

FR – La notice 8000160-FR-2012-02 a été mise à jour depuis le numéro de lot 10037A. Les changements apportés dans la nouvelle version 8000160-FR-2023-09 sont surlignés en gris.

EN – The IFU 8000160-EN-2012-02 has been updated from lot number 10037A. Changes made in new version 8000160-EN-2023-09 are highlighted in grey.

ES – La instrucción de uso 8000160-ES-2012-02 ha sido actualizada a partir del número de lote 10037A. Los cambios realizados en la nueva versión 8000160-ES-2023-09 están resaltados en gris.

DE – Die Gebrauchsanweisung 8000160-DE-2012-02 wurde ab Losnummer 10037A aktualisiert. Die in der neuen Version 8000160-DE-2023-09 vorgenommenen Änderungen sind grau unterlegt.

NL – De gebruiksaanwijzing 8000160-NL-2012-02 is bijgewerkt met lotnummer 10037A. Wijzigingen in de nieuwe versie 8000160-NL-2023-09 zijn grijs gemarkeerd.

IT - Le istruzioni per l'uso 8000160-IT-2012-02 sono state aggiornate dal lotto numero 10037A. Le modifiche apportate nella nuova versione 8000160-IT-2023-09 sono evidenziate in grigio.

ELI.H.A TOXO

Sérodiagnostic de la Toxoplasmose par hémagglutination indirecte

120 tests
(Réf. 66610)

8000160-FR-2023-09



1 - BUT

Le dispositif **ELI.H.A TOXO** permet la détermination semi-quantitative des anticorps sériques dirigés contre *Toxoplasma gondii* par hémagglutination indirecte. Le coffret permet de réaliser 120 tests ou 20 réactions de 6 dilutions.

2 - INTRODUCTION

La toxoplasmose est une infection parasitaire dont l'agent est le protozoaire *Toxoplasma gondii*. Bénigne, voire asymptomatique dans l'immense majorité des cas, elle ne présente de risque sérieux que pour les femmes enceintes séronégatives, les nouveaux nés et les sujets ayant un système de défense immunitaire affaibli. Lors de la réponse immunitaire, l'individu développe plusieurs types d'anticorps, dirigés contre les antigènes toxoplasmiques différents. Le pourcentage relatif de chacun de ces anticorps dans le sérum peut varier d'un sujet à l'autre, et, chez un même sujet, selon le stade d'évolution de l'infection (1,2,3,4).

3 - PRINCIPE

ELI.H.A TOXO est basé sur le principe de l'hémagglutination indirecte. Les hématies sensibilisées sont constituées d'hématies de mouton recouvertes par un antigène toxoplasmique. Cette technique permet de déceler les IgG et les IgM anti-toxoplasmiques dans les sérums de patients. Il est possible de les différencier en traitant le sérum par du 2-mercaptoéthanol (2-ME) qui inhibe le pouvoir agglutinant des IgM (2).

La présence d'anticorps anti-*Toxoplasma gondii* 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, etc).

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 : microplaques à fond en U	2
DROPPER : compte-gouttes spécial (18 ± 2 µL)	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 provenant de lots différents.
- Ne pas utiliser les réactifs endommagés ou mal conservés avant utilisation.
- Laisser les réactifs et les échantillons revenir à température ambiante avant d'effectuer le test.
- Agiter soigneusement les réactifs **R1** et **R2** avant utilisation : une agitation manuelle vigoureuse ou au vortex est obligatoire pour l'homogénéisation des hématies. Il convient de s'assurer qu'il ne reste aucun dépôt d'hématies dans le fond du flacon.
- 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 obtenus après un prélèvement sanguin sur tube sec (jusqu'à 7 jours de conservation entre +2°C et +8°C ou à -20°C pour une conservation supérieure à 7 jours), et ne présentant ni hémolyse, ni trouble, ni ictère, ni contamination. Il est recommandé à chaque laboratoire de vérifier la compatibilité des tubes de prélèvements utilisés.

Ne pas effectuer de recongélation de l'échantillon.

Ne pas décomplémenter le sérum.

7 - CONSERVATION ET PREPARATION DES REACTIFS

Les réactifs sont prêts à l'emploi.

Les réactifs conservés entre +2°C et +8°C sous leur état d'origine 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
- 2-mercaptoéthanol (2-ME)
- Centrifugeuse
- Tubes à hémolyse

9 - MODE OPERATOIRE

Laisser les réactifs et les sérums à analyser revenir à température ambiante avant utilisation.

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 à l'aide d'une micropipette 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 vigoureusement ou au vortex les réactifs **R1** et **R2** avant utilisation.
 - 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, jusqu'à homogénéisation complète des cupules;
 - soit à l'aide d'un agitateur vibreur pour plaques à microdilution (jusqu'à 1500 rpm). Ne pas utiliser d'agitateur orbital.

- Laisser ensuite la plaque immobile, à l'abri de toute vibration, à température ambiante comprise entre +15°C et +30°C.
- Lire la réaction 2 heures plus tard. Les résultats sont interprétables dès 1h30 de réaction minimum et jusqu'à 24h maximum.

9.3 - Mise en évidence des IgM : traitement au 2-mercaptoéthanol

- La détermination des anticorps anti-toxoplasmiques, avant et après traitement du sérum au 2-ME, permet de mettre en évidence la présence d'anticorps de type IgM.
- Préparer la solution de 2-ME : 140 µL de 2-ME qsp 10 mL avec le réactif **BUF**. Cette solution doit être conservée dans un flacon de couleur brune. Elle est stable 1 mois entre +2°C et +8°C.
 - Agiter et distribuer 50 µL de cette solution de 2-ME dans 6 cupules de la microplaque.
 - Suivre ensuite le protocole de « Réalisation du test sur microplaque » à partir de la deuxième étape.

9.4 - 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 800 g 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" remplaçant la dilution mère par la dilution mère adsorbée.

10 - CONTROLE QUALITE INTERNE

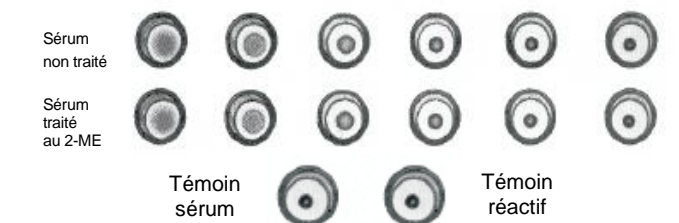
- Les réactifs **CONTROL+** et **CONTROL-** doivent être traités comme les sérums à analyser. Le titre du **CONTROL+** doit être égal au titre annoncé sur l'étiquette du flacon à ± une dilution. Le **CONTROL-** doit présenter une absence d'hémagglutination. Si tel n'est pas le cas, le test n'est pas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

11 - 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.

Des images réactionnelles d'hémagglutination, obtenues avec des sérums positifs, sont représentées ci-après.

Exemple 1 : 1/80 1/160 1/320 1/640 1/1280 1/2560



↳ Sérum positif au 1/160 ne contenant pas d'IgM

Exemple 2 : 1/80 1/160 1/320 1/640 1/1280 1/2560



Sérum non traité positif au 1/640 - Sérum traité au 2-ME positif au 1/80

↳ **Sérum positif contenant des IgM**

Le titre est donné par la première dilution présentant un anneau large et périphérique. Le titre en UI/mL est égal à l'inverse de cette dilution limite multiplié par le seuil de sensibilité du réactif indiqué sur le coffret.

Exemple : Si un sérum est positif jusqu'à la dilution 1/320, et que le seuil de sensibilité est de 0,1 UI/mL, le titre de ce sérum sera alors de 320 x 0,1 = 32 UI/mL.

12 - INTERPRETATION DES RESULTATS

Titre < 1/80 : Réaction négative.

Absence d'anticorps anti-toxoplasme ou taux non décelable.

- **Examen de dépistage :** absence d'immunité probable nécessitant une surveillance sérologique en cas de grossesse et de patient immunodéprimé.
- **Examen effectué en cas de suspicion d'infection toxoplasmique chez un patient immunocompétent :** absence d'infection toxoplasmique ou infection débutante très récente. A contrôler avec un nouveau prélèvement pour mettre en évidence l'apparition éventuelle d'anticorps.

Traitement au 2-mercaptoéthanol (2-ME) :

Un traitement du sérum par le 2-ME permet d'éliminer la réponse due aux IgM. Une diminution de titre d'au moins 2 dilutions du sérum avant et après traitement au 2-ME traduit la présence d'anticorps de type IgM. Présomption de toxoplasmose évolutive. Dans le cas contraire : immunité ancienne probable (anticorps résiduels).

1/80 ≤ Titre < 1/160 : Réaction équivoque

Présence d'anticorps anti-toxoplasme à taux limite. Une éventuelle absence d'IgM peut être démontrée par le traitement du sérum au 2-ME.

- **Si IgG équivoque (1/80) et IgM négatives :** réaliser une technique de confirmation des IgG de principe différent ; l'envoi du sérum à un laboratoire expert est recommandé pour réalisation de techniques complémentaires :
 - Si le résultat des techniques complémentaires de recherche d'IgG est négatif : conclure par l'absence d'anticorps IgG ; suivi sérologique à adapter (grossesse ou patient immunodéprimé).
 - Si le résultat des techniques complémentaires de recherche d'IgG est positif : une infection ancienne est probable ; le résultat est à confirmer sur un nouveau prélèvement à 3 semaines d'intervalle.

Titre ≥ 1/160 : Réaction positive

Présence d'anticorps anti-toxoplasme à taux significatif. Un traitement du sérum au 2-ME peut être réalisé pour rechercher la présence d'IgM.

- **Si IgG positives (> 1/160) et IgM négatives :**
 - Dans le cas d'un patient immunodéprimé, présence d'une infection ancienne ; le résultat de la sérologie est à confronter avec la clinique, la biologie et le degré d'immunodépression.
 - Dans le cas d'un patient immunocompétent ou enceinte, un contrôle sérologique à 3 semaines doit être pratiqué :
 - Si le titre en IgG est stable : l'infection est ancienne.
 - Si le titre en IgG est en augmentation : pratiquer une datation de l'infection par une méthode d'avidité des IgG pour pouvoir conclure sur une infection récente ou une possible réactivation de l'infection.
- **Si IgG négatives et IgM positives (> 1/160) :** dans ce cas, réaliser une technique de confirmation de recherche des IgM de principe différent. Si résultats positifs alors infection récente probable, réaliser un nouveau contrôle sérologique à 2 semaines. Si résultats négatifs alors IgM naturelles non spécifique ou interférences, l'infection récente ne peut pas être exclue, réaliser un contrôle sérologique à 2 semaines.

• Si IgG et IgM positives (> 1/160) :

- En cas de patient immunodéprimé, les résultats de la sérologie seront à confronter avec la clinique, la biologie et le degré d'immunodépression.
- En cas de grossesse ou de patient immunocompétent, réaliser la datation de l'infection par un test d'avidité des IgG.

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.
- 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 nomenclature française des actes de biologie médicale précise que l'on doit réaliser 2 tests simultanément pour le diagnostic sérologique de la toxoplasmose. L'interprétation globale de cette sérologie devra donc être faite en fonction des résultats des différentes techniques utilisées. Dans tous les cas, il est nécessaire d'intégrer l'ensemble des données cliniques, épidémiologiques et biologiques avant d'établir le diagnostic final.

14 - PERFORMANCES

14.1 - Sensibilité / Spécificité / Diagnostic

Le seuil de sensibilité du réactif, exprimé en UI/mL, est indiqué sur le coffret.

La sensibilité des techniques proposées pour le sérodiagnostic de la toxoplasmose vis-à-vis de chacun de ces anticorps varie selon la nature de l'antigène utilisé dans la réaction.

De plus, l'étalement international peut contenir un pourcentage relatif de chacun des anticorps différents de celui du sérum à tester. Le titre exprimé en UI/mL peut donc varier significativement selon les méthodes utilisées.

C'est pourquoi, il est indispensable de préciser la technique utilisée en unités internationales pour rendre les résultats du diagnostic.

La qualité des réactifs permet d'exécuter la réaction le soir et d'effectuer la lecture le lendemain matin (soit après 24h de réaction maximum), à condition que la microplaque ne subisse aucun déplacement et soit à l'abri des vibrations.

Le réactif R1 est constitué d'hématies sensibilisées par un antigène toxoplasmique total mixte qui comprend à la fois les constituants endogènes et les constituants membranaires du toxoplasme. Il assure sensibilité et spécificité à la réaction.

Les résultats de sensibilité et spécificité ont été synthétisés en s'appuyant sur deux études (5,6). Une première étude comprenant 1710 sérums positifs en IgG/IgM anti *Toxoplasma* et 1290 sérums négatifs (5), et, une deuxième étude comprenant 342 sérums positifs en IgG/IgM anti *Toxoplasma* et 247 sérums négatifs (6), ont été analysées à l'aide du modèle de Meta Analyse (package « META ») du logiciel R (<https://www.r-project.org/>).

Ainsi, les résultats de cette méta analyse montrent une sensibilité diagnostique de 99 % IC95 % [99 %-99 %] et une Spécificité diagnostique de 98 % IC95 % [96 %-99 %]. Les valeurs prédictives positives (VPP) sont comprises entre 98.3 % et 99.5 % et les valeurs prédictives négatives (VPN) sont comprises entre 98 % et 98.8 %.

14.2 - Limite de quantification

La limite de quantification du test ELI.H.A TOXO est définie par le seuil de sensibilité et correspond à la dilution de la première cupule du test. Sa valeur est égale à l'inverse de cette dilution multiplié par le seuil de sensibilité.

14.3 - Répétabilité

Sur des sérums positifs avec des titres supérieurs à 16 UI/mL, le dispositif ELI.H.A TOXO a une répétabilité de 100 % avec une tolérance acceptable de +/- une dilution. Sur des sérums négatifs strictement inférieur à 8 UI/mL, le dispositif ELI.H.A TOXO a une répétabilité de 100 % sans tolérance de positivité dans le résultat.

14.4 - Reproductibilité

Sur des sérums positifs avec des titres supérieurs à 16 UI/mL, le dispositif ELI.H.A TOXO a une reproductibilité de 100 % avec une tolérance acceptable de +/- une dilution. Sur des sérums négatifs strictement inférieurs à 8 UI/mL, le dispositif ELI.H.A TOXO a une reproductibilité de 100 % sans tolérance de positivité dans le résultat.

14.5 - Interférences

Des réactions croisées ont été observées avec des échantillons positifs en anticorps antinucléaires ou en anticorps anti-syphilis.

Il n'a pas été observé de réactions croisées avec des échantillons positifs en anticorps sclérodermiques, en anticorps IgM HA (hépatite A), IgM CMV (cytomégalovirus) ou en anticorps Lyme (6).

Les interférences potentielles avec l'hémoglobine, les lipides et la bilirubine ont été étudiées selon les recommandations du CLSI EP07 (7,8,9,10,11).

Aucune interférence significative n'a été détectée jusqu'aux concentrations maximales suivantes :

Substance testée	Concentrations maximales
Bilirubine	800 mg/L
Lipides	15 g/L
Hémoglobine	10 g/L

14.6 - Linéarité / Justesse

Le test ELI.H.A TOXO permet d'obtenir des résultats de titration directement proportionnels à la quantité d'analyte (Anticorps anti-*Toxoplasma gondii*) présent dans l'échantillon, dans l'intervalle de mesure de 8 à 256 UI/mL.

Le biais de justesse de la méthode ELI.H.A TOXO est de :

sérum < 8 UI/mL :	0 %
sérum à 10,4 UI/mL :	15,38 %
sérum à 213,5 UI/mL :	-10,07 %

Tout incident grave en lien avec le dispositif fait l'objet d'une notification au fabricant et à l'autorité compétente de l'état membre dans lequel l'utilisateur est établi.

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. Société Française de Microbiologie Toxoplasmose. In : REMIC : Société Française de Microbiologie Ed ; 2022 : p.1011 - 1022
2. Association française des enseignants de parasitologie et mycologie Technique d'agglutination. In : Parasitologie et mycologie médicales ELSEVIER Ed ; 2022 : p169 -172
3. Association française des enseignants de parasitologie et mycologie Toxoplasmose. In : Parasitologie et mycologie médicales ELSEVIER Ed ; 2022 : p279 – 288
4. Rapport HAS – Février 2017 – Diagnostic biologique de la toxoplasmose acquise du sujet immunocompétent (dont la femme enceinte), la toxoplasmose congénitale (diagnostic pré- et postnatal) et la toxoplasmose oculaire EVALUATION DES TECHNOLOGIES DE SANTÉ - Mis en ligne le 13 févr. 2017 https://www.has-sante.fr/jcms/c_2653655/fr/diagnostic-biologique-de-la-toxoplasmose-acquise-du-sujet-immunocompetent-dont-la-femme-enceinte-la-toxoplasmose-congenitale-diagnostic-pre-et-postnatal-et-la-toxoplasmose-oculaire
5. J.-C. Fourlinnie R. Guffroy, J.-C. Herbaut, et al. Optimisation du dépistage des anticorps antitoxoplasmiques IgG et IgM par l'association d'une réaction d'hémagglutination indirecte et d'un test au latex standardisé sur plaque de kine, Feuilles de biologie, 1985-Vol.XXVI-N146
6. Villard O, Cimon B, Franck J, et al. Evaluation of the usefulness of six commercial agglutination assays for serologic diagnosis of toxoplasmosis. Diagn Microbiol Infect Dis. 2012;73(3):231-235.
7. Lo SY, Saifee NH, Mason BO, Greene DN. Filling in the gaps with non-standard body fluids. Pract Lab Med. 2016 Mar 16;5:24-31. doi: 10.1016/j.plabm.2016.03.003. PMID: 28856201; PMID: PMC5574517.
8. CLSI. Interference Testing in Clinical Chemistry. 3rd ed. CLSI guideline EP07. Wayne, Pa: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018. p23-24
9. CLSI. Supplemental Tables for Interference Testing in Clinical Chemistry. 1st ed. CLSI supplement EP37. Wayne, Pa: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018. p94-96
10. Hyperbilirubinémie néonatale - Pédiatrie - Édition professionnelle du Manuel MSD § Etiologie de l'hyperbilirubinémie néonatale p5 (msdmanuals.com)
11. Bilirubine - Normes biologiques - Cours IFSI - Fiches IDE § Présence d'ictère p3 (fiches-ide.fr)

Les modifications par rapport à la version précédente sont surlignées en gris



ELITECH MICROBIO
Parc d'activités du Plateau
19 allée d'Athènes 83700 SIGNES
FRANCE
☎ 33 (0)4 94 88 55 00
<http://www.elitechgroup.com>