

Malaria Ab

**Essai immuno-enzymatique (ELISA) de
3^e génération pour la détermination des
anticorps anti espèces de plasmodium
dans le sérum et le plasma humains**

- pour usage diagnostique « in vitro » uniquement -



DIA.PRO

**Diagnostic Bioprobes Srl
Via G. Carducci n° 27
20099 Sesto San Giovanni
(Milan) - Italie**

Téléphone +39 02 27007161

Fax +39 02 44386771

E-mail : info@diapro.it

Code MALAB.CE
96/192/480/960 tests

Malaria Ab

A. DOMAINE D'UTILISATION

Essai immuno-enzymatique (ELISA) pour la détermination des anticorps anti espèces de plasmodium dans le sérum et le plasma humains

Ce kit est destiné au dépistage d'unités de sang et à l'identification de personnes étant entrées en contact avec le protozoaire et ayant développé une réponse immunologique.

Ce kit est destiné à un usage diagnostique in vitro uniquement et doit être réalisé par des professionnels dûment formés.

B. INTRODUCTION

Les espèces de Plasmodium sont des protozoaires intracellulaires de la famille des Babesia et à Toxoplasma. Les espèces de plasmodium se reproduisent de manière sexuée chez les moustiques. Les moustiques transmettent les sporozoïtes qui en résultent à l'homme, chez lequel les organismes se reproduisent de manière asexuée. Les sporozoïtes se multiplient dans le foie, les mérozoïtes qui en résultent envahissent les érythrocytes, dans lesquels ils se multiplient ou mûrissent en gamétocytes mâles et femelles qui seront ensuite transmis à un moustique lors d'une piqûre.

P.falciparum et P.vivax sont à l'origine d'environ 80 % et 15 % de tous les cas de malaria, respectivement.

La malaria est la maladie infectieuse la plus grave des régions tropicales et subtropicales du monde, qui touche encore des millions de personnes, et fait des millions de victimes.

La détection des anticorps anti-espèces de Plasmodium permet d'identifier les cas de malaria récente ou passée chez les cas suspects.

C. PRINCIPE DU TEST

Des protéines recombinantes représentant des épitopes immunodominants d'espèces de Plasmodium sont tapissées dans les puits d'une microplaque.

Les protéines recombinantes ont été soigneusement sélectionnées pour assurer le dépistage de tous les anticorps anti espèces de Plasmodium. Des échantillons de sérum ou de plasma sont ajoutés à ces puits : si des anticorps spécifiques des espèces de Plasmodium (IgG, IgM ou IgA) sont présents dans l'échantillon, ils formeront des complexes stables avec les antigènes recombinants se trouvant dans les puits.

Les complexes antigène-anticorps sont ensuite identifiés par l'ajout de : (1) protéines similaires recombinantes biotinylées spécifiques des espèces de Plasmodium et (2) conjugué de streptavidine marqué à la peroxydase de raifort PR.

L'activité hydrolytique de la peroxydase de raifort permet de quantifier ces complexes anticorps-antigène.

De la solution substrat de peroxydase est ensuite ajoutée.

Lors de l'incubation, une couleur bleue se développe proportionnellement à la quantité d'anticorps anti espèces de Plasmodium liés au puits, permettant ainsi d'établir leur présence ou leur absence dans l'échantillon. Les puits contenant des échantillons négatifs aux anticorps anti espèces de Plasmodium restent incolores.

Une solution d'arrêt est ajoutée dans chaque puits et la couleur jaune qui en résulte est lue sur un lecteur de microplaque à 450 nm.

D. COMPOSANTS

La référence MALAB.CE contient des réactifs pour 96/192/480/960 tests.

Les descriptions ci-après concernent la composition du format standard (192 tests par kit).

Microplaque **MICROPLATE**

2 microplaques. 12 barrettes de 8 puits sécables tapissées d'antigènes recombinants spécifiques des espèces de Plasmodium. Les plaques sont conditionnées dans un sachet hermétique contenant un dessiccant.

Sérum de contrôle négatif **CONTROL-**

1 flacon de 4,0 ml. Sérum de contrôle prêt à l'emploi. Flacon en polypropylène avec un bouchon à vis en plastique blanc. Il contient du sérum humain négatif aux anticorps anti espèces de Plasmodium et du Kathon GC à 0,1 % utilisé comme conservateurs. Le sérum de contrôle négatif est de couleur jaune pâle.

Sérum de contrôle positif **CONTROL+**

1 flacon de 4,0 ml. Sérum de contrôle prêt à l'emploi. Flacon en polypropylène avec un bouchon à vis en plastique bleu. Il contient du sérum humain positif aux anticorps anti espèces de Plasmodium et du Kathon GC à 0,1 % utilisé comme conservateur. Le sérum de contrôle positif est de couleur vert clair.

Remarque importante : Bien que ce composant ait été traité avec des produits chimiques désactivant les espèces de Plasmodium, ceci n'assure pas l'absence totale de pathogènes viables, par conséquent le sérum de contrôle doit être manipulé comme matériel présentant un risque biologique, conformément aux bonnes pratiques de laboratoire.

Étalon : **CAL ...**

2 flacons. Flacon en verre borosilicate avec capuchon d'étanchéité et bouchon à vis en plastique, de couleur jaune. Dissoudre prudemment le contenu du flacon lyophilisé avec le volume d'eau de qualité EIE indiqué sur son étiquette. Bien mélanger dans l'agitateur vortex avant utilisation.

Remarques importantes :

1) L'étalon dissous n'est pas stable. Conserver en aliquotes à -20 °C.

2) Bien que ce composant ait été traité avec des produits chimiques désactivant les espèces de Plasmodium, ceci n'assure pas l'absence totale de pathogènes viables, par conséquent le sérum de contrôle doit être manipulé comme matériel présentant un risque biologique, conformément aux bonnes pratiques de laboratoire.

Solution de lavage concentrée **WASHBUF 20X**

2 bouteilles de 60 ml. Solution concentrée 20x. Flacon en polypropylène avec bouchon à vis en plastique blanc. Contient du Kathon GC à 0,1 %. Une fois diluée, la solution de lavage contient un tampon phosphate salin 10 mM, pH 7,0+/-0,2 et du Tween 20 à 0,05 %.

Conjugué N°1 **CONJ 1**

8 flacons. Flacon en verre borosilicate avec capuchon d'étanchéité et bouchon à vis en plastique, de couleur blanche. Le flacon contient des antigènes recombinants spécifiques des espèces de Plasmodium biotinylés lyophilisés. Le contenu des flacons doivent être entièrement dissous avec 6 ml de conjugué n°2.

Conjugué N°2 **CONJ 2**

1 bouteille de 60 ml. Flacon en polypropylène avec un bouchon à vis en plastique rouge. La solution contient de la PR conjuguée à de la streptavidine dans un tampon tris salin additionné de Kathon GC à 0,05 %, de Tween 20 et d'albumine sérique bovine. Ce composant est de couleur rouge.

Substrat chromogène **SUBS TMB**

1 bouteille de 50 ml. Flacon en polypropylène ambré avec un bouchon à vis en plastique blanc. Composant prêt à l'emploi. Contient un tampon citrate 50 mM, pH 3,5-3,8, du diméthylsulfoxyde à 4 %, du tétraméthylbenzidine (TMB) à 0,03 % et du peroxyde d'hydrogène (ou H₂O₂) à 0,02 %.

Remarque : Conserver à l'abri de la lumière en raison de la sensibilité aux éclairages intenses.

Acide sulfurique **H₂SO₄ 0,3 M**

1 flacon de 32 ml. Flacon en polypropylène avec un bouchon à vis en plastique blanc. Contient une solution de H₂SO₄ 0,3 M.

Attention : Irritant (H315, H319; P280, P302+P352, P332+P313, P305+P351+P338, P337+P313, P362+P363).

Diluant pour échantillon : **DILSPE**

1 flacon de 25 ml. Flacon en polypropylène avec un bouchon à vis en plastique vert. Contient un tampon tris additionné de Kathon GC à 0,05 % et de Tween 20, sert à diluer l'échantillon. Ce composant est de couleur verte.

12. 4 feuilles adhésives

13. 1 notice

Sur demande :

Gamme étalon : **CAL N°...**

5 flacons de 2 ml. Gamme étalon prête à l'emploi : 0-0.5-1-2.5-5 UI/ml (standard OMS).

(CAL1=0UI/ml, CAL2=0.5UI/ml, CAL3=1UI/ml, CAL4=2.5UI/ml, CAL5=5UI/ml).

Contient des protéines sériques, 0.3 mg/ml de sulfate de gentamycine et 0.1% de Kathon GC pour la conservation.

Les standards sont colorés avec une intensité décroissante de colorant bleu alimentaire.

Remarque importante : Sur demande spécifique, Dia.Pro peut fournir des réactifs pour 96, 480 et 960 tests, comme indiqué ci-dessous :

Microplaque	1	5	10
Sérum de contrôle négatif	1 flacon de 2,0 ml	1 flacon de 10 ml	1 flacon de 20 ml
Sérum de contrôle positif	1 flacon de 2,0 ml	1 flacon de 10 ml	1 flacon de 20 ml
Étalons	1 flacon	5 flacons	10 flacons
Solution de lavage concentrée	1 bouteille de 60 ml	5 bouteilles de 60 ml	4 bouteilles de 150 ml
Conjugué N°1	4 flacons	20 flacons	40 flacons
Conjugué N°2	1 flacon de 30 ml	3 bouteilles de 50 ml	6 bouteilles de 50 ml
Substrat chromogène	1 flacon de 25 ml	3 bouteilles de 42 ml	2 bouteilles de 125 ml
Acide sulfurique	1 flacon de 15 ml	2 bouteilles de 40 ml	2 bouteilles de 80 ml
Diluant pour échantillon	1 flacon de 15 ml	1 bouteille de 65 ml	1 bouteille de 140 ml
Feuilles adhésives	2	10	20
Notice	1	1	1
Nombre de tests	96	480	960
Code	MALAB.CE.96	MALAB.CE.480	MALAB.CE.960

E. MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS NON FOURNI

1. Micropipettes calibrées (200 µl et 10 µl) et embouts jetables en plastique.
2. Eau de qualité EIE (bidistillée ou désionisée, traitée au charbon actif pour supprimer les substances chimiques oxydantes utilisées en tant que désinfectants).
3. Chronomètre de 60 minutes ou plus.
4. Serviettes absorbantes en papier.
5. Incubateur thermostatique calibré pour microplaques ELISA en mesure de fournir une température de +37 °C.
6. Lecteur calibré de plaques à micropuits ELISA muni d'un filtre de lecture à 450 nm et d'un filtre à 620-630 nm pour la soustraction du blanc.
7. Laveur de microplaques calibré ELISA.
8. Agitateur vortex ou mélangeurs similaires.

F. MISES EN GARDE ET PRÉCAUTIONS

1. Le kit doit être manipulé uniquement par un personnel technique qualifié et dûment formé, sous la surveillance d'un médecin responsable du laboratoire.
2. Quand le kit est utilisé pour le dépistage d'unités et de composants du sang, il doit être utilisé dans un laboratoire certifié et qualifié par les autorités nationales compétentes (Ministère de la Santé ou organisme similaire) pour la réalisation de ce type d'analyses.
3. L'ensemble du personnel impliqué dans la réalisation du test doit porter des vêtements de protection de laboratoire, des gants sans talc et des lunettes de protection. Ne pas utiliser de dispositifs pointus (aiguilles) ou tranchants (lames). L'ensemble du personnel concerné doit avoir reçu une formation sur les procédures de biosécurité, suivant les recommandations du Centre de contrôle des maladies d'Atlanta (États-Unis) publiées dans la publication de l'Institut national de la santé américain sous le titre :

« Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories », éd. 1984.

4. L'ensemble du personnel impliqué dans la manipulation des échantillons doit être vacciné contre l'hépatite B et l'hépatite A, pour lesquelles des vaccins sûrs et efficaces sont disponibles.
5. L'environnement du laboratoire doit être contrôlé pour éviter la prolifération de contaminants tels que la poussière ou les agents microbiens en suspension dans l'air lors de l'ouverture des flacons et des microplaques des kits, et lors de la réalisation du test. Maintenir le substrat chromogène à l'abri de la lumière intense et éviter les vibrations de la surface sur laquelle le test se déroule.
6. Une fois livré, conserver le kit à une température comprise entre +2 °C et +8 °C dans un réfrigérateur à régulation de température ou en chambre froide.
7. Ne pas intervertir les composants des différents lots des kits. Il est conseillé de ne pas intervertir les composants de deux kits d'un même lot.
8. Vérifier que les réactifs sont transparents et ne contiennent pas de particules lourdes ou d'aggrégats visibles. Dans le cas contraire, prévenir le responsable du laboratoire qui lancera les procédures nécessaires au remplacement du kit.
9. Éviter la contamination croisée entre les échantillons de sérum/plasma en utilisant des embouts jetables et en les changeant après chaque prélèvement.
10. Éviter la contamination croisée entre les réactifs du kit en utilisant des embouts jetables et en les changeant après utilisation de chacun d'entre eux.
11. Ne pas utiliser le kit au-delà de la date de péremption figurant sur le conditionnement extérieur et sur les étiquettes des flacons.
12. Traiter tous les échantillons comme potentiellement infectieux. Tous les échantillons de sérum humain doivent être manipulés conformément aux recommandations du niveau de biosécurité 2, du Centre de contrôle des maladies d'Atlanta (États-Unis) publiées dans la revue de l'Institut national de la santé américain sous le titre : « Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories », éd. 1984.
13. L'utilisation de matériel en plastique jetable est recommandée pour la préparation des composants liquides ou le transfert des composants dans les stations de travail automatisées afin de limiter le risque de contamination croisée.
14. Les déchets produits durant l'utilisation du kit doivent être éliminés conformément aux directives et dispositions légales en vigueur portant sur les déchets chimiques et biologiques en provenance des laboratoires. En particulier, les déchets liquides provenant de la procédure de lavage, des résidus des sérums de contrôle et des échantillons doivent être considérés comme des matériels potentiellement infectieux et être inactivés avant leur élimination. Les procédures d'inactivation suggérées prévoient le traitement au moyen d'un concentré d'eau de javel à 10 % pendant 16-18 heures ou l'inactivation par la chaleur dans un autoclave à 121 °C pendant 20 minutes.
15. Les projections accidentelles d'échantillons et lors des manipulations doivent être absorbées au moyen de serviettes en papier imprégnées d'eau de javel, puis d'eau. Les serviettes en papier seront ensuite jetées dans des conteneurs prévus pour l'élimination des déchets en laboratoire et en milieu hospitalier.
16. L'acide sulfurique est irritant. En cas de déversement, laver la surface à grande eau.
17. Les autres déchets produits durant l'utilisation du kit (par exemple les embouts utilisés pour les échantillons et les sérums de contrôle, les microplaques usagées) doivent être considérés comme des déchets à risques infectieux et éliminés conformément aux directives et dispositions légales en vigueur en matière de déchets de laboratoire.

G. ÉCHANTILLON : PRÉPARATION ET RECOMMANDATIONS

1. Le sang est recueilli par prélèvement veineux dans des conditions aseptiques ; le plasma et le sérum sont préparés suivant les techniques standard de préparation des échantillons pour l'analyse clinique en laboratoire. Aucune influence n'a été constatée lors de la préparation de l'échantillon avec du citrate, de l'EDTA et de l'héparine.
2. Éviter tout ajout de conservateurs aux échantillons, notamment d'azote de sodium car ce produit chimique affecte l'activité enzymatique du conjugué et produirait de faux négatifs.
3. Les échantillons doivent être clairement identifiés par des codes ou des noms afin d'éviter toute interprétation erronée des résultats. Lorsque le kit est utilisé pour le dépistage d'unités de sang, l'apposition d'une étiquette à code-barres et la lecture électronique sont vivement recommandées.
4. Les échantillons hémolysés (« rouges ») et visiblement hyperlipémiques (« laiteux ») doivent être écartés en raison du risque de faux positifs qu'ils comportent. Les échantillons qui contiennent des résidus de fibrine, des particules lourdes ou des filaments et corps microbiens doivent être écartés en raison du risque de faux positifs qu'ils comportent.
5. Le sérum et le plasma peuvent être conservés entre +2 °C et 8 °C jusqu'à cinq jours après avoir été prélevés. Pour des périodes de conservation plus longues, les échantillons peuvent être congelés à -20 °C et conservés pendant plusieurs mois. Les échantillons congelés ne doivent pas être congelés/décongelés plus d'une fois afin de ne pas générer de particules qui pourraient fausser les résultats du test.
6. Les échantillons contenant des particules doivent être filtrés avec des filtres à 0,2-0,8 µ avant de procéder au test.
7. Ne pas utiliser d'échantillons inactivés par la chaleur car ils peuvent donner une fausse réactivité.

H. PRÉPARATION DU MATÉRIEL ET AVERTISSEMENTS

Une étude menée sur un kit ouvert n'a pas relevé de perte d'activité significative jusqu'à 2 mois.

Microplaques :

Attendre que la microplaque atteigne la température ambiante (1 heure environ) avant d'ouvrir l'emballage. Vérifier que le sachet n'est pas déchiré et ne présente aucun défaut indiquant un problème de stockage. Si tel est le cas, contacter le service client de Dia.Pro.

Remplacer les barrettes inutilisées à l'intérieur du sachet en aluminium, avec le dessiccant fourni, fermer hermétiquement et stocker à une température comprise entre +2 °C et +8 °C. Lors de la première ouverture, les barrettes inutilisées restent stables pendant 2 mois.

Sérum de contrôle négatif :

Prêt à l'emploi. Bien mélanger dans l'agitateur vortex avant utilisation.

Sérum de contrôle positif :

Prêt à l'emploi. Bien mélanger dans l'agitateur vortex avant utilisation. Manipuler ce composant comme un agent potentiellement infectieux, même si les agents potentiellement infectieux éventuellement présents dans le sérum de contrôle ont été inactivés chimiquement.

Solution de lavage concentrée :

Diluer la solution concentrée 20x avec de l'eau EIE à hauteur de 1 200 ml et mélanger délicatement à la verticale avant utilisation. Comme des cristaux de sel peuvent être présents dans le flacon, veiller à diluer la totalité du contenu pendant la préparation de la solution.

Éviter la formation de mousse pendant la préparation, la présence de bulles pouvant compromettre l'efficacité des cycles de lavage.

Remarque : Une fois diluée, la solution de lavage reste stable pendant 1 semaine entre +2 °C et 8 °C.

Mélange Conjugué N°1 & Conjugué N°2

Le mélange des conjugués N°1 et N°2 doit être préparé immédiatement avant la distribution du diluant pour échantillons. Ajouter 6 ml de Conjugué N°2 directement dans un flacon de conjugué N°1 et mélanger doucement par inversion pour dissoudre la poudre lyophilisée. Cette préparation est suffisante pour 24 tests, ou 3 barrettes complètes.

Remarque importante : Toute portion non utilisée de cette solution de conjugué N°1 reconstituée peut être stockée à 2...8 °C pendant 12 heures maximum.

Conjugué N°2 :

Réactif prêt à l'emploi. Bien mélanger dans l'agitateur vortex avant utilisation.

Substrat chromogène :

Prêt à l'emploi. Bien mélanger dans l'agitateur vortex avant utilisation.

Veiller à ne pas contaminer le liquide avec des substances chimiques oxydantes, de la poussière ou des microbes transmis par l'air. Ne pas exposer à un éclairage de forte intensité, à des substances oxydantes et à des surfaces métalliques.

Si le composant doit être transféré, utiliser uniquement un récipient jetable en plastique, de préférence stérile.

Acide sulfurique :

Prêt à l'emploi. Bien mélanger dans l'agitateur vortex avant utilisation.

Attention : Irritant (H315, H319; P280, P302+P352, 332+P313, P305+ P351+P338, P337+P313, P362+P363).

Légende :

Mention de danger, Phrases H :

H315 – Provoque une irritation cutanée.

H319 – Provoque une sévère irritation des yeux.

Conseils de prudence, Phrases P :

P280 – Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.

P302 + P352 – EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU : laver abondamment à l'eau et au savon.

P332 + P313 – En cas d'irritation cutanée : Demander un avis médical/Consulter un médecin.

P305 + P351 + P338 – EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.

P337 + P313 – Si l'irritation oculaire persiste : demander un avis médical/consulter un médecin.

P362 + P363 – Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation.

Diluant pour échantillon :

Prêt à l'emploi. Bien mélanger dans l'agitateur vortex avant utilisation.

Étalon :

Dissoudre prudemment le contenu du flacon lyophilisé avec le volume d'eau de qualité EIE indiqué sur son étiquette.

Bien mélanger dans l'agitateur vortex avant utilisation.

I. INSTRUMENTS ET OUTILS UTILISÉS AVEC LE KIT

1. Les **micropipettes** doivent être étalonnées pour administrer le volume nécessaire à la réalisation du test et doivent subir une décontamination régulière (alcool ménager, solution javellisée à 10 %, désinfectants hospitaliers) au niveau des parties susceptibles d'entrer accidentellement en contact avec l'échantillon. Elles doivent également faire l'objet d'un entretien régulier afin de garantir une précision d'1 % et une exactitude de l'ordre de +/-2 %. Les déversements ou les résidus des composants du kit doivent aussi faire l'objet d'une décontamination fréquente.
2. L'**incubateur ELISA** doit être réglé à +37 °C (tolérance de +/-0,5 °C) et contrôlé à intervalles réguliers afin de garantir le maintien de la température voulue. Les incubateurs à sec et les bains thermostatiques conviennent tous deux pour les incubations, à condition que l'instrument soit validé pour l'incubation des tests ELISA.

3. Le **laveur ELISA** joue un rôle fondamental dans les performances globales du test. Le laveur doit être soigneusement validé et correctement optimisé au moyen des sérums de contrôle et des panels de référence du kit avant que ce dernier puisse être utilisé pour les essais de laboratoire de routine. 4-5 cycles de lavage (aspiration + distribution de 350 µl/puits de solution de lavage = 1 cycle) suffisent habituellement à garantir la réalisation du test dans les conditions requises. Un temps d'impregnation de 20-30 secondes entre les cycles est recommandé. Pour établir correctement leur nombre, il est recommandé de réaliser un test avec les sérums de contrôle du kit et les échantillons de référence positifs et négatifs clairement caractérisés, puis de vérifier si les valeurs correspondent aux valeurs reportées ci-après dans la section « Contrôle de qualité interne ». Un calibrage des volumes administrés et un entretien régulier du laveur (décontamination et nettoyage des aiguilles) doivent être effectués conformément aux indications du fabricant.
4. Les temps d'incubation ont une tolérance de $\pm 5\%$.
5. Le **lecteur ELISA** doit être muni d'un filtre de lecture à 450 nm et d'un second filtre à 620-630 nm, fortement recommandé, pour la soustraction du blanc. Ses performances standard doivent être : (a) largeur de bande $< 10\text{ nm}$; (b) gamme d'absorbance comprise entre 0 et $\geq 2,0$; (c) linéarité $\geq 2,0$; répétabilité $\geq 1\%$. La soustraction du blanc est effectuée dans le puits identifié dans la section « Procédure de test ». Le système optique du lecteur doit être calibré régulièrement afin de s'assurer que la densité optique mesurée est bien la bonne. Il doit faire l'objet d'un entretien régulier, conformément aux indications du fabricant.
6. Lors de l'utilisation d'une **station de travail automatisée ELISA**, toutes les étapes fondamentales (distribution, incubation, lavage, lecture, exploitation des données) doivent être soigneusement réglées, calibrées, contrôlées et faire l'objet d'un entretien régulier afin de coïncider avec les valeurs reproduites dans la section « Contrôle de qualité interne ». Le protocole d'essai doit être saisi dans le système d'exploitation de l'unité et validé, comme pour le laveur et le lecteur. En outre, la partie de la station consacrée à la manipulation du liquide (distribution et lavage) doit être validée et réglée convenablement. Il convient de prêter une attention particulière afin que les aiguilles utilisées pour la distribution et le lavage ne véhiculent pas de résidus. Cette particularité doit être étudiée et contrôlée afin de réduire la possibilité de contamination des puits avoisinants. L'utilisation de stations de travail ELISA automatisées est recommandée pour le dépistage du sang lorsque le nombre d'échantillons à tester dépasse 20-30 unités par série.
7. Lors de l'utilisation de dispositifs automatiques, si le porte-flacon de l'appareil n'est pas adapté aux flacons fournis dans le kit, transférer la solution dans des récipients appropriés et les étiqueter avec l'étiquette détachée du flacon d'origine. Cette manipulation est importante afin d'éviter d'intervertir le contenu des flacons lors de leur transfert. Une fois le test terminé, replacer les récipients étiquetés en deuxième lieu à une température comprise entre $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ et $8\text{ }^{\circ}\text{C}$, bien fermés, si ils n'ont pas été contaminés pendant leur utilisation (instrument à aiguille fixe, sans embout à usage unique).
8. Le service client de Dia Pro accompagne l'utilisateur et lui fournit l'assistance dont il a besoin pour configurer et contrôler les instruments utilisés avec le kit afin de garantir la conformité aux caractéristiques décrites. Une assistance est également fournie pour l'installation des nouveaux instruments qui seront employés avec le kit.

L. CONTRÔLES ET OPÉRATIONS PRÉALABLES AU TEST

1. Vérifier la date de péremption du coffret imprimée sur l'étiquette extérieure de l'emballage du kit. Ne pas utiliser le kit au-delà de cette date.
2. Vérifier que les composants du liquide n'ont pas été contaminés par des particules ou des agrégats visibles à l'œil nu. S'assurer que le substrat chromogène est incolore ou bleu

pâle en aspirant une petite quantité à l'aide d'une pipette stérile transparente en plastique. Vérifier l'absence de rupture durant le transport ainsi que l'absence de fuite liquide dans la boîte. S'assurer que le sachet en aluminium qui contient la microplaque n'est ni perforé ni endommagé.

3. Diluer l'intégralité du contenu de la solution de lavage concentrée 20x selon les indications ci-dessus.
4. Dissoudre le conjugué N°1 comme indiqué dans la section correspondante.
5. Attendre que les autres composants atteignent la température ambiante (1 heure environ), puis mélanger selon les indications.
6. Amener l'incubateur ELISA à $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$ et préparer le laveur ELISA en effectuant l'amorçage à l'aide de la solution de lavage diluée, selon les indications du fabricant. Configurer le nombre correct de cycles de lavage d'après les valeurs de validation de l'instrument en vue de son utilisation avec le kit.
7. S'assurer que le lecteur ELISA a bien été allumé au moins 20 minutes avant la lecture.
8. En cas d'utilisation d'une station de travail automatisée, la mettre sous tension, vérifier les paramètres et veiller à utiliser le protocole de test correct.
9. Vérifier que les micropipettes sont réglées sur le volume requis.
10. S'assurer que le reste du matériel est disponible et prêt à l'emploi.
11. En cas de problèmes, interrompre le test et prévenir le responsable.

M. PROCÉDURE DE TEST

Le test doit être réalisé conformément aux indications ci-dessous, en prenant soin de maintenir une durée d'incubation identique pour tous les échantillons testés.

Essai manuel :

1. Remettre en suspension le contenu du nombre correct de flacons de conjugué N°1 avec 6ml de conjugué N°2 avant de commencer la distribution des échantillons et des sérums de contrôle. Un flacon de ce mélange de conjugués est largement suffisant pour 3 barrettes. Il est recommandé de ne dissoudre que le strict nécessaire pour la série à effectuer.
2. Placer le nombre de puits nécessaire sur le support de microplaque. Laisser le premier puits vide pour la soustraction du blanc.
3. Distribuer 50 µl de diluant pour échantillon dans tous les puits, sauf dans le puits A1 qui est utilisé pour la soustraction du blanc.
4. Distribuer ensuite 150 µl de sérum de contrôle négatif en triple, 150 µl de sérum de contrôle positif en simple puis 150 µl d'étalon en double dans les puits correspondants.
5. Ajouter 150 µl d'échantillons dans chacun des puits clairement identifiés et aspiré/distribué le même volume au moins 2 fois avec la même pipette afin de disperser entièrement l'échantillon dans le diluant.
6. Incuber la microplaque pendant **60 min à $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$** .

Remarque importante : Les barrettes doivent être enveloppées dans les feuilles adhésives fournies uniquement lorsque le test est effectué manuellement. Ne pas recouvrir les barrettes en cas d'utilisation d'instruments automatiques ELISA.

7. Laver la microplaque dans un laveur automatique en distribuant et en aspirant 350 µl/puits de solution de lavage diluée - voir les indications plus haut (section I.3).
8. Pipeter 200µl du mélange de conjugué N°1 conjugué n°2 préparé suivant les indications ci-dessus dans chaque puits, à l'exception du premier puits de soustraction du blanc, et recouvrir avec la feuille adhésive.

Remarque importante : Veiller à ce que l'embout rempli du conjugué ne touche pas la surface interne en plastique du puits. Une contamination pourrait s'ensuivre.

9. Incuber la microplaque filmée pendant **60 min à $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$** .
10. Laver suivant les indications de la section 7

11. Distribuer 200 µl de solution de substrat chromogène dans chaque puits, y compris dans le puits blanc. Incuber ensuite la microplaque à **température ambiante (18-25 °C) pendant 30 minutes**. Lancer le chronomètre dès l'ajout de ce composant dans le premier puits.

Remarque importante : Ne pas exposer à un éclairage direct de forte intensité. Un fond élevé pourrait s'ensuivre.

12. Pipeter 100 µl d'acide sulfurique dans tous les puits, en reprenant la même séquence de pipetage qu'à l'étape 13 pour arrêter la réaction enzymatique. L'ajout d'acide fera virer les sérums de contrôle positifs et les échantillons positifs du bleu au jaune.
13. Mesurer l'intensité de la couleur de la solution dans chaque puits, selon les indications de la section I.5, à 450 nm (lecture) et à 620-630 nm (soustraction de fond, fortement recommandée), en effectuant la soustraction du blanc dans le puits A1.

Remarques importantes :

1. Si le second filtre n'est pas disponible, s'assurer de l'absence de traces de doigts sur le fond du puits avant de lire à 450 nm. Les traces de doigts peuvent entraîner la lecture de faux positifs.
2. La lecture doit être effectuée immédiatement après l'ajout de la solution d'arrêt et pas plus de 30 minutes après. Une auto-oxydation du substrat chromogène peut se produire et aboutir à un fond élevé.

Essai automatisé

1. Avant de commencer le test, reconstituer le contenu du nombre nécessaire de flacons de conjugué N°1 lyophilisé avec 6ml de conjugué N°2. Mélanger avec précaution par inversion pour dissoudre la poudre.
Note : Un flacon de ce mélange de conjugués est largement suffisant pour 3 barrettes. Il est recommandé de ne dissoudre que le nombre de flacons nécessaires pour la série.
2. Si l'essai est réalisé de manière automatique avec un système ELISA, nous conseillons de distribuer avec l'appareil 50 µl de diluant pour échantillon puis 150 µl de sérums de contrôle et d'échantillons, puis d'agiter la microplaque pendant quelques secondes afin d'homogénéiser la dilution. Avant d'aspirer l'échantillon suivant, les aiguilles doivent être lavées correctement pour éviter toute contamination croisée des échantillons ou les embouts doivent être changés.
3. Pour les opérations suivantes, suivre les instructions données pour l'essai manuel.
4. Il est fortement recommandé de vérifier que le laps de temps qui s'écoule entre la distribution du premier et du dernier échantillon sera calculé par l'appareil et pris en compte en retardant en conséquence la première opération de lavage.

Remarque : lors de l'ajout de l'échantillon, la couleur du puits passe du vert au bleu. Ce changement de couleur est visible à l'œil nu et son intensité peut être lue selon la Procédure de vérification de la distribution (chapitre N)

N. PROCÉDURE DE TEST

Méthode	Opérations
Diluant pour échantillon	50 µl
Sérums de contrôle	150 µl
Étalon(*)	150 µl
Échantillons	150 µl
1^e incubation	60 min
Température	+37 °C
Étape de lavage	4-5 cycles
Mix Conjugué N°1 et 2	200 µl
2^e incubation	60 min

Température	+37 °C
Température	+37 °C
Étape de lavage	4-5 cycles
TMB/H2O2	200 µl
3^e incubation	30 min
Température	température ambiante
Acide sulfurique	100 µl
DO de lecture	450 nm

Procédure de vérification de la distribution :

L'ajout du diluant pour échantillons, des échantillons, du mélange conjugués +2, et du substrat peut être suivi par lecture des puits à 405nm, suivant les indications décrites dans le tableau ci-dessous :

Etapes d'ajout	Volumes à distribuer	Vérification (lecture)
Puits vide	////	DO405nm<0.050
Diluant échantillon	50 µl	DO405nm≥0.130
Echantillon	150 µl	DO405nm≥0.350
Mélange conjugué 1+2	200 µl	DO405nm≥0.150
Substrat	200 µl	DO405nm≥0.090

(*) Remarques importantes :

- L'étalon (CAL) n'affecte pas le calcul du seuil, et par conséquent n'affecte pas le calcul des résultats de l'essai.
- L'étalon (CAL) utilisé uniquement si un contrôle qualité interne au laboratoire est requis par la direction.

Un exemple de schéma de distribution est reproduit ci-dessous :

Microplaque												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	S2										
B	NC	S3										
C	NC	S4										
D	NC	S5										
E	CAL (*)	S6										
F	CAL (*)	S7										
G	POS	S8										
H	S1	S9										

Légende :

BLK = Blanc NC = Sérum de contrôle négatif
POS = Sérum de contrôle positif S = Échantillon
CAL (*) = Étalon – non obligatoire

O. CONTRÔLE DE QUALITÉ INTERNE

Un contrôle est effectué sur les sérums de contrôle et l'étalon chaque fois que le kit est utilisé afin de vérifier si les valeurs de DO 450 nm sont conformes aux valeurs prévues indiquées dans le tableau ci-dessous.

Vérifier	Conditions requises
Puits blanc	Valeur DO 450 nm ≤ 0,100
Sérum de contrôle négatif (NC)	Valeur DO 450 nm ≤ 0,200 après soustraction du blanc L'absorbance des valeurs du contrôle négatif individuel doit être inférieure ou égale à 0,200. Si une valeur est en dehors de cette plage, l'éliminer et recalculer la moyenne. Si deux valeurs sont en dehors de cette plage, la série doit être répétée.
Sérum de contrôle positif	DO 450 nm moyenne ≥ 0,500

Si les résultats du test sont conformes aux caractéristiques décrites ci-dessus, passer à la section suivante.

S'ils ne le sont pas, ne pas poursuivre et procéder comme suit :

Problème	Vérifier
Puits blanc DO 450 nm > 0,100	1. que la solution de substrat chromogène n'a pas été contaminée au cours du test
Sérum de contrôle négatif (NC) DO 450 nm > 0,200 après soustraction du blanc	1. que la procédure de lavage et les paramètres du laveur sont bien ceux qui ont été validés lors de l'étude de pré-qualification, 2. que la solution de lavage correcte a bien été utilisée et qu'elle a servi à amorcer le laveur avant utilisation, 3. qu'aucune erreur n'a été commise au cours de la procédure de test (distribution de sérum de contrôle positif à la place du contrôle négatif), 4. qu'aucune contamination du sérum de contrôle négatif ou de ses puits ne s'est produite suite à des projections d'échantillons positifs ou de conjugué enzymatique, 5. que les micropipettes n'ont pas été contaminées par des échantillons positifs ou par le conjugué enzymatique, 6. que les aiguilles du laveur ne sont pas bloquées ou partiellement colmatées.
Sérum de contrôle positif DO 450 nm < 0,500	1. que la procédure a été correctement exécutée, 2. qu'aucune erreur n'a été commise au cours de la distribution des sérums de contrôle (distribution d'un sérum de contrôle négatif à la place du sérum de contrôle positif). Dans ce cas, le sérum négatif a lui aussi une valeur DO 450 nm > 0,150. 3. que la procédure de lavage et les paramètres du laveur sont bien ceux qui ont été validés lors de l'étude de pré-qualification, 4. que le sérum de contrôle positif n'a subi aucune contamination extérieure.

Si l'un de ces problèmes devait survenir, après avoir vérifié, informer le responsable des problèmes restants afin qu'il prenne les mesures qui s'imposent.

** Remarque :

Si l'étalon a été utilisé, vérifier les données suivantes :

Vérifier	Conditions requises
Étalon	S/Co > 1,0

Si les résultats du test ne sont pas conformes aux spécifications ci-dessus, effectuer les opérations ci-dessous :

Problème	Vérifier
Étalon S/Co < 1	1. que la procédure a été correctement exécutée, 2. qu'aucune erreur n'a été commise au cours de sa distribution (par ex. : distribution d'un sérum de contrôle négatif à la place), 3. que la procédure de lavage et les paramètres du laveur sont bien ceux qui ont été validés lors de l'étude de pré-qualification, 4. que l'étalon n'a subi aucune contamination extérieure.

Dans tous les cas, si tous les autres paramètres (blanc, sérum de contrôle négatif, sérum de contrôle positif) sont conformes aux valeurs requises, le test peut être considéré comme valide.

P. CALCUL DE LA VALEUR SEUIL

Les résultats du test sont calculés au moyen d'une valeur seuil déterminée à l'aide de la formule suivant à partir de la valeur DO 450 nm moyenne du sérum de contrôle négatif (NC) :

$$NC + 0,300 = \text{Valeur seuil (Co)}$$

La valeur obtenue pour le test est utilisée pour l'interprétation des résultats, comme indiqué dans le paragraphe suivant.

Remarque importante : Lorsque le calcul des résultats est effectué par le système d'exploitation d'une station de travail automatisée ELISA, veiller à ce que la formule correcte soit utilisée pour calculer la valeur seuil et interpréter les résultats convenablement.

Q. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les résultats des tests sont interprétés comme le rapport de la valeur DO 450 nm de l'échantillon et de la valeur seuil (ou S/Co), selon le tableau suivant :

S/Co	Interprétation
------	----------------

< 0,9	Négatif
0,9 – 1,1	Indéterminé
> 1,1	Positif

Les échantillons dont la valeur S/Co est < 0,9 sont considérés comme négatifs, et indiquent que le patient n'a pas été infecté par les espèces de Plasmodium.

Les échantillons dont la valeur S/Co est > 1,1 sont considérés comme positifs et indiquent une infection récente ou passée aux espèces de Plasmodium.

Les échantillons dont la valeur S/Co est dans la zone grise de 0,9 à 1,1 doivent être retestés après 2 à 3 semaines pour vérifier si le résultat est devenu positif.

Remarques importantes :

1. L'interprétation des résultats doit se faire sous le contrôle du responsable du laboratoire afin de réduire le risque d'erreurs de jugement et d'interprétations erronées.
2. Selon la directive du NIH américain, tout résultat positif du dépistage sanguin doit être confirmé par le biais d'une méthode de confirmation à même de détecter les anticorps dirigés contre les antigènes de la Malaria avant de formuler le diagnostic d'infection.
3. Par définition, les tests des acides nucléiques (TAN) pour Malaria ssp ne visent pas à confirmer un test immunologique. Ils peuvent cependant être utilisés par le responsable du laboratoire pour décider si l'unité de sang peut être transfusée, même en présence d'anticorps (demander à DiaPro srl le kit Malaria ssp RealTime PCR).
4. Comme il ressort de l'évaluation des performances du produit, l'essai est en mesure de détecter les anticorps anti-Malaria ssp **plus tôt** que certains autres kits du commerce. Par conséquent, un résultat positif non confirmé par ces kits du commerce moins sensibles ne peut pas être considéré comme un faux positif, sauf en cas de présence d'autres preuves. L'échantillon doit être soumis à un test de confirmation.
5. Lorsque les résultats du test sont transférés du laboratoire vers un centre informatique, veiller à ne pas transmettre de données erronées.
6. Seul un médecin dûment qualifié peut poser le diagnostic de malaria et le communiquer au patient. La présence d'anticorps ne signifie cependant pas que le patient est atteint par une infection au moment de l'analyse. Les anticorps peuvent durer toute la vie du patient, même en l'absence d'organismes Malaria ssp vivants dans le sang. Le diagnostic d'infection par la malaria ssp ne doit être posé qu'en présence d'autres preuves cliniques et diagnostiques (présence d'antigène de la malaria dans le sang par la méthode Real Time PCR ou d'autres méthodes).

Un exemple de calcul est reproduit ci-dessous :

Les données suivantes ne doivent pas remplacer les valeurs réelles obtenues par l'utilisateur.

Sérum de contrôle négatif : DO 450 nm 0,048 – 0,050 – 0,052
Valeur moyenne : DO 450 nm 0,050

Inférieure à 0,200 – Acceptée

Valeur seuil = 0,050 + 0,300 = 0,350

Sérum de contrôle positif : Valeur moyenne DO 450 nm 1,000

Supérieure à 0,500 – Acceptée

Étalon : Valeur moyenne DO 450 nm 0,810

S/Co > 1 – Accepté

Échantillon 1 : DO 450 nm 0,070

Échantillon 2 : DO 450 nm 1,690

Échantillon 1 S/Co < 1 = négatif

Échantillon 2 S/Co > 1 = positif

R. PERFORMANCES

1. SENSIBILITÉ :

La sensibilité analytique de l'essai a été définie à l'aide du premier sérum humain anti-malaria (*Plasmodium falciparum*) de référence OMS, de code NIBSC 10/198.

Les résultats de la dilution limite du standard de référence dans un échantillon négatif (contrôle négatif) sont reportés dans le tableau ci-dessous, sous forme de la moyenne obtenue avec 3 lots différents de réactifs :

OMS UI/ml	DO450nm	S/Co
10	3.767	10.3
5	2.485	6.8
2.5	1.310	3.6
1	0.547	1.5
0.5	0.276	0.8
0.25	0.161	0.4
Contrôle négatif	0.060	0.2

La sensibilité démontrée par ce test est supérieure à 1UI/ml OMS.

Par ailleurs, la sensibilité du système a été évaluée sur le panel fourni par NIBSC, Royaume-Uni, pour les anticorps contre les espèces de *Plasmodium*.

Les résultats (valeurs S/Co) pour trois lots de produit sont reportés dans le tableau ci-dessous.

ID membre	Espèce Plasmodium	S/Co
71/281 Version 3.0, du 14/04/2008	p. vivax	>5.0
72/348 Version 3.0, du 14/04/2008	p.vivax	>2.0
72/092 Version 3.0, du 04/06/2015	p. falciparum	>1.1
71/326 Version 3.0, du 14/04/2008	p.vivax	>5.0
72/096 Version 1.0, du 08/07/2015	p. malariae	>5.0
72/345 Version 3.0, du 14/04/2008	p. falciparum	>5.0
72/341 Version 3.0, du 14/04/2008	p.falciparum	>5.0

De plus, la sensibilité du produit Malaria Ab a été testée avec le panel EFS Ac anti-PALUDEEN, lot n°07.191026 (DQ030), fourni par l'établissement Français du Sang (EFS), France. Les résultats sont les suivants :

Echantillon	ID	S/Co
Ac PALU n°1	6914478877	>2.5
Ac PALU n°2	69081724786	>2.0
Ac PALU n°3	4406095555	>4.0
Ac PALU n°4	Diluant	<0.9

Enfin, la sensibilité a également été vérifiée avec le contrôle interne monoparamétrique Ac anti-plasmodium **CRS PAL lot 2701163** fourni par l'Etablissement Français du Sang (EFS) avec 3 lots différent du kit Malaria Ab. Ce contrôle a toujours été rendu positif, avec une valeur index S/Co supérieure à 1.2.

2. SPÉCIFICITÉ DIAGNOSTIQUE :

Elle a été calculée sur des panels de donneurs de sang négatifs, classés négatifs au préalable au moyen de la méthode de référence (Diamed/Biorad).

Le test a présenté une spécificité > 98 % sur le plasma et le sérum.

3. REPRODUCTIBILITÉ :

Elle a été évaluée en examinant le sérum de contrôle négatif, l'étalon et le sérum de contrôle positif en 16 répétitions dans trois séries différentes avec le dispositif lot N°0407.

Les résultats sont résumés dans les tableaux suivants :

Échantillon négatif (N = 16)

Valeurs moyennes	1 ^e série	2 ^e série	3 ^e série	Valeur moyenne
DO 450 nm	0,136	0,146	0,153	0,145
Écart-type	0,009	0,014	0,011	0,011
CV %	6,4	9,3	7,5	7,7

Étalon (N = 16)

Valeurs moyennes	1 ^e série	2 ^e série	3 ^e série	Valeur moyenne
DO 450 nm	0,889	0,860	0,844	0,864
Écart-type	0,051	0,048	0,094	0,064
CV %	4,3	3,8	7,0	5,0

Échantillon positif (N = 16)

Valeurs moyennes	1 ^e série	2 ^e série	3 ^e série	Moyenne
DO 450 nm	3,191	3,300	3,175	3,222
Écart-type	0,062	0,098	0,103	0,088
CV %	1,9	3,0	3,2	2,7

Les valeurs statistiques suivantes ont été dérivées des données ci-dessus :

Valeurs moyennes N = 48	Échantillon négatif	Étalon	Échantillon positif
DO 450 nm	0,145	0,864	3,222
Écart-type	0,011	0,064	0,088
CV %	7,7	5,0	2,7

RÉFÉRENCES

- Garcia LS et al. Update on Malaria. Clin Microbiol News Lett; 1992, 14:65-9
- Krogstad DJ et al. Plasmodium species (Malaria) principles and practice of infectious diseases, 4th ed, MandellGL et al., 1995, 2415-27.
- Smith JH et al. Malaria: clinical laboratory features. Clin Microbiol News Lett, 1995,17(24): 185-8.

Tous les produits de diagnostic in vitro fabriqués par la société sont contrôlés par un système de gestion de la qualité certifié selon la norme ISO 13485. Chaque lot est soumis à un contrôle de qualité et n'est commercialisé que s'il respecte les spécifications techniques et les critères d'acceptation de la Communauté européenne.

Fabricant :
Dia.Pro Diagnostic Bioprobes S.r.l.
Via G. Carducci n° 27 – Sesto San Giovanni (Milan) – Italie

