

ELI.H.A *Candida*

Sérodiagnostic des candidoses par hémagglutination indirecte

120 tests
(Réf. 44600)

8000130-fr-2012-06



1 - BUT

ELI.H.A *Candida* permet la détermination quantitative des anticorps sériques dirigés contre *Candida albicans* par hémagglutination indirecte.

Le coffret permet de réaliser 120 tests ou 20 réactions de 6 dilutions.

2 - INTRODUCTION

Les candidoses sont des infections opportunistes provoquées par un champignon levuliforme du genre *Candida*.

Candida albicans est la levure la plus fréquemment isolée et la plus pathogène.

Le diagnostic immunologique par recherche d'anticorps présente un grand intérêt dans les suspicions de candidoses invasives, viscérales ou septicémiques, lorsque le champignon ne peut être directement mis en évidence à partir d'un prélèvement.

3 - PRINCIPE

ELI.H.A *Candida* est basé sur le principe de l'hémagglutination indirecte. Les hématies sensibilisées sont constituées d'hématies de mouton recouvertes par un antigène *Candida albicans*.

La présence d'anticorps anti-*Candida albicans* sériques entraîne une agglutination des hématies sensibilisées qui se traduit par un voile rouge / marron tapissant la cupule. En l'absence d'anticorps spécifiques, ces hématies sédimentent au fond de la cupule sous la forme d'un anneau.

Les hématies non sensibilisées assurent la spécificité de la réaction et permettent d'éliminer les interférences dues aux agglutinines naturelles anti-mouton (hétéroanticorps de Forssman, anticorps de la mononucléose infectieuse...).

La réaction s'effectue en microplaque à fond en U.

La manipulation est simple et rapide. Les résultats sont obtenus en 2 heures.

4 - REACTIFS ET MATERIEL

Description	Quantité
R1 : flacon de 2,4 mL d'hématies sensibilisées	1
R2 : flacon de 1 mL d'hématies non sensibilisées	1
BUF : flacon de 55 mL de tampon phosphate pH 7,2	1
R3 : flacon de 2 mL d'adsorbant	1
CONTROL + : flacon de 0,2 mL de contrôle positif titré	1
CONTROL - : flacon de 0,2 mL de contrôle négatif	1
MICROPLATE : microplaque à fond en U	2
DROPPER : compte-gouttes spécial	2

5 - PRECAUTIONS D'EMPLOI

- Les réactifs sont destinés uniquement à un diagnostic *in vitro* et doivent être manipulés par des personnes habilitées. Les tests sont à usage unique.
- Tous les réactifs, sauf le réactif **BUF**, contiennent des substances d'origine animale et doivent être manipulés avec les précautions d'usage.
- Les prélèvements sont potentiellement infectieux. Ils doivent être manipulés avec les précautions d'usage en respectant les règles d'hygiène et la réglementation en vigueur dans le pays d'utilisation.
- Les flacons **CONTROL** contiennent de l'azide de sodium (<0,1%).
- Ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date de péremption.
- Ne pas utiliser de réactifs ni de contrôles provenant de lots différents.
- Bien attendre que le sérum et les réactifs s'équilibrent à température ambiante.
- Agiter soigneusement les réactifs **R1** et **R2** avant utilisation.
- Lors de la distribution des réactifs **R1** et **R2**, veiller à ce que le compte-gouttes soit parfaitement vertical. Vérifier l'absence de bulles d'air dans les gouttes, afin que les volumes délivrés soient constants.

6 - RECUEIL ET TRAITEMENT DES ECHANTILLONS

Utiliser des sérums frais ou conservés à -20°C, et ne présentant pas d'hémolyse de trouble ni de contamination.

Eviter les congélations et décongélations répétées.
Ne pas décomplémenter le sérum.

7 - CONSERVATION ET PREPARATION DES REACTIFS

Les réactifs sont prêts à l'emploi.

Tous les réactifs conservés à 2-8°C sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur le coffret. Ils ne doivent pas être congelés.

8 - MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

- Pipette(s) automatique(s) au volume de pipetage adapté à la quantité à mesurer ;
- Récipients pour déchets contaminés ;
- Centrifugeuse ;
- Tubes à hémolyse.

9 - MODE OPERATOIRE

Equilibrer les réactifs à température ambiante avant emploi.

9.1 - Préparation de l'échantillon

Diluer le sérum à tester au 1/40 :

- 50 µL de sérum ;
- 1,95 mL de réactif **BUF**.

9.2 - Réalisation du test sur microplaque

- A l'aide d'une micropipette multicanaux, distribuer 50 µL de réactif **BUF** dans 8 cupules de la microplaque.
- A l'aide d'une micropipette, distribuer 50 µL du sérum dilué dans la 1^{ère} cupule. Mélanger avec le réactif **BUF** et reporter, de préférence à l'aide d'un micro-diluteur ("tulipe"), 50 µL de la 1^{ère} cupule dans la 2^{ème}, de la 2^{ème} dans la 3^{ème}, et ainsi de suite jusqu'à la 6^{ème} cupule, en rejetant 50 µL de la 6^{ème} cupule. On obtient ainsi les dilutions 1/80 jusqu'au 1/2560.

- Distribuer 50 µL du sérum dilué dans la 7^{ème} cupule. Mélanger avec le réactif **BUF** et rejeter 50 µL. Cette dilution (1/80) constitue le témoin sérum, dont le rôle est de détecter les agglutinines naturelles anti-mouton que peuvent contenir certains sérums.

- Agiter soigneusement les réactifs **R1** et **R2**.
 - Déposer 1 goutte de réactif **R1** dans les 6 premières cupules.
 - Déposer 1 goutte de réactif **R2** dans la 7^{ème} cupule (témoin sérum).
 - Déposer 1 goutte de réactif **R1** dans la 8^{ème} cupule (témoin réactif) dont le rôle est de contrôler la validité du réactif **BUF** et du réactif **R1**.

Remarque : Ne réaliser qu'un seul témoin réactif par série de tests.

- Homogénéiser très soigneusement le contenu des cupules :
 - soit manuellement, par tapotements latéraux sur les côtés de la microplaque, posée à plat ;
 - soit à l'aide d'un agitateur vibreur pour plaques à microtitration (par exemple 1300 tours / minute pendant 10 secondes). Ne pas utiliser d'agitateur orbital.
- Laisser ensuite la plaque immobile, à l'abri de toute vibration.

- Lire la réaction 2 heures plus tard.

9.3 - Adsorption des agglutinines naturelles anti-mouton en cas d'agglutination du témoin sérum

- Agiter soigneusement le réactif **R3**.
- Distribuer dans un tube et mélanger :
 - 0,1 mL de sérum ;
 - 0,3 mL de réactif **R3**.
- Laisser incuber 60 min à température ambiante.
- Centrifuger à 2000 trs/min pendant 15 min.
- Recueillir le surnageant ; le sérum est alors dilué au 1/4.
- Diluer le surnageant au 1/10 dans du réactif **BUF** pour obtenir une dilution mère (1/40) adsorbée.
- Reprendre le protocole de "Réalisation du test sur microplaque" en remplaçant la dilution mère par la dilution mère adsorbée.

10 - LECTURE

Réaction négative : Absence d'hémagglutination.
Présence d'un anneau plus ou moins large au fond de la cupule.

Réaction positive : Présence d'hémagglutination.
Présence d'un voile rouge/marron tapissant la cupule ; parfois, présence d'un fin liseré périphérique.

Exemple : Sérum positif au 1/1280



11 - INTERPRETATION DES RESULTATS

Titre < 1/160 : Réaction non significative d'une infection évolutive.
Renouveler le test 2 à 3 semaines plus tard et associer une électrosynérèse ou une immunoelectrophorèse.

Titre = 1/160 : Réaction douteuse.
Possibilité de candidose évolutive à interpréter suivant le contexte clinique. Renouveler le test 2 à 3 semaines plus tard et associer une électrosynérèse ou une immunoelectrophorèse.

Titre ≥ 1/320 : Réaction significative en faveur d'une candidose évolutive.

12 - CONTROLE QUALITE INTERNE

Les réactifs **CONTROL+** et **CONTROL-** doivent être traités comme les sérums à analyser. Le titre du réactif **CONTROL+** doit être égal au titre annoncé sur l'étiquette du flacon à ± une dilution. Le réactif **CONTROL-** doit présenter une absence d'hémagglutination. Si tel n'est pas le cas, le test n'est pas valide.

13 - CAUSES D'ERREURS ET LIMITES DU TEST

- Mauvaise conservation du sérum.
- Mauvaise conservation des réactifs après ouverture.
- Utiliser exclusivement les compte-gouttes fournis dans le coffret.
- Ne pas inter-changer les compte-gouttes entre les réactifs **R1** et **R2**.
- En cas de réaction positive dans les 6 premières cupules, poursuivre les dilutions pour rechercher le titre d'hémagglutination limite.
- Le témoin sérum doit donner une réaction négative (anneau). En cas d'hémagglutination de ce témoin, il est nécessaire de renouveler le test après avoir éliminé les agglutinines naturelles anti-mouton du sérum par adsorption.
- Le témoin réactif doit donner une réaction négative (anneau). En cas d'hémagglutination de ce témoin, le réactif **ELI.H.A Candida** n'est pas utilisable.
- Certains sérums, dont la concentration en anticorps est très élevée, peuvent donner lieu à un phénomène de zone (avec rétraction du voile) dans les premières dilutions, qui disparaît dans les dilutions suivantes.
- La qualité des réactifs permet d'exécuter la réaction le soir et d'effectuer la lecture le lendemain matin, à condition que la microplaque ne subisse aucun déplacement et soit à l'abri des vibrations.
- Dans tous les cas et avant l'établissement du diagnostic final, l'interprétation du test doit être réalisée en intégrant l'ensemble des données cliniques, épidémiologiques et biologiques et des résultats des autres tests.

14 - PERFORMANCES

ELI.H.A Candida est constitué d'hématies sensibilisées par un antigène *Candida albicans*. Il assure sensibilité et spécificité à la réaction.

Ainsi, les résultats des évaluations du test montrent une sensibilité de 85,4 % et une spécificité de 97,9 %.

15 - ELIMINATION DES DECHETS

Les déchets doivent être éliminés en respectant les règles d'hygiène et la réglementation en vigueur pour ce type de produit dans le pays d'utilisation.

En cas de versement accidentel de réactif **BUF**, nettoyer le plan de travail à l'aide de papier absorbant et rincer avec de l'eau. En cas de versement de sérum ou d'un autre réactif, nettoyer à l'aide d'eau de Javel et de papier absorbant.

16 - BIBLIOGRAPHIE

- 1- J. PARIS, A. CAPRON, A. VERNES, J.-C. PARIS, S. ANDRIEU - Apport de l'immunologie à l'étude des candidoses digestives - *Arch. Fr. Mal. App. Dig.*, 1973, 62, 309-313.
- 2- P. WATTRE, J.-C. DUGIMONT, A. CAPRON - Progrès récents dans le diagnostic immunologique des candidoses humaines - *Bull. Soc. Myc. Méd.*, 1975, IV, n° 2, 155-158.
- 3- H. ZOUAGHI, M. GAUTHIER - Diagnostic immunologique des candidoses - *Feuil. Biol.*, 1980, XXI, 112, 59-65.
- 4- P. WATTRE, A. DEWILDE, D. DURIEZ - Diagnostic immunologique des candidoses ; étude critique à propos de 123 observations. Perspectives d'avenir - *Méd. Mal. Inf.*, 1984, 14 (5), 308-313.
- 5- P. CANTON, B. DUPONT, T. MAY - Nouveaux aspects des candidoses systémiques - *Méd. Mal. Inf.*, 1984, 14 (11), 582-588.

ELITech MICROBIO

Parc d'Activités du Plateau
19 Allée d'Athènes
83870 SIGNES
FRANCE

☎ : 04 94 88 55 00

Fax : 04 94 88 55 22



ELI.H.A *Candida*

Serodiagnosis of candidiasis by indirect haemagglutination

120 tests
(Ref. 44600)

8000130-en-2012-06



1 - AIM

ELI.H.A *Candida* enables the quantitative determination of anti-*Candida albicans* serum antibodies by indirect haemagglutination. Each kit allows 120 tests to be carried out or 20 reactions of 6 dilutions.

2 - INTRODUCTION

The candidiasis are opportunistic infections caused by yeast-like fungi of the *Candida* genus. *Candida albicans* is the most frequently isolated fungus and is also the most pathogenic. Immunological diagnosis via the detection of antibodies is highly important in suspected invasive, visceral or septicaemic *Candida* infections where the fungus cannot be directly isolated from a clinical sample.

3 - PRINCIPLE

ELI.H.A *Candida* is based on the indirect haemagglutination principle. The sensitized red blood cells consist of sheep red blood cells covered with a *Candida albicans* antigen. The presence of anti-*Candida albicans* serum antibodies results in agglutination of the sensitized red blood cells resulting in a cloudy red/brown deposit coating the well. In the absence of specific antibodies, the red blood cells form a ring-like deposit at the bottom of the well. The non-sensitized red blood cells ensure the specificity of the reaction making it possible to eliminate any interference from the natural anti-sheep agglutinins (Forssman heteroantibodies, infectious mononucleosis antibodies...). The reaction is carried out in a U-microplate. Handling is simple and fast, with results within 2 hours.

4 - REAGENTS AND MATERIAL

Description	Quantity
R1: Vial of 2.4 mL of sensitized red blood cells	1
R2: Vial of 1 mL of non-sensitized red blood cells	1
BUF: Vial of 55 mL of phosphate buffer pH 7.2	1
R3: Vial of 2 mL of adsorbent	1
CONTROL +: Vial of 0.2 mL of titrated positive control	1
CONTROL -: Vial of 0.2 mL of negative control	1
MICROPLATE: Microplate with a U-bottom	2
DROPPER: Special dropper	2

5 - PRECAUTIONS

- The reagents are intended for *in vitro* diagnostic use only and must be handled by authorized personnel. Tests are for a single use only.
- All the reagents, except the BUF reagent, contain raw materials of animal origin and must be handled with caution.
- Patient samples are potentially infectious. They must be handled with caution, in observance of hygiene rules and the current regulations for this type of product in the country of use.
- The CONTROL reagents contain sodium azide (<0.1%).
- Do not use reagents after the expiry date.
- Do not use reagents from different batch numbers.
- Prior to use, allow the serum and the reagents to reach room temperature.
- Carefully shake the R1 and R2 reagents before use.
- When dispensing the R1 and R2 reagents, make sure that the dropper is perfectly vertical. Check for the absence of air bubbles in the drops to ensure constant delivery volumes.

6 - SAMPLE COLLECTION AND TREATMENT

Use fresh serum or serum preserved at -20°C, and not showing any sign of haemolysis, cloudiness or of contamination. Avoid repeated freezing and defrosting. Do not decompiment the serum.

7 - STABILITY, STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

The reagents are ready-to-use. All the reagents stored at 2-8°C, in their original packaging, are stable until the expiry date indicated on the box. Do not freeze.

8 - MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Automatic pipette(s) with a pipetting volume adapted to the volume that will be measured;
- Contaminated waste containers;
- Centrifuge;
- Haemolysis tubes.

9 - METHOD

Allow the reagents to reach room temperature before use.

9.1 - Sample preparation

Carry out a 1:40 dilution of the serum to be tested:

- 50 µL of serum;
- 1.95 mL of BUF reagent.

9.2 - Realization of the test on a microplate

- Using a multichannel micropipette, add 50 µL of BUF reagent to 8 wells of the microplate.

- Using a micropipette, add 50 µL of diluted serum to the 1st well. Mix the serum with the BUF reagent and carry out a serial dilution, preferably using a microdiluter, by transferring 50 µL from the 1st well into the 2nd, then 50 µL from the 2nd to the 3rd, and so on until the 6th well is reached. 50 µL from the 6th well is then discarded. In this way, dilutions from 1:80 to 1:2560 are obtained.

- Add 50 µL of diluted serum to the 7th well. Mix the serum with the BUF reagent and then discard 50 µL. This dilution (1:80) is the serum control, whose role is to detect the natural anti-sheep agglutinins that could be present in certain serum samples.

- Carefully shake the R1 and R2 reagents.
 - Add 1 drop of R1 reagent to the first 6 wells.
 - Add 1 drop of R2 reagent to the 7th well (serum control).
 - Add 1 drop of R1 reagent to the 8th well (reagent control) whose role is to control the validity of the BUF and R1 reagent.

Note: Only carry out one reagent control for each series of tests.

- Very carefully, shake the contents of the wells:
 - either manually, by tapping laterally the side of the microplate that has been posed flat on the bench;
 - or by using a vibrating plate shaker for microtiter plates (for example at 1300 rpm for 10 seconds). Do not use an orbital shaker.
- Now leave the plate to rest, away from any sources of vibration.

- The plate can be read after 2 hours.

9.3 - Adsorption of the natural anti-sheep agglutinins in the event of agglutination of the serum control

- Carefully shake the R3 reagent.
- In a tube, add and mix:
 - 0.1 mL of serum;
 - 0.3 mL of R3 reagent.
- Incubate at room temperature for 60 minutes.
- Centrifuge at 2000 rpm for 15 minutes.
- Collect the supernatant; the serum is now at a 1:4 dilution.
- Carry out a 1:10 dilution of the supernatant in BUF reagent to obtain an adsorbed stock dilution (1:40).
- Follow the steps described in "Realization of the test on a microplate", but replace the stock dilution by the adsorbed stock dilution.

10 - READING

Negative reaction: Absence of haemagglutination. Presence of a more or less large ring at the bottom of the well.

Positive reaction: Presence of haemagglutination. Presence of a cloudy red/brown deposit coating the well, sometimes there is the presence of a fine peripheral border.

Example: Serum positive at a dilution of 1:1280



11 - INTERPRETATION OF RESULTS

Titer < 1:160:

Non significant reaction of a progressive infection. Renew the test 2 to 3 weeks later and also carry out an electrosyneresis or an immunoelectrophoresis test.

Titer = 1:160:

Doubtful reaction.

Possibility of a progressive candidiasis. The results must be interpreted by taking into account the full clinical picture. Renew the test 2 to 3 weeks later and also carry out an electrosyneresis or an immunoelectrophoresis test.

Titer ≥ 1:320:

Significant reaction in favour of progressive candidiasis.

12 - INTERNAL QUALITY CONTROL

The CONTROL + and CONTROL - reagents must be treated like test serums. The titer of the CONTROL + reagent must be the same as the titer printed on the vial label ± one dilution. There must not be any haemagglutination of the CONTROL -. If haemagglutination is present then the test is not valid.

13 - CAUSES OF ERROR AND TEST LIMITS

- Poor conservation of the serum.
- Poor conservation of the reagents after opening.
- Only use the droppers provided in the kit.
- Do not interchange the droppers between the R1 and R2 reagents.
- In the case of a positive reaction in the first 6 wells, carry out a further serial dilution in order to determine the titer limit of haemagglutination.
- The serum control must give a negative reaction (ring). In the event of haemagglutination of this control, it will be necessary to renew the test after having eliminated the natural anti-sheep agglutinins from the serum by adsorption.
- The reagent control must give a negative reaction (ring). In the event of haemagglutination of this control, the ELI.H.A *Candida* cannot be used.
- Certain serums, whose antibody concentration is very high, can give rise to a zone phenomenon (with disappearance of the clouding) in the initial dilutions, which disappears in the subsequent dilutions.
- The quality of the reagents makes it possible to carry out the reaction in the evening and to read the test the following morning, provided that the microplate is not moved in any way and is protected from any sources of vibration
- In all cases, it is necessary that the clinical, epidemiologic and biological data are taken fully into consideration before establishing the final diagnosis.

14 - PERFORMANCE

ELI.H.A *Candida* consists of red blood cells sensitized by a *Candida albicans* antigen, that ensures the specificity and sensitivity of the reaction. Evaluation has demonstrated that the test has a sensitivity of 85.4% and a specificity of 97.9%.

15 - WASTE ELIMINATION

Waste should be disposed of in accordance with the hygiene rules and current regulations for this kind of product in the country of use. If the BUF reagent is spilled, clean the work area with absorbent paper and rinse with water. If a serum or another reagent is spilled on the work area, clean using bleach and absorbent paper.

16 - BIBLIOGRAPHY

- 1- J. PARIS, A. CAPRON, A. VERNES, J.-C. PARIS, S. ANDRIEU - Apport de l'immunologie à l'étude des candidoses digestives - *Arch. Fr. Mal. App. Dig.*, 1973, 62, 309-313.
- 2- P. WATTRE, J.-C. DUGIMONT, A. CAPRON - Progrès récents dans le diagnostic immunologique des candidoses humaines - *Bull. Soc. Myc. Méd.*, 1975, IV, n° 2, 155-158.
- 3- H. ZOUAGHI, M. GAUTHIER - Diagnostic immunologique des candidoses - *Feuill. Biol.*, 1980, XXI, 112,59-65.
- 4- P. WATTRE, A. DEWILDE, D. DURIEZ - Diagnostic immunologique des candidoses ; étude critique à propos de 123 observations. Perspectives d'avenir - *Méd. Mal. Inf.*, 1984, 14 (5), 308-313.
- 5- P. CANTON, B. DUPONT, T. MAY - Nouveaux aspects des candidoses systémiques - *Méd. Mal. Inf.*, 1984, 14 (11), 582-588.



ELITech MICROBIO
Parc d'Activités du Plateau
19 Allée d'Athènes
83870 SIGNES
FRANCE
☎ : 04 94 88 55 00
Fax : 04 94 88 55 22