

INTRODUCTION

Le test diagnostique rapide (TDR) de l'ulcère de Buruli a pour but de détecter des infections actives de *Mycobacter ulcerans*, le pathogène responsable pour l'ulcère de Buruli. Le test détecte la présence de mycolactone (ML), un métabolite cytotoxique de *M. ulcerans*, et fonctionne avec des exsudats collectés au moyen d'un écouvillon.

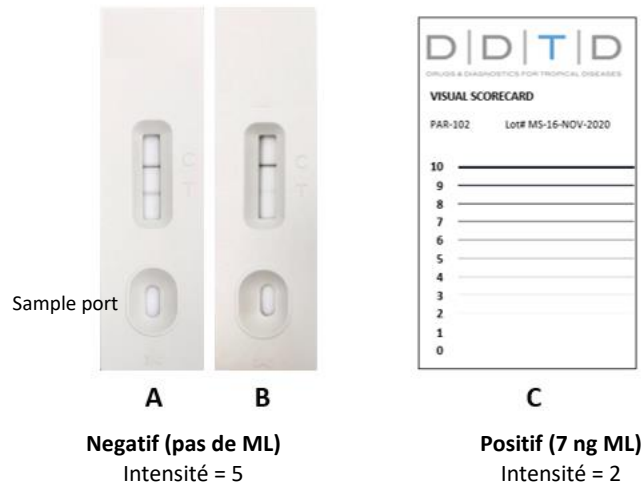


Figure 1. Exemple d'un test négatif (A) et positif (B). T – ligne de test, C – ligne de contrôle. (C) fiche de lecture, avec intensités allant de 0 (non visible) à 10 (maximum).

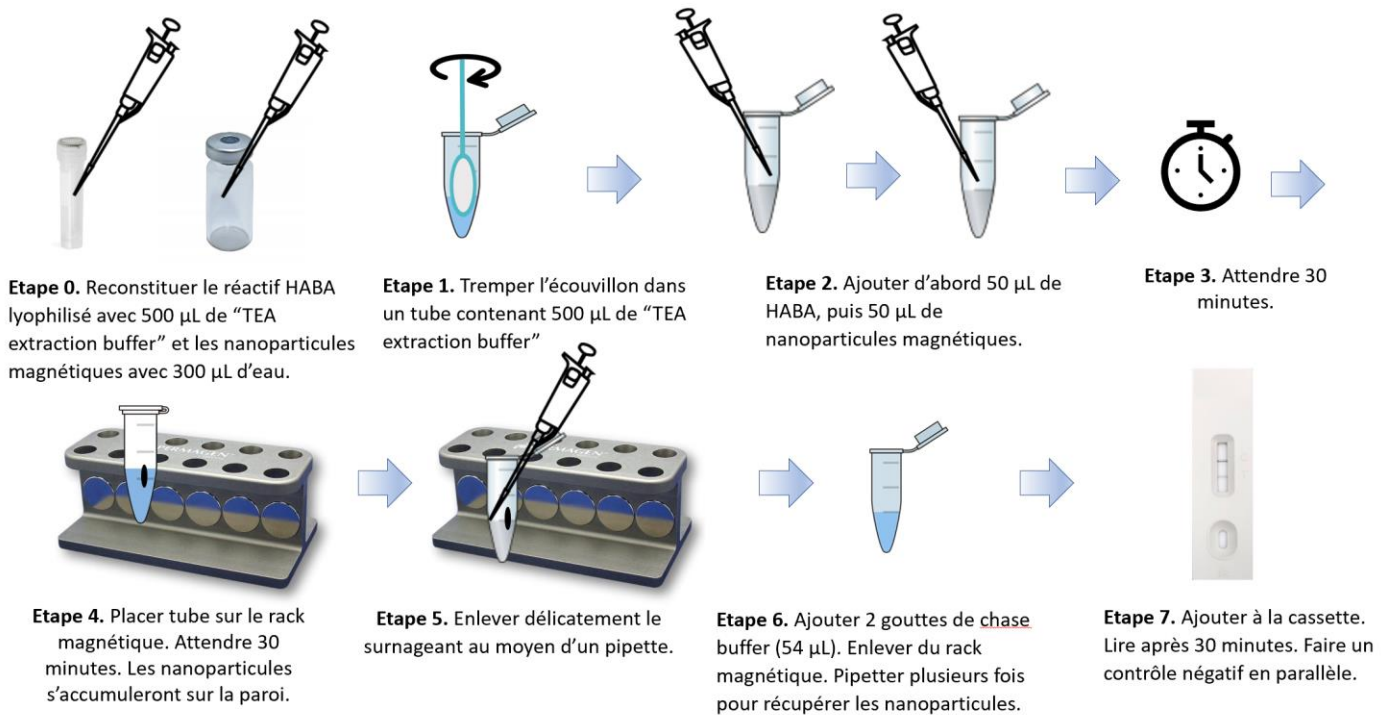


Figure 2. Procédé.

PRINCIPE

Le TDR détecte la mycolactone par le biais d'un format dit «compétitif». A cause de ce format, le test produit une forte ligne de test en l'absence de mycolactone, et une ligne plus faible en présence de mycolactone, ce qui peut sembler contre-intuitif (Figure 1). Pour que le résultat soit considéré positif, la ligne de test doit être plus faible que celle d'un contrôle positif d'au moins trois unités lorsque évaluée avec la fiche de lecture.

PROCESSUS

Le procédé est résumé sur la Figure 2.

Etape 0 : Le « Heterophilic Antibody Blocking Agent (HABA) » est reconstitué avec le « TEA Extraction Buffer » ; en parallèle, les nanoparticules magnétiques sont reconstituées avec de l'eau déionisée.

Etape 1 : L'échantillon (exsudat) est prélevé d'une liaison soupçonnée d'être due à l'ulcère de Buruli avec un écouvillon, puis la mycolactone est extraite avec le « TEA Extraction Buffer ».

Etape 2 : Le HABA et les nanoparticules magnétiques reconstituées (étape 0) sont ajoutés à la solution de mycolactone (étape 1).

Etape 3 : Le mélange est incubé pendant 30 minutes. La mycolactone, si présente, se liera aux nanoparticules magnétiques. Ces nanoparticules sont couvertes d'anticorps monoclonaux spécifiques pour la mycolactone, et les anticorps seront saturés en mycolactone.

Etapes 4-5 : Un aimant est utilisé pour retenir les nanoparticules magnétiques et ôter les autres substances. Ceci est essentiellement équivalent à un procédé de concentration et purification.

Etapes 6-7 : Les nanoparticules sont récupérées et appliquées sur la cassette, avec un éluant (« Chase Buffer »). La cassette contient une bandelette de nitrocellulose sur laquelle de la mycolactone synthétique a été déposée à la hauteur de la ligne de test. Si l'échantillon ne contient pas de mycolactone, les anticorps conjugués aux nanoparticules magnétiques pourront se lier à la mycolactone synthétique positionnée sur la ligne de test, et l'accumulation de nanoparticules mènera à la formation d'une ligne visible à l'œil nu. Si au contraire l'échantillon contient de la mycolactone, elle saturera les anticorps, et les nanoparticules ne seront plus en mesure de se lier à la ligne de test, et par conséquent aucun signal n'apparaîtra.

Note: En guise de référence, un control négatif devrait toujours être conduit en parallèle avec l'échantillon analysé. Dans cette phase de recherche et développement un test, il pourrait s'avérer trompeur de se fier aux résultats sans prendre en considération un contrôle négatif.

STOCKAGE

Les tests doivent rester dans leur emballage et être maintenus à 4 °C. Porter à température ambiante au moins une heure avant d'utiliser le test. Ouvrir les emballages immédiatement avant emploi. Ne pas congeler. Ne pas utiliser 6 mois après la date de manufacture.

MATERIAUX POURVUS

- Cassettes, emballées individuellement et hermétiquement.
- Nanoparticules lyophilisées. Un flacon suffit pour 5 tests.
- HABA (heterophylic antibody blocking agent). Un tube suffit pour 10 tests.
- TEA Extraction Buffer (= tampon d'extraction à base de triethanolamine), bouteille de 250 mL.
- Eau désionisée, bouteille de 1 L.

- Chase buffer (= éluant), flacon de 4 mL.
- Tubes Axygen, 1.5 mL.
- Contrôle positif: mycolactone, solution dans de l'éthanol, à 7 ng/μL. Ampoule de 60 μL.
- Écouvillons de marque Puritan.
- Rack magnétique.

MATERIAUX NECESSAIRES MAIS NON POURVUS

- Pipettes et embouts de de pipettes (1–2 μL, 50–100 μL, and 500–1000 μL).
- Flacons ambrés de 1.5 ou 2 mL.
- Papier d'aluminium.
- Chronomètre.
- Gants.
- Stylo marqueur.
- Portoir non magnétique.

INSTRUCTIONS

Reconstituer le réactif HABA

1. Ajouter 500 μL de TEA extraction buffer au tube de HABA lyophilisé.
2. Agiter et laisser reposer 5–10 minutes jusqu'à ce que tout soit pleinement dissout.
3. Stocker au frigo (4 °C).

Reconstituer les nanoparticules magnétiques

4. Prendre un flacon de nanoparticules magnétiques lyophilisées
5. Enlever le sceau d'aluminium et le bouchon en caoutchouc.
6. Ajouter 300 μL d'eau désionisée. Replacer le bouchon.
7. Mélanger doucement 5–10 minutes jusqu'à ce que tout soit pleinement dissout, y compris ce qui se trouve sur les parois du flacon, et parfois près de l'ouverture du flacon.
8. Stocker jusqu'à 2 semaines au frigo (4 °C) mais pas au congélateur (éviter impérativement de congeler).

Préparation des contrôles négatifs et positifs

1. Prendre 4 tubes Axygen.
2. Marquer 2 tubes « positif» et les deux autres « négatif».
3. Placer 500 μL de TEA extraction buffer dans chaque tube.
4. Pour les contrôles négatifs, pas d'action supplémentaire.
5. Pour les contrôles positifs, ajouter 1 μL de la solution de mycolactone.
6. Fermer le capuchon et bien mélanger, en protégeant de la lumière.
7. Utiliser dans l'heure qui suit.

Préparation des spécimens cliniques : extraction des écouvillons

1. Prendre un tube Axygen de 1.5 mL et inscrire le nom de l'échantillon.
2. Ajouter 500 μL TEA Extraction Buffer
3. Collecter l'exsudat au moyen d'un écouvillon et placer l'écouvillon dans le tube Axygen. Laisser baigner quelques minutes et presser le tampon contre les parois du tube afin de récupérer autant de liquide que possible. Utiliser dans l'heure qui suit.

Exécuter le test

1. Placer le tube Axygen contenant le contrôle positif, le contrôle négatif, ou l'extrait du tampon sur un portoir non-magnétique.
2. Ajouter 50 μL du réactif HABA reconstitué et bien mélanger. Ce réactif est obligatoire avec les exsudats, mais facultatif avec les contrôles positifs et négatifs.
3. Ajouter les nanoparticules magnétiques reconstituées :
 - 40 μL avec les contrôles positifs et négatifs
 - 50 μL avec les exsudats
4. Incuber pendant 30 minutes en laissant sur le portoir non-magnétique, en protégeant de la lumière avec du papier d'aluminium ou une boîte en carton. La mycolactone est sensible à la lumière. Lors de cette étape, éviter la proximité d'aimants ou du rack magnétique.
5. Placer le tube sur le rack magnétique et laisser 30 minutes, à l'abri de la lumière. Les nanoparticules s'accumuleront contre les parois du tube, comme indiqué sur la Figure 3. Ceci sera net avec les contrôles positifs et négatifs réalisés sans HABA, et plus difficile ou peut-être même impossible à constater avec les exsudats réalisés avec HABA.

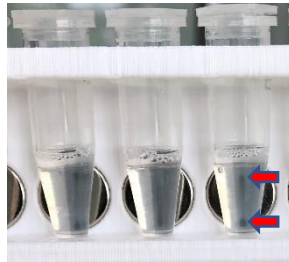



Figure 3. Accumulation des nanoparticules magnétiques après 30 minutes sur le rack magnétique. Les flèches indiquent les zones de concentration maximale.

11. À la fin des 30 minutes, enlever le surnageant très délicatement en faisant attention à ne pas déranger les nanoparticules. Pour ceci, utiliser une micropipette, typiquement de 200 μL , et placer l'embout contre la paroi la plus proche de l'opérateur et la plus distante de l'aimant.
12. Ajouter 2 gouttes (= 54 μL) de « Chase Buffer » et ôter le tube du rack magnétique. Récupérer toutes les nanoparticules magnétiques en pipettant plusieurs fois, mais délicatement afin d'éviter la formation excessive de mousse.
13. Transférer le contenu dans le port circulaire de la cassette, et noter l'heure sur la cassette.
14. Répéter les étapes 11–13 pour tous les tubes.
15. Lire la ligne de test et la ligne de contrôle après 10 et 30 minutes avec la fiche de lecture. Amener la fiche aussi près que possible de la ligne mesurée.
16. A 30 minutes, lire aussi avec le lecteur, en insérant la cassette avec le port circulaire vers le bas. Ne pas utiliser le lecteur à 10 minutes, car l'angle d'inclinaison n'est pas compatible avec le mouvement de l'éluant.

17. Prendre un photo.

Pour nous contacter:

Drugs & Diagnostics for Tropical Diseases
 9909 Huennekens St. Suite 100
 San Diego, CA 92121
quality@ddtd.org

Document Control			
Action	Date	Signature	Author/Reviewer/Approver
Approved/ Implemented	18 NOV 2019		Dr. Marco Biamonte, CEO
Amendment/ Change	04 JUL 2021		
<p>Revision B was written with the intention to validate the test in a laboratory setting (Prof. Stinear, U. Melbourne) using magnetic nanoparticles provided in solution, and serum in negative/positive controls.</p> <p>Revision C is written with the intention to validate the test in the field (Ivory Coast, Cameroon), using lyophilized magnetic nanoparticles, and no serum in negative or positive control.</p> <p>Revision D includes revisions to get more consistent results with clinical specimen. (a) Use of HABA is introduced, (b) incubation time on rack changed from 10 to 30 minutes (c) first incubation changed from 25 to 30 minutes – does not change outcome, but easier to memorize that there are two incubation steps, each of 30 minutes.</p> <p>Revision E is the French translation of revision D.</p>			