella*, *Vibrio cholerae* et éventuellement le virus de la Dengue.

10 - RÉFÉRENCES

- [1] Araj, G.F., Lulu, A.R., Khateeb, M.I., Saadah, M.A., Shakir, R.A. (1988) ELISA versus routine tests in the diagnosis of patients with systemic and neurobrucellosis. APMIS 96, 171-6.
- [2] Ariza, J., Pellicer, T., Pallares, R., Foz, A., Gudiol, F. (1992) Specific antibody profile in human brucellosis. Clin. Infect. Dis. 14, 131-40.
- [3] BgVV, RKI (1996) Brucellosen-Erkennung und Behandlung, Merkblatt für Ärzte.
- [4] Brouqui, P., Raoult, D. (2000) Endocarditis due to rare and fastidious bacteria. Clin. Microbiol. Rev. 14, 177-207.
- [5] Corbel, M.J. (1997) Brucellosis: an overview. Emerg. Infect. Dis. 3, 213-21.
- [6] Gad El-Rab, M. O., Kambal, A. M. (1998) Evaluation of a *Brucella* enzyme immunoassay test (ELISA) in comparison with bacteriological culture and agglutination. J. Infect. 36, 197-201.
- [7] Gazapo, E., Gonzalez Lahoz, J., Subiza, J.L., Baquero, M., Gil, J., de la Concha, E.G. (1989) Changes in IgM and IgG antibody concentrations in brucellosis over time: Importance for diagnosis and follow-up. J. Infect. Dis. 159, 219-25.

<p>(BG) • Този продукт съдържа човешки или животински компоненти. Бъдете внимателни при работа с него.</p> <p>(CZ) • Tento výrobek obsahuje lidské nebo zvířecí komponenty. Zacházejte s ním opatrně.</p> <p>(DE) • Dieses Produkt enthält Bestandteile menschlichen oder tierischen Ursprungs. Vorsichtig handhaben.</p> <p>(DK) • Dette produkt indeholder humane og animalske komponenter. Skal behandles med forsigtighed.</p> <p>(EE) • Käesolev toode sisaldab inim-või loomseid komponente. Käsitleda ettevaatlikult.</p> <p>(EN) • This product contains human or animal components. Handle with care.</p> <p>(ES) • Este producto contiene componentes humanos o animales. Manejar con cuidado.</p> <p>(FI) • Tässä tuotteessa on ihmisestä tai eläimestä tai peräisin olevia osia. Käsittele varovasti.</p> <p>(FR) • Ce produit contient des composants d'origine humaine ou animale. Manipuler avec précaution.</p> <p>(GR) • Αυτό το προϊόν περιέχει ανθρώπινα ή ζωικά στοιχεία. Χειριστείτε το με προσοχή.</p> <p>(HR) • Ovaj proizvod sadrži ljudske ili životinjske sastojke. Pažljivo rukovati.</p> <p>(HU) • A készítmény emberi vagy állati eredetű összetevőket tartalmaz. Óvatosan kezelendő.</p> <p>(IT) • Questo prodotto contiene componenti umane o animali. Maneggiare con cura.</p> <p>(LT) • Šiame produkta yra žmogiškosios arba gyvūninės kilmės sudėtiniai daliai. Elgtis atsargiai.</p> <p>(MT) • Dan il-prodott fiha komponenti umani jew tal-animali. Uża b'attenzjoni.</p> <p>(NL) • Dit product bevat menselijke of dierlijke bestanddelen. Breekbaar.</p> <p>(NO) • Dette produktet inneholder humane eller animalske komponenter. Håndteres med forsiktighet.</p> <p>(PL) • Niniejszy produkt zawiera składniki pochodzenia ludzkiego lub zwierzęcego. Należy obchodzić się z nim ostrożnie.</p> <p>(PT) • Este medicamento contém componentes de origem humana ou animal. Manuseie com cuidado.</p> <p>(RO) • Acest produs conține materiale de origine umană sau animală. Manevrați-l cu grijă.</p> <p>(SE) • Denna produkt innehåller beståndsdelar från människa eller djur. Hantera produkten varsamt.</p> <p>(SI) • Izdelek vsebuje človeške ali živalske sestavine. Rokujte previdno.</p> <p>(SK) • Tento výrobok obsahuje ľudské alebo zvieracie zložky. Narábajte s ním opatrne.</p>
--

Bio-Rad

3, boulevard Raymond Poincaré • F-92430
Tel.: +33 (0)1 47 95 60 00 • Fax: +33 (0)1 47 41 91 33

DISTR.



Institut Virion\Serion GmbH
Friedrich - Bergius - Ring 19 • D- 97076 Würzburg Germany



24MOD1
2014/01