



Notice d'emploi (Français)

1 Finalité

Le *recomLine Treponema IgG, IgM* est un test qualitatif pour la détection des anticorps IgG et IgM agissant contre *Treponema pallidum* dans le sérum ou le plasma humain.

2 Domaine d'application

Le *recomLine Treponema IgG, IgM* peut être utilisé comme test de confirmation des échantillons réactifs dans le dépistage. Le *recomLine Treponema IgG, IgM* est un immuno-essai en ligne. Grâce à un alignement séparé des différents antigènes, le principe du test permet l'identification d'anticorps spécifiques agissant contre les différents antigènes de *Treponema pallidum*, contrairement aux tests ELISA. Le test utilise des antigènes recombinants produits : Tp47, TmpA, Tp257 (Gpd), Tp453, Tp17 et Tp15.

3 Principe du test

Les antigènes recombinants purifiés de *Treponema* sont fixés sur des bandelettes de test à membrane de nitrocellulose.

1. Les bandelettes sont incubées avec l'échantillon (sérum ou plasma) dilué. Les anticorps spécifiques se lient alors aux antigènes fixés sur les bandelettes de test.
2. Les anticorps non liés sont ensuite éliminés par lavage.
3. Au cours d'une deuxième étape, les bandelettes sont incubées avec des anticorps de l'immunoglobuline humaine (IgG resp. IgM) conjugués à de la peroxydase de raifort.
4. Les anticorps conjugués non liés sont ensuite éliminés par lavage.
5. Une réaction de coloration catalysée par la peroxydase permet de détecter les anticorps spécifiques liés. Si une réaction antigène-anticorps s'est produite, une bande sombre apparaît à l'emplacement correspondant de la bandelette.

Des bandes de contrôle se trouvent au niveau de l'extrémité supérieure de la bandelette :

- a) le contrôle de réaction, situé sous le numéro de bandelette, qui doit indiquer une réaction pour chaque échantillon de sérum/plasma.
- b) Les contrôles de conjugué (IgG, IgM) permettent de contrôler le type de conjugué et de bandelettes utilisé (spécifique à la classe Ig). Si la bandelette de test spécifique IgG est utilisée pour détecter des anticorps IgG, la bande de contrôle du conjugué IgG montre une réaction nette ; dans le test spécifique IgM, la bande de contrôle IgM doit indiquer une réactivité positive.
- c) « Contrôle cut-off » : l'intensité de cette bande permet de déterminer la réactivité des différentes bandes d'antigène (voir 9.2 Évaluation).

4 Réactifs

4.1 Contenu de l'emballage

Les réactifs inclus dans l'emballage suffisent à effectuer 20 (100) évaluations.

Chaque emballage de réactifs contient :

WASHEUF A 10 X	100 ml (5x100 ml) de tampon de lavage A (concentré dix fois) Contient un tampon phosphaté, du NaCl, du KCl, du détergent et des conservateurs: MIT (0,1%) et oxypropylène (0,2%)
SUBS TMB	40 ml (5x40 ml) de substrat chromogène à base de tétraméthylbenzidine (TMB, prêt à l'emploi)
MILKPOW	5 g (5x5 g) de lait écrémé en poudre
INSTRU	1 notice d'emploi
EVALFORM	1 (5) fiche d'évaluation

4.1.1 recomLine Treponema IgG

Chaque emballage de réactifs contient en plus des composants présentés à la section 4.1 :

TESTSTR	2 (10) tubes contenant chacun 10 bandelettes de test consécutives numérotées
CONJ IgG	500 µl (5x500 µl) de conjugué anti-IgG humaines (concentré cent fois, bouchon vert) Du lapin, contient: NaN3 (<0,1%), MIT (<0,1%) et chloracétamide (<0,1%)

4.1.2 recomLine Treponema IgM

Chaque emballage de réactifs contient en plus des composants présentés à la section 4.1 :

TESTSTR	2 (10) tubes contenant chacun 10 bandelettes de test consécutives numérotées
CONJ IgM	500 µl (5x500 µl) de conjugué anti-IgM humaines (concentré cent fois, bouchon mauve) Du lapin, contient: NaN3 (<0,1%), MIT (<0,1%) et chloracétamide (<0,1%)

4.2 Réactifs, matériel et appareils supplémentaires requis

- Capsules d'incubation (en cas de besoin, à commander auprès de MIKROGEN)
- Eau désionisée (qualité supérieure)
- Pinces en plastique
- Agitateur horizontal
- Mélangeurs Vortex ou autres rotateurs
- Pompe d'extraction à vide ou appareil similaire
- Éprouvettes graduées 50 ml et 1 000 ml
- Micropipettes avec aiguilles jetables, 20 µl et 1 000 µl
- Pipette ou distributeur de 10 ml
- Minuterie
- Papier absorbant
- Gants jetables
- Poubelle pour matières toxiques

5 Durée de conservation et manipulation

- Avant et après utilisation, conserver les réactifs entre +2 C et +8°C; **ne pas congeler**.
- Avant de commencer le test, tous les composants doivent être tempérés à température ambiante (entre +18 C et +25°C) pendant au moins 30 minutes. Le test doit être réalisé à température ambiante.
- Les réactifs identiques (voir symboles imprimés) des différentes trousse de test *recomLine* et *recomBlot* peuvent être utilisés indépendamment du paramètre ou du lot. Il convient pour ce faire, de tenir compte de la date de péremption de ces composants.
- Avant utilisation, bien mélanger les réactifs et les sérums patients concentrés. Éviter la formation de mousse.
- Ouvrir les tubes contenant les bandelettes immédiatement avant leur utilisation afin d'éviter toute condensation. Les bandelettes inutilisées restent dans le tube et doivent être conservées entre +2 C et + 8°C (bien refermer le tube, les bandelettes ne doivent pas être humides avant de commencer l'essai !).
- Les bandelettes sont numérotées en continu et identifiées par l'abréviation de chaque test.
- Avant de péremption est indiquée sur la trousse. Au-delà de celle-ci, il n'est plus possible de garantir la qualité du produit.
- Protéger tous les composants de la trousse de la lumière directe du soleil pendant l'intégralité du test. La solution de substrat (TMB) est particulièrement photosensible.
- Le test ne doit être réalisé que par du personnel qualifié, formé et autorisé.
- En cas de modifications substantielles du produit ou des signes d'emploi par l'utilisateur, l'application peut sortir du cadre d'application défini par MIKROGEN.
- Une contamination croisée des échantillons patients ou des conjugués peut fausser les résultats des tests. Ajouter avec précaution les échantillons patients, les bandelettes et la solution de conjugué. Veiller à ce que les solutions d'incubation ne glissent pas dans d'autres puits. Enlever les liquides avec précaution.
- Les bandelettes doivent être intégralement mouillées et immergées durant toute la procédure.
- Une automatisation est possible. Renseignez-vous auprès de MIKROGEN.

6 Avertissements et consignes de sécurité

- À utiliser exclusivement pour le diagnostic *in-vitro*.
- Tous les produits sanguins sont potentiellement infectieux et doivent être manipulés comme tels.

- ♣ Les bandelettes de test ont été fabriquées avec des antigènes bactériens et viraux inactivés.
- ♣ Après l'ajout du matériel du patient ou du matériel de contrôle, la bandelette doit être considérée comme potentiellement infectieuse et doit donc être manipulée comme telle.
- ♣ Porter des gants à usage unique appropriés durant toute la procédure de test.
- ♣ Les réactifs contiennent des agents antimicrobiens et des conservateurs : acide de sodium, MIT (méthylisothiazolone), oxypryone, chloroacétamide et peroxyde d'hydrogène. Éviter tout contact avec la peau ou les muqueuses. En cas de contact avec des métaux lourds, comme du cuivre ou du plomb, l'acide de sodium peut former des acides explosifs.
- ♣ Tous les liquides aspirés doivent être collectés ensemble. Tous les récipients collecteurs doivent contenir des désinfectants appropriés afin d'inactiver les agents pathogènes pour l'homme. Tous les réactifs et le matériel entrant en contact avec des échantillons potentiellement infectieux doivent être traités avec des désinfectants appropriés ou éliminés conformément aux réglementations locales en termes d'hygiène. Les données de concentration et les durées d'incubation du fabricant doivent être respectées.
- ♣ Utiliser les capsules d'incubation une seule fois.
- ♣ Manipuler soigneusement les bandelettes avec une pince en plastique.
- ♣ Ne jamais remplacer les réactifs par des réactifs d'autres fabricants, et ne pas les mélanger.
- ♣ Avant de réaliser le test, lire l'intégralité de la notice d'emploi et la respecter scrupuleusement. Des déviations par rapport au protocole de test indiqué dans la notice d'emploi peuvent fausser les résultats.

7 Prélèvement d'échantillons et préparation des réactifs

7.1 Échantillons

Les échantillons peuvent être du sérum ou du plasma (citrate, EDTA, héparine, CPD), séparé le plus rapidement possible du culot après prélèvement afin d'éviter une hémolyse. Toute contamination microbienne de l'échantillon doit absolument être évitée. Les substances insolubles doivent être éliminées de l'échantillon avant l'incubation. L'utilisation d'échantillons inactivés à la chaleur, ictériques, hémolytiques, lipémiques ou troubles n'est pas recommandée.

Attention !

Si les évaluations ne sont pas réalisées immédiatement, les échantillons peuvent être stockés jusqu'à 2 semaines entre +2°C et +8°C. Il est possible de conserver les échantillons plus longtemps à -20°C ou à une température inférieure. Des cycles de congélation/décongélation répétés des échantillons ne sont pas recommandés car ils peuvent fausser les résultats.

7.2 Préparation des solutions

7.2.1 Préparation du tampon de lavage A prêt à l'emploi

Ce tampon est utilisé pour la dilution du sérum et du conjugué ainsi que pour les étapes de lavage. Avant la dilution, le volume de tampon de lavage A doit être déterminé pour le nombre de tests à réaliser. Le lait écrémé en poudre est tout d'abord dissous dans le tampon de lavage A concentré et ce mélange est ensuite complété avec de l'eau désionisée jusqu'à obtention du volume final (dilution : 1 + 9). Les quantités nécessaires pour un nombre défini de bandelettes de test doivent être déterminées mathématiquement selon la formule suivante (le volume mort spécifique à l'appareil n'est pas pris en compte) :

Réactif	Formule	Exemple : 5 bandelett.
Poudre de lait écrémé [g]	= nb de bandelettes x 0,1	0,5 g
Tampon de lavage A concentré [ml]	= nb de bandelettes x 2	10 ml
Eau désionisée [ml]	= nb de bandelettes x 18	90 ml
Tampon de lavage A prêt à l'emploi [ml]	= nb de bandelettes x 20	100 ml

Le tampon de lavage A prêt à l'emploi peut être conservé pendant 4 semaines entre +2°C et + 8°C. Le tampon de lavage A prêt à l'emploi est inodore et légèrement trouble.

7.2.2 Préparation des solutions de conjugué

La solution de conjugué doit être préparée peu avant utilisation. Il est impossible de conserver la solution de conjugué prête à l'emploi. Un volume de conjugué IgG concentré est dilué avec 100 volumes de tampon de lavage A prêt à l'emploi (1 + 100).

Les quantités nécessaires pour un nombre défini de bandelettes de test doivent être déterminées mathématiquement selon la formule suivante :

Réactif	Formule	Exemple: 5 bandelett.
Conjugué concentré [µl]	= nb de bandelettes x 20	100µl
Tampon de lavage A prêt à l'emploi [ml]	= nb de bandelettes x 2	10 ml

Les quantités de conjugué sont calculées sans tenir compte du volume mort. Selon la méthode (manuelle ou automatisée), veuillez préparer un supplément de solution de conjugué pour 1 à 3 bandelettes.

8 Procédure de test

8.1 Incubation de sérum d'une heure

N°	Opération	Remarque
1	Avant de commencer le test, tous les réactifs doivent être tempérés à température ambiante (entre +18 C et +25°C) durant au moins 30 minutes.	Le test doit être réalisé à température ambiante.
2	<u>Préparer les bandelettes de test</u> Placer les bandelettes dans 2 ml de tampon de lavage A prêt à l'emploi. Important: Bandes IgG et IgM ne sont pas interchangeables!	Ne pas prendre les bandelettes à mains nues, utiliser une pince. Le numéro de bandelette est tourné vers le haut. Un puits dans une capsule d'incubation est nécessaire pour chaque bandelette (voir 4.2). Les bandelettes doivent être totalement immergées.
3	<u>Incubation des échantillons</u> a) Distribuer à l'aide d'une pipette 20 µl d'un échantillon non dilué (sérum ou plasma humain) dans le puits d'incubation correspondant à la bandelette. (Dilution 1 + 100) b) Incuber durant 1 heure en agitant doucement	Pipeter l'échantillon sur une extrémité de la bandelette immergée dans le tampon de lavage A et mélanger le plus rapidement possible en agitant délicatement le plateau d'incubation. Couvrir la capsule d'incubation avec un couvercle en plastique et la placer sur le mélangeur.
4	<u>Lavage</u> a) Retirer prudemment le couvercle en plastique des capsules d'incubation. b) Aspirer avec précaution le sérum dilué présent dans les différents puits. c) Pipeter 2 ml de tampon de lavage A prêt à l'emploi dans chaque puits, laver durant 5 minutes en agitant doucement, puis aspirer le tampon de lavage A.	Répéter 3 fois les étapes 8.4a à 8.4c. Éviter toute contamination croisée. En cas de traitement automatisé, les consignes du fabricant de l'appareil à ce propos doivent être respectées.
5	<u>Incubation avec le conjugué</u> Ajouter 2 ml de solution de conjugué prête à l'emploi et incuber durant 45 minutes en agitant doucement.	Couvrir la capsule d'incubation avec le couvercle en plastique et la placer sur le mélangeur.
6	<u>Lavage</u> voir section 8.4	Répéter trois fois l'intégralité des étapes de lavage (voir 8.4a à 8.4c)
7	<u>Réaction du substrat</u> Ajouter 1,5 ml de solution de substrat et incuber durant 8 minutes en agitant doucement.	
8	<u>Arrêt de la réaction</u> Éliminer la solution de substrat Laver au moins trois fois brèvement avec de l'eau désionisée .	
9	<u>Séchage des bandelettes</u> Avant l'évaluation, faire sécher les bandelettes pendant 2 heures entre 2 feuilles de papier absorbant.	Sortir délicatement les bandelettes de l'eau avec des pinces en plastique. Conserver les bandelettes à l'abri de la lumière.
Attention! Les solutions d'incubation ne doivent pas glisser dans d'autres puits. Il convient notamment d'éviter des projections au moment de l'ouverture et de la fermeture du couvercle.		

8.2 Incubation de sérum de trois heures

Le test peut également être effectué avec une incubation de sérum de trois heures. Le déroulement diverge alors uniquement aux points 3a) et 3b) du procédé décrit dans 8.1.

3	<u>Incubation des échantillons</u> a) Distribuer à l'aide d'une pipette 10 µl d'un échantillon non dilué (sérum ou plasma humain) dans le puits d'incubation correspondant à la bandelette. (Dilution 1 + 200) b) Incuber durant 3 heures en agitant doucement	Pipeter l'échantillon sur une extrémité de la bandelette immergée dans le tampon de lavage A et mélanger le plus rapidement possible en agitant délicatement le plateau d'incubation. Couvrir la capsule d'incubation avec un couvercle en plastique et la placer sur le mélangeur.
---	--	--

9 Résultats

Attention:

Ne pas utiliser l'interprétation automatisée sans tenir compte des consignes d'interprétation décrites ci-dessous.

9.1 Validation - Contrôle qualité

Une évaluation du test peut avoir lieu si les critères suivants sont remplis:

1. bande de contrôle de réaction (ligne supérieure) nettement colorée, bande sombre
2. Classe d'anticorps (deuxième bande): la bande de contrôle du conjugué IgG, resp. IgM, doit être nettement colorée.
3. Contrôle cut-off (troisième bande): coloration légère mais visible

9.2 Évaluation

L'évaluation des bandelettes de test peut être effectuée visuellement ou informatiquement, avec le logiciel d'évaluation de bandelettes recomScan. Le logiciel recomScan est un outil d'aide à l'interprétation des bandelettes. Sur simple demande, MIKROGEN vous fournira de plus amples informations et des consignes relatives à l'évaluation assistée par ordinateur. Les consignes qui suivent s'appliquent à l'évaluation visuelle.

9.2.1 Évaluation de l'intensité des bandes

1. Sur la fiche d'évaluation fournie, noter la date et le numéro de lot, ainsi que la classe d'anticorps détectée.
2. Indiquer le numéro d'identification de l'échantillon sur la fiche d'évaluation.
3. Coller ensuite les bandelettes de test correspondantes dans les champs appropriés de la fiche d'évaluation. Pour ce faire, orienter les bandelettes de test avec la bande de contrôle de réaction vers la ligne de marquage. Ensuite, coller uniquement la partie des bandelettes de test située à gauche de la ligne de marquage avec du ruban adhésif (ne pas recouvrir la bande de contrôle de réaction!). En collant la bandelette sur toute sa surface avec de la colle ou du ruban adhésif, des modifications de couleur pourraient survenir.
4. Maintenant, identifier les bandes des bandelettes testées en les comparant à la bandelette de contrôle imprimée sur la feuille d'évaluation et les indiquer sur la feuille de protocole. Pour cela, procéder à une évaluation de l'intensité des bandes apparues en s'aidant du Tableau 1, séparément pour chaque classe d'immunoglobuline.

Tableau 1: évaluation de l'intensité des bandes par rapport à la bande cut-off

Intensité de coloration des bandes	Évaluation
Aucune réaction	-
Intensité très faible (plus faible que la bande cut-off)	+/-
Intensité faible (identique à la bande cut-off)	+
Intensité forte (plus forte que la bande cut-off)	++
Intensité très forte	+++

9.3 Interprétation des résultats du test

Les critères d'interprétation du test sont indiqués dans Tableau 2.

Tableau 2: interprétation du test

Résultat du test	Critères
Négatifs	aucun antigène \geq cut-off
Incertains	un antigène quelconque \geq cut-off
Positifs	au moins deux antigènes quelconques \geq cut-off

10 Limites de la méthode, restrictions

- Les résultats sérologiques du test doivent toujours être interprétés en tenant compte des autres comptes-rendus médicaux du patient. Les conséquences thérapeutiques de l'analyse sérologique doivent être tirées en tenant compte des données cliniques.
- Pour l'interprétation des résultats du test, la discussion d'éventuelles réactions croisées est importante. Tout comme le genre *Borrelia*, le genre *Treponema* fait également partie de la famille des *Spirochaetaceae*. La littérature décrit des anticorps à réaction croisée contre les antigènes partiels communs dans la famille des *Spirochaetaceae* (4). Les anticorps à réaction croisée contre les antigènes Tp47, TmpA, Tp257 (Gpd), Tp453, Tp17 et Tp15 utilisés dans le recomLine *Treponema* ne sont pas décrits. Il s'agit là d'antigènes du *Treponema pallidum* caractéristiques qui ne montrent aucune réactivité avec les sérums positifs aux borrelies.

- Un résultat de test recomLine *Treponema* négatif n'exclut pas une infection par *Treponema pallidum*. En cas de suspicion d'infection par *Treponema pallidum* ou constatation sérologique négative, un nouveau prélèvement d'échantillon et un nouveau test devraient avoir lieu au bout de quatre semaines.
- Un résultat positif dans IgG et/ou IgM ne signifie pas qu'une maladie s'est déclarée dans chacun des cas.
- **Bandelettes sombres:** certains échantillons patients peuvent donner lieu à une coloration sombre, unie ou irrégulière, sur l'ensemble de la bandelette de nitrocellulose. Différents facteurs du sérum patient sont responsables de cette réaction. En principe, l'évaluation de ces bandelettes est soumise à certaines restrictions. Ainsi, les bandes "inversées" (bandes blanches sur fond sombre), par exemple, doivent être considérées comme négatives. Le sérum correspondant doit impérativement être contrôlé à l'aide d'autres méthodes sérologiques.

11 Caractéristiques

11.1 Sensibilité diagnostique

recomLine Treponema	Résultats préalables positifs dans deux tests de référence			
	Traitement 1h		Traitement 3h	
	IgG (n=280)	IgM (n=90)	IgG (n=39)	IgM (n=38)
Négatifs	0	0	0	0
Incertains	2	7	1	0
Positifs	278	83	38	38
Sensibilité	100%*	100%*	100%*	100%*

* y compris les résultats incertains.

11.2 Spécificité diagnostique

recomLine Treponema	Donneur de sang			
	Traitement 1h		Traitement 3h	
	IgG (n=200)	IgM (n=199)	IgG (n=40)	IgM (n=40)
Négatifs	199	196	40	38
Incertains	1	3	0	2
Positifs	0	0	0	0
Spécificité	99,5%	98,5%	100%	95%

11.3 Spécificité analytique

La spécificité analytique est définie comme la capacité du test à cibler précisément les analytes en présence de facteurs d'interférences potentielles dans la matrice d'échantillon ou de réactions croisées avec des anticorps potentiellement interférents.

a) **Interférences:** plusieurs études de contrôle sur les facteurs potentiellement interférents ont indiqué que les performances du test ne sont pas influencées par les anticoagulants (CPD, citrate de sodium, EDTA, héparine), une hémolyse (jusqu'à 1000 mg/dl d'hémoglobine), une lipémie, une bilirubinémie (jusqu'à 20 mg/dl de bilirubine) ou par des cycles de congélation/décongélation de l'échantillon.

b) **Réactions croisées:** des études de contrôle ont examiné les interférences potentielles d'anticorps contre d'autres organismes (*Borrelia burgdorferi*, VHC, VIH). De plus, d'autres affections ont été associées à une activité atypique du système immunitaire (auto-anticorps anti-nucléaires, facteur rhumatoïde, grossesse, nouvelle infection au virus de l'herpès par ex. VEB*).







* Lors d'infections à VEB aiguës, une réactivité IgM non spécifique peut se produire dans le recomLine *Treponema* IgM (par ex. une stimulation polyclonale).

12 Bibliographie

1. Hagedorn HJ *Treponemen*. Laboratoriums Medizin, Diagnostische Bibliothek 1997, 49, 1-8
2. Larsen SA, Steiner BM, Rudolph AH Laboratory Diagnosis and Interpretation of Tests for Syphilis. Clin. Microbiol. Rev. 1995, 8(1), 1-21
3. Norris SJ and the *Treponema Pallidum* Polypeptide Research Group Polypeptides of *Treponema pallidum*: Progress toward Understanding Their Structural, Functional, and Immunologic Roles. Microbiol. Rev. 1993, 57(3), 750-79
4. Alfen I, Wellensiek HJ Die Bedeutung kreuzreagierender Antikörper für die Serodiagnostik der Lyme-Borreliose und der Syphilis. Lab. Med. 1994, 18, 12-19
5. Sambri V., et al, Western Immunoblotting with Five *Treponema pallidum* Recombinant Antigens for Seroologic Diagnosis of Syphilis, Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 2001 (8), Nr. 3: 534-539
6. Van Voorhis W. C., et al, Serodiagnosis of Syphilis: Antibodies to recombinant Tp0453, Tp92, and Gpd proteins are sensitive and specific indicators of infection by *Treponema pallidum*, Journal of Clinical Microbiology, Aug. 2003, 41/8, 3668-3674
7. Robert Koch Institut, Syphilis in Deutschland im Jahr 2006 und Trends seit 2001, Epidemiologisches Bulletin, Aktuelle Daten und Informationen zu Infektionskrankheiten und Public Health; 20. Juli 2007 / Nr. 29

Nous vous enverrons volontiers une bibliographie plus complète sur le diagnostic *Treponema* sur simple demande.

13 Explication des symboles

	Contenu suffisant pour <n> évaluations Nombre d'évaluations
EVAlFORM	Formulaire d'évaluation
INSTRU	Notice d'emploi
	Respecter la notice d'emploi
CONT	Contenu
IVD	Test de diagnostic in vitro
LOT	Numéro de lot/version
	Ne pas congeler
REF	Réf. catalogue
	à utiliser avant date de péremption
	À conserver entre x°C et y°C
	

14 Données fabricant et version

recomLine Treponema IgG	Référence 5172 (5170)
recomLine Treponema IgM	Référence 5173 (5179)
Notice d'emploi valable à partir de	GARLTP004FR 2023-03
 MIKROGEN GmbH Anna-Sigmund-Str. 10 82061 Neuried Allemagne Tél. +49 89 54801-0 Fax +49 89 54801-100 E-mail mikrogen@mikrogen.de Internet www.mikrogen.de	
	



GARLTP004