

UTILISATION PRÉVUE

Le système ZEUS ELISA de dépistage d'anticorps IgG/IgM/IgA du virus *Legionella pneumophila* est un test d'immunoenzymologie (ELISA) conçu pour la détection qualitative des anticorps totaux (IgG/IgM/IgA) dirigés contre les sérogroupes 1 à 6 de *Legionella pneumophila* dans le sérum humain. Ce test a été conçu pour des diagnostics *in vitro*.

SIGNIFICATION ET CONTEXTE

En 1977, *L. pneumophila* a été identifié comme l'agent causatif de la légionellose (*Legionella pneumonia* ou maladie du légionnaire) (1). Actuellement, on recense plus de 25 espèces et 33 sérogroupes dans la famille des *Legionellaceae*, avec au moins 18 espèces associées à la pneumonie, représentant environ 1 à 5 % de tous les cas de pneumonie (2). *L. pneumophila* se présente sous une multitude de morphologies, y compris bacille, coccobacille et fusiforme allongée. Même si elle est souvent difficile à réaliser, la coloration de Gram est Gram-négative.

La réponse des anticorps dirigés contre *L. pneumophila* peut être à la fois spécifique et non spécifique, dans la mesure où le patient peut avoir des anticorps dirigés contre des antigènes similaires d'autres bactéries Gram-négatives. Les périodes optimales de prélèvements d'échantillons semblent être au cours de la première semaine de la maladie ou le plus tôt possible après son apparition (échantillon aigu) et au moins 3 semaines après (échantillon convalescent) (3). Par la méthode d'immunofluorescence indirecte, un seul résultat supérieur ou égal à 1:256 est considéré comme une preuve par inférence d'une infection par *Legionella*. Des titres diagnostiques se sont avérés absents chez 25 % des patients (4), mais l'utilisation de plusieurs espèces de *Legionella* (5, 6) comme source d'antigène et d'un conjugué polyvalent dirigé contre IgG, IgM et IgA (7) maximise la précision des analyses sérologiques.

PRINCIPE DU TEST

Le système ZEUS ELISA de dépistage d'anticorps IgG/IgM/IgA à *L. pneumophila* est conçu pour la détection d'anticorps dirigés contre le virus *L. pneumophila* dans le sérum humain. Les puits des barrettes à micro-puits plastiques sont sensibilisés par une absorption passive d'antigène de *Legionella*. La procédure de test comprend trois étapes d'incubation :

1. Les échantillons de sérum sanguin du test (correctement dilués) sont incubés dans des micropuits enduits d'antigène. Tout anticorps spécifique de l'antigène se trouvant dans le sang s'accrochera à l'antigène immobilisé. La plaque est lavée de façon à enlever les anticorps non fixés et les autres composants sériques.
2. Le conjugué à la peroxydase (d'origine caprine) dirigé contre les IgG/IgA/IgM humaines est transféré dans le puits et la plaque est incubée. Le conjugué réagira avec les anticorps immobilisés sur la phase solide de l'étape 1. Les puits sont lavés pour enlever le conjugué n'ayant pas réagi.
3. Les micropuits contenant du conjugué de peroxydase immobilisé sont incubés avec une solution de substrat peroxydase. L'hydrolyse du substrat avec de la peroxydase produit un changement de couleur. Après un certain temps, la réaction est arrêtée et l'intensité de la couleur de la solution est mesurée par photométrie. L'intensité de la couleur de la solution dépend de la concentration d'anticorps dans l'échantillon d'origine.

COMPOSANTS DU SYSTÈME DE TEST

Matériel inclus :

Chaque système de test contient les composants suivants en quantité suffisante pour réaliser le nombre de tests indiqué sur l'étiquette du conditionnement.
REMARQUE : Les composants suivants contiennent de l'azote de sodium comme agent de conservation sous une concentration inférieure à 0,1 % (volume d'eau) : contrôles, étalon et SAVE Diluent®.

PLATE	1. Plaque : 96 puits configurés en douze bandes de 8 puits ; les bandes sont enduites d'une préparation ultrasoniquée d'antigènes <i>L. pneumophila</i> des groupes 1-6, inactivé par la chaleur. Les bandes sont emballées dans un porte-bandes et placées avec du desséchant dans une enveloppe hermétiquement fermée.
CONJ	2. Conjugué : Solution d'IgG/IgM/IgA anti-humaine d'origine caprine conjuguée à de la peroxydase du raifort. Un flacon de 15 ml avec bouchon blanc. Prêt à l'emploi.
CONTROL +	3. Contrôle positif (sérum humain) : Une ampoule de 0,35 ml avec bouchon rouge.
CAL	4. Étalon (sérum humain) : Une ampoule de 0,5 ml avec bouchon bleu.
CONTROL -	5. Contrôle négatif (sérum humain) : Une ampoule de 0,35 ml avec bouchon vert.
DIL SPE	6. SAVE Diluent® : Un flacon de 30 ml à bouchon vert contenant du Tween-20, de l'albumine de sérum bovin et tampon phosphate salin. Prêt à l'emploi. REMARQUE : La solution SAVE Diluent® change de couleur lorsqu'elle est combinée à du sérum.
SOLN TMB	7. TMB : Un flacon de 15 ml à bouchon ambre contenant du tétraméthyl-3, 3', 5, 5'-benzidine (TMB). Prêt à l'emploi.
SOLN STOP	8. Solution d'arrêt : Un flacon de 15 ml à bouchon rouge contenant du 1M H ₂ SO ₄ , 0.7M HCl. Prêt à l'emploi.
WASHBUF 10X	9. Tampon de lavage concentré (10 x) : Dilution d'un volume de concentré dans neuf volumes d'eau distillée ou déionisée. Un flacon de 100 ml à bouchon transparent contenant une solution de Tween 20 et un tampon phosphate salin concentré 10 x (solution bleue). REMARQUE : La solution 1 x présente un pH de 7,2 ± 0,2.

REMARQUES :

1. Les composants suivants ne doivent pas nécessairement être utilisés avec des systèmes de test ayant un numéro de lot correspondant et peuvent donc être librement utilisés avec des systèmes de test ZEUS ELISA : TMB, solution d'arrêt et tampon de lavage. La solution SAVE Diluent® peut être interchangeée dans n'importe quel système de test ZEUS ELISA avec le produit n° 005CC.
2. Le système de test contient également une étiquette de composant contenant des informations spécifiques de lot à l'intérieur de la boîte du système de test.

PRÉCAUTIONS

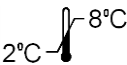
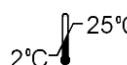
1. Pour utilisation diagnostique *in vitro* uniquement.
2. Observer les précautions normalement applicables lors de toute manipulation de réactif de laboratoire. En cas de contact oculaire, rincer immédiatement les yeux avec beaucoup d'eau et consulter un médecin. Porter des vêtements protecteurs appropriés, ainsi que des gants et une protection des yeux/du visage. Ne pas respirer les vapeurs de ce produit. Jeter conformément à toutes les lois applicables.
3. Les puits de la plaque ELISA ne contiennent pas d'organismes viables. Cependant, les bandes doivent être considérées comme des **matériaux biologiques dangereux** et être manipulées en conséquence.

- Les solutions de contrôle sont des **matériaux biologiques dangereux**. Les matériaux d'origine de ces produits ont fait l'objet de tests approuvés n'ayant révélé aucune présence d'antigène du VIH-1, de HBsAg et d'anticorps contre le VHC et le VIH. Cependant, puisqu'aucune méthode de test n'offre une garantie absolue d'absence de tout agent infectieux, ces produits doivent être manipulés selon les consignes du niveau 2 de biosécurité, conformément aux recommandations applicables aux échantillons de sang et aux sérums humains potentiellement infectieux dans le manuel des centres américains de contrôle des maladies intitulé « Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories » (dernière édition) et conformément aux normes de l'OSHA concernant les agents pathogènes sanguins (13).
- Pour obtenir des résultats exacts, il est essentiel de respecter les délais et les températures d'incubation. Vérifier que tous les réactifs sont équilibrés à température ambiante (20–25 °C) avant de commencer le test. Les réactifs non utilisés doivent être retournés à une température de réfrigération immédiatement après utilisation.
- Un mauvais lavage peut causer de faux résultats positifs ou négatifs. S'assurer de minimiser la quantité de solution de lavage résiduelle (p. ex. par absorption ou aspiration) avant d'ajouter le conjugué ou le substrat. Ne pas laisser les puits sécher entre les incubations.
- La solution SAve Diluent®, les solutions de contrôle et la solution étalon contiennent de l'azote de sodium sous une concentration inférieure à 0,1 % (volume d'eau). Il a été signalé que l'azote de sodium pouvait former des accumulations de plomb ou d'azote de cuivre dans la tuyauterie de laboratoire, lesquelles peuvent causer des explosions ou des détonations. Pour éviter ce risque, rincer abondamment les éviers avec beaucoup d'eau après y avoir jeté une solution contenant de l'azote de sodium.
- L'inhalation, l'ingestion et le simple contact cutané de la solution d'arrêt peuvent avoir des effets TOXIQUES, notamment des brûlures. En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin.
- La solution TMB est nocive. Ce produit peut irriter les yeux, le système respiratoire et la peau.
- Le tampon de lavage concentré est IRRITANT. Ce produit peut irriter les yeux, le système respiratoire et la peau.
- Essuyer le fond de la plaque de façon à enlever les empreintes digitales et les résidus de liquide pouvant fausser les mesures de densité optique.
- La dilution et l'adultération de ces réactifs peuvent produire des résultats erronés.
- Ne pas utiliser les réactifs d'autres vendeurs ou fabricants.
- La solution TMB doit être incolore, jaune très pâle, vert très pâle ou bleu très pâle lors de son utilisation. Une contamination de la solution TMB avec du conjugué ou d'autres oxydants peut causer un changement de couleur prématuré. Ne pas utiliser la solution TMB si elle est nettement bleue.
- Ne jamais pipeter à la bouche. Éviter tout contact de la peau ou des muqueuses avec des réactifs ou des échantillons humains.
- Éviter toute contamination microbienne des réactifs. Des résultats incorrects pourraient survenir.
- Toute contamination des réactifs ou des échantillons pourrait fausser les résultats.
- Les récipients en verre réutilisables doivent être lavés et abondamment rincés de façon à enlever tout résidu de détergent.
- Éviter les éclaboussures et la génération d'aérosols.
- Ne pas exposer les réactifs à une lumière puissante durant leur stockage ou durant une incubation.
- Laisser les bandes de micropuits et le support arriver à température ambiante avant d'ouvrir l'enveloppe protectrice, afin de protéger les puits de toute condensation.
- Récupérer la solution de lavage dans un bassin à résidus. Traiter la solution résiduelle avec un désinfectant (p. ex. 10 % de javel domestique à 0,5 % d'hypochlorite de sodium). Éviter d'exposer les réactifs aux vapeurs de javel.
- Mise en garde : Avant d'ajouter une solution de javel, neutraliser les résidus liquides jusqu'à l'obtention d'un pH acide.
- Ne jamais utiliser une plaque ELISA dont la bande indicatrice du sachet de déshydratant est passée du bleu au rose.
- Ne pas laisser le conjugué entrer en contact avec des récipients ou des instruments pouvant avoir précédemment contenu une solution utilisant de l'azote de sodium comme agent de conservation. Des quantités résiduelles d'azote de sodium peuvent détruire l'activité enzymatique du conjugué.
- Ne pas exposer les réactifs à des solutions contenant de la javel ni même aux odeurs fortes s'échappant d'une solution contenant de la javel. De très petites quantités de javel (hypochlorite de sodium) peuvent détruire l'activité biologique de plusieurs réactifs de ce système de test.

MATÉRIAUX NÉCESSAIRES MAIS NON FOURNIS

- Lecteur de micropuits ELISA pouvant lire des mesures avec des longueurs d'ondes de 450 nm. **REMARQUE: il est possible d'utiliser un lecteur à longueur d'onde unique (450 nm) ou à longueur d'onde double (450/620 - 650 nm). L'utilisation d'un lecteur à longueur d'onde double est préférable, puisqu'il a été établi que le filtre de référence supplémentaire réduisait l'interférence potentielle provenant d'anomalies susceptibles d'absorber la lumière.**
- Pipettes pouvant mesurer avec précision des quantités de 10 – 200 µl.
- Pipette à canaux multiples pouvant mesurer avec précision des quantités de 50 – 200 µl.
- Réservoirs de réactif pour pipettes à canaux multiples.
- Flacon de lavage ou système de lavage de micropuits.
- Eau distillée ou déionisée.
- Cylindre gradué d'un litre.
- Pipettes sérologiques.
- Embouts de pipettes jetables.
- Serviettes en papier.
- Minuterie de laboratoire pour mesurer les étapes d'incubation.
- Bassin de résidus et de désinfectant (p. ex. 10 % de javel domestique à 0,5 % d'hypochlorite de sodium).

CONDITIONS DE STOCKAGE

	Bandes de micropuits avec revêtement : Refermer immédiatement de façon hermétique le sachet de bandes non utilisées en y laissant le déshydratant et replacer le sachet dans un environnement de stockage approprié. Après l'ouverture du sachet, les bandes demeurent stables pendant 60 jours, tant que les bandes indicatrices du sachet de déshydratant demeurent bleues.
	Conjugué – NE PAS CONGELER. Système de test non ouvert, calibre, contrôle positif, contrôle négatif, solution TMB, solution SAve Dilent®
	Solution d'arrêt : 2 - 25°C Tampon de lavage (1 x) : 20 - 25°C pendant un maximum de 7 jours; 2 – 8 °C pendant un maximum de 30 jours. Tampon de lavage (10 x) : 2 - 25°C

PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

- ZEUS Scientific recommande que l'utilisateur prélève les échantillons conformément au document M29 du CLI intitulé « *Protection of Laboratory Workers from Infectious Disease* » (dernière édition).
- Aucune méthode de test connue ne peut offrir une garantie totale qu'un échantillon de sang humain ne causera aucune transmission d'infection. Par conséquent, tous les dérivés d'échantillons sanguins doivent être considérés comme possiblement infectieux.
- Utiliser uniquement du sérum sanguin fraîchement prélevé et correctement réfrigéré, obtenu selon la procédure de ponction veineuse aseptique de cette analyse (8, 9). Ne pas utiliser si un anticoagulant ou un agent de conservation a été ajouté. Éviter d'utiliser du sérum sanguin hémolysé, lipémique ou exposé à des bactéries.

4. Les échantillons peuvent être conservés à température ambiante pendant un maximum de 8 heures. Si aucun test n'est effectué dans un délai de 8 heures, le sérum sanguin peut être stocké à 2 – 8 °C pendant un maximum de 48 heures. Si l'exécution du test est retardée, le sérum sanguin peut être stocké à -20 °C ou moins. Éviter les cycles multiples de gel/dégel pouvant causer une perte d'activité anticorps et produire des résultats erronés. Les laboratoires utilisateurs ont la responsabilité de consulter tous les documents de référence disponibles et/ou leurs propres études afin de déterminer les critères de stabilité appropriés pour leur laboratoire. Les laboratoires utilisateurs ont la responsabilité de consulter tous les documents de référence disponibles et/ou leurs propres études afin de déterminer les critères de stabilité appropriés pour leur laboratoire (14).

PROCÉDURE D'ESSAI

- Sortir les composants de leur lieu de stockage et laisser les composants se réchauffer à température ambiante (20 – 25 °C).
- Déterminer le nombre de micropuits nécessaires. Prévoir six déterminations de contrôle/étalon (un blanc réactif, un contrôle négatif, trois étalons et un contrôle positif) par série. Exécuter un blanc réactif pour chaque analyse. Vérifier les exigences de logiciel et de lecteur pour connaître les configurations appropriées contrôles/étalon. Replacer les bandes inutilisées dans le sachet en y laissant le déshydratant, puis fermer hermétiquement le sachet et conserver à 2 – 8 °C.

EXEMPLE DE CONFIGURATION DE PLAQUE		
	1	2
A	Blanc	Patient 3
B	Contrôle négatif	Patient 4
C	Étalon	etc.
D	Étalon	
E	Étalon	
F	Contrôle positif	
G	Patient 1	
H	Patient 2	

- Préparer une dilution 1:21 (p. ex. 10 µl de sérum + 200 µl de SAVE Diluent®) de contrôle négatif, d'étalon, de contrôle positif et de sérum de chaque patient. **REMARQUE : La solution SAVE Diluent® changera de couleur pour confirmer que l'échantillon a été combiné avec le diluant.**
- Dans les puits individuels, ajouter 100 µl de contrôle, d'étalon et d'échantillon de patient (solutions diluées). S'assurer que les échantillons sont correctement mélangés. Utiliser un embout de pipette différent pour chaque échantillon.
- Ajouter 100 µl de solution SAVE Diluent® dans le puits A1 comme blanc réactif. Vérifier les exigences de logiciel et de lecteur pour connaître les configurations appropriées de puits de blanc réactif.
- Incuber la plaque à température ambiante (20 – 25 °C) pendant 25 ± 5 minutes.
- Laver les bandes de micropuits 5 fois.
 - Procédure de lavage manuel :**
 - Secouer vigoureusement pour faire sortir le liquide des puits.
 - Remplir chaque micropuits de tampon de lavage. S'assurer qu'aucune bulle d'air n'est emprisonnée dans les puits.
 - Répéter les étapes 1 et 2 jusqu'à un total de 5 lavages.
 - Secouer vigoureusement pour faire sortir la solution de lavage de tous les puits. Inverser la plaque sur une serviette en papier et donner des coups fermes pour faire sortir les résidus de solution de lavage dans les puits. Inspecter visuellement la plaque pour s'assurer qu'il ne reste aucun résidu de solution de lavage. Récupérer la solution de lavage dans un bassin jetable et traiter avec un désinfectant à la fin des procédures de la journée.
 - Procédure de lavage automatisé :**
Si un système automatisé de lavage de micropuits est utilisé, régler le volume distribué à 300 – 350 µl par puits. Programmer un cycle de 5 lavages sans délai entre les lavages. Si nécessaire, la plaque de micropuits peut être retirée de l'appareil de lavage, puis inversée sur une serviette en papier et recevoir des coups fermes pour faire sortir les résidus de solution de lavage dans les puits.
- Ajouter 100 µl de conjugué dans chaque puits, y compris dans le puits de blanc réactif, à la même vitesse et dans le même ordre que les échantillons.
- Incuber la plaque à température ambiante (20 – 25 °C) pendant 25 ± 5 minutes.
- Laver les micropuits conformément à la procédure décrite dans l'étape 7.
- Ajouter 100 µl de TMB dans chaque puits, y compris dans le puits de blanc réactif, à la même vitesse et dans le même ordre que les échantillons.
- Incuber la plaque à température ambiante (20 – 25 °C) pendant 10 ± 15 minutes.
- Arrêter la réaction en ajoutant 50 µl de solution d'arrêt dans chaque puits, y compris dans le puits de blanc réactif, à la même vitesse et dans le même ordre que les échantillons. Les échantillons positifs passeront du bleu au jaune. Après avoir ajouté la solution d'arrêt, taper plusieurs fois sur la plaque pour que les échantillons soient bien mélangés.
- Programmer le lecteur de micropuits pour lire avec une longueur d'onde de 450 nm et mesurer la densité optique de chaque puits par rapport au blanc réactif. Lire les résultats de la plaque moins de 30 minutes après avoir ajouté la solution d'arrêt.

RÉSUMÉ DE LA PROCÉDURE D'ANALYSE

- Diluer le sérum 1:21.
- Ajouter l'échantillon dilué dans les micropuits à raison de 100 µl/puits.
- Incuber 25 ± 5 minutes.
- Laver.
- Ajouter le conjugué – 100 µl/puits.
- Incuber 25 ± 5 minutes.
- Laver.
- Ajouter le TMB – 100 µl/puits.
- Incuber 10 - 15 minutes.
- Ajouter la solution d'arrêt, 50 µl/puits – Mélanger.
- LIRE les résultats dans les 30 minutes.

CONTRÔLE DE QUALITÉ

- Chaque fois qu'une analyse est exécutée, l'étalon doit être exécuté en trois exemplaires. Un blanc réactif, un contrôle négatif et un contrôle positif doivent également être inclus.
- Calculer la moyenne des trois puits d'étalon. Si une des trois valeurs est à plus de 15 % de la moyenne, éliminer cette valeur et recalculer la moyenne avec les deux puits restants.
- Les valeurs de densité optique (DO) moyenne de l'étalon, du contrôle positif et du contrôle négatif devraient se situer dans les plages suivantes :

	Plage DO
Contrôle négatif	≤0,250
Étalon	≥0,300
Contrôle positif	≥0,500

- La DO du contrôle négatif divisée par la DO moyenne de l'étalon devrait être ≤0,9.

- b. La DO du contrôle positif divisée par la DO moyenne de l'étalon devrait être $\geq 1,25$.
 - c. Si les conditions ci-dessus ne sont pas satisfaites, le test est invalide et doit être répété.
4. Le contrôle positif et le contrôle négatif servent à détecter une anomalie de réactif substantielle, mais ne garantissent pas la précision à la fin de l'analyse.
 5. Des contrôles supplémentaires peuvent être testés conformément aux réglementations gouvernementales en vigueur et aux normes des organisations d'accréditation compétentes.
 6. Le document C24 du CLSI intitulé « *Statistical Quality Control for Quantitative Measurement Procedures* » contient des informations supplémentaires sur les procédures appropriées de contrôle de qualité.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

1. Calculs :

- a. **Facteur de correction** : Le fabricant a déterminé une valeur seuil de densité optique pour les échantillons positifs et l'a corrélée à l'étalon. Le facteur de correction (FC) permet de déterminer la valeur seuil des échantillons positifs. Il permet également de compenser les légères variations de résultats d'un jour à l'autre. Le facteur de correction est déterminé pour chaque lot de composants et est imprimé sur l'étiquette de composants située sur la boîte du système de test.
- b. **Valeur seuil de densité optique** : Pour obtenir la valeur seuil de densité optique, multiplier le FC par la DO moyenne de l'étalon, déterminée ci-dessus.
($FC \times DO \text{ moyenne de l'étalon} = \text{Valeur seuil de DO}$)
- c. **Rapports valeur d'indice/DO** : Calculer le rapport valeur d'indice/DO de chaque échantillon en divisant sa valeur de DO par la valeur seuil de DO de l'étape b.

Exemple :	DO moyenne de l'étalon	= 0,793
	Facteur de correction (FC)	= 0,25
	Valeur seuil de DO	= $0,793 \times 0,25 = 0,198$
	DO inconnue de l'échantillon	= 0,432
	Rapports valeur d'indice/DO de l'échantillon	= $0,432/0,198 = 2,18$

2. Interprétations : Les rapports valeur d'indice/DO sont interprétés de la manière suivante.

	Rapport valeur d'indice/DO
Échantillons négatifs	$\leq 0,90$
Échantillons ambivalents	0,91 à 1,09
Échantillons positifs	$\geq 1,10$

- a. Un rapport de DO égal ou inférieur à 0,90 signifie qu'il n'a pas été possible de détecter une quantité significative d'anticorps IgG/IgM/IgA dirigés contre *L. pneumophila*. Un résultat non réactif peut équivaloir à un titre par immunofluorescence indirecte inférieur à 1:256. Un résultat négatif n'exclut pas une infection par *Legionella*.
- b. Un rapport de DO $\geq 1,1$ indique la détection d'anticorps dirigés contre la *Legionella* et suggère une infection par *Legionella* par le passé. Il peut équivaloir à un titre par immunofluorescence indirecte $\geq 1:256$. D'autres procédures d'analyse ou d'autres informations cliniques peuvent être nécessaires pour établir un diagnostic.
- c. Refaire deux fois le test sur les échantillons lorsque les rapports de DO sont dans la zone d'ambivalence (0,91 – 1,09). Le résultat final sera obtenu dès que deux mesures concordantes seront observées. Évaluer répétitivement les échantillons ambivalents avec une autre méthode sérologique et/ou reprendre l'évaluation en prélevant d'autres échantillons une à trois semaines plus tard.

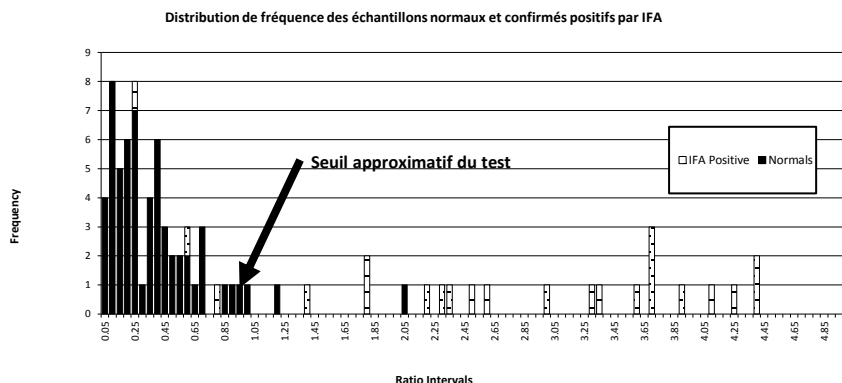
REMARQUE : L'amplitude des mesures au-dessus de la valeur de seuil n'est pas indicative de la quantité totale d'anticorps présents et ne peut pas être liée aux titres par immunofluorescence indirecte.

LIMITES DE L'ESSAI

1. Aucun diagnostic ne doit être rendu sur la base des seuls résultats anti-*Legionella*. Les résultats de ces analyses doivent être interprétés en conjonction avec une évaluation clinique et les résultats d'autres procédures diagnostiques.
2. Un résultat positif suggère une infection par un ou plusieurs des espèces du groupe 1 à 6 ; toutefois, il est impossible de différencier les espèces grâce aux seuls résultats de ce test ELISA.
3. Ne pas utiliser d'échantillons hémolysés, lipémiques, thermo-désactivés ou contenant des bactéries afin de ne pas risquer de fausser les résultats. Des résultats erronés pourraient survenir.
4. Une réactivité croisée peut se produire dans les échantillons de sérum infectés par d'autres espèces de *Legionella*.
5. Un résultat négatif n'exclut pas la possibilité d'une infection par *Legionella*. Les échantillons de sérum prélevés à un stade trop précoce de l'infection risquent de ne pas contenir de dosages suffisants d'anticorps. Certains cas de *Legionella* positifs par culture ne développent pas d'anticorps dirigés contre *Legionella* (12).
6. Des résultats positifs peuvent être causés par une réactivité croisée avec des anticorps produits en conséquence d'une infection autre que par *Legionella*. Des réactions croisées sérologiques ont été signalées avec *P. aeruginosa*, plusieurs espèces de rickettsie, *Coxiella burnetii*, bâtonnets entériques Gram-négatifs, des espèces de bactéroïdes, des espèces de *Haemophilus*, *Citrobacter freundii* et *Campylobacter jejuni* (10). Par conséquent, un résultat positif n'indique pas à lui seul une infection par *Legionella*. En outre, certains rapports (11) indiquent qu'un certain nombre d'individus apparemment en bonne santé peuvent être porteurs d'anticorps dirigés contre les *Legionellae* ; toutefois, un résultat positif accompagné de signes cliniques et de symptômes peut indiquer une éventuelle infection par *Legionella*. D'autres dosages sérologiques, comme l'analyse de paires de sérums par immunofluorescence indirecte, ou d'autres tests cliniques tels que l'immunofluorescence directe et la mise en culture, peuvent être nécessaires pour établir un diagnostic.
7. Les caractéristiques de performance du test n'ont pas été définies pour d'autres matrices que du sérum.
8. L'affinité et l'avidité du conjugué anti-IgG/IgM/IgA n'ont pas été définies.
9. Même si le conjugué a été conçu pour détecter les IgG, IgM et/ou IgA humaines, il est impossible d'identifier l'anticorps détecté avec ce test.
10. Un traitement précoce à base d'antibiotiques peut compromettre la réponse des anticorps et il se peut que certaines personnes ne développent pas d'anticorps à des niveaux supérieurs aux seuils de dépistage.
11. Un résultat positif unique indique seulement une exposition immunologique passée. Le niveau de réponse des anticorps ne peut pas être utilisé pour déterminer une infection active.
12. L'utilisation des sérogroupes 1 à 6 pour évaluer la réponse des anticorps à différents sérogroupes et à différentes espèces de *Legionella* et n'a pas été établie. Il se peut que certains patients infectés ne présentent pas de niveaux d'anticorps dépistables avec ce test. Il faut parfois compter un délai de 4 à 8 semaines avant de pouvoir déceler une réponse des anticorps et les anticorps chutent parfois à des niveaux non dépistables au bout d'un mois d'infection.

RÉSULTATS ESPÉRÉS

Certains chercheurs ont signalé des fréquences de contrôle de niveaux élevés d'anticorps comprises entre 1 et 3 % pour les préparations d'antigènes inactivés au formol dans une population normale (11). Lors d'une évaluation du sérum de 60 donneurs normaux réalisée en interne, on a découvert un échantillon ambivalent (1,7 %), deux échantillons positifs (3,3 %) et 57 échantillons négatifs (95 %). Le tableau ci-dessous présente la distribution de fréquence des résultats pour les échantillons de 60 donneurs normaux, avec 24 échantillons confirmés positifs selon une analyse IFA.



CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

1. Études comparatives

Une étude comparative a été réalisée pour démontrer l'équivalence entre le système ZEUS ELISA de dépistage d'anticorps IgG/IgM/IgA du virus *Legionella pneumophila* et un autre système de test ELISA vendu dans le commerce, ainsi qu'entre ce même système ZEUS et un système de dépistage de *Legionella* par immunofluorescence indirecte (IFA). Les performances du système ZEUS ELISA de dépistage d'anticorps IgG/IgM/IgA du virus *Legionella pneumophila* ont été évaluées dans le cadre d'une étude réalisée dans trois centres. Un site a comparé les performances du système ZEUS ELISA de dépistage d'anticorps IgG/IgM/IgA du virus *Legionella pneumophila* avec celles d'un autre système de test ELISA vendu dans le commerce. Le deuxième site a comparé les performances du système ZEUS ELISA de dépistage d'anticorps IgG/IgM/IgA du virus *Legionella pneumophila* avec celles d'un système ZEUS de dépistage de *Legionella* par immunofluorescence indirecte (IFA). Le troisième site a comparé les performances du système ZEUS ELISA de dépistage d'anticorps IgG/IgM/IgA du virus *Legionella pneumophila* avec celles d'un autre système de dépistage de *Legionella* par immunofluorescence indirecte (IFA) vendu dans le commerce. Au total, 240 échantillons ont été analysés. Les échantillons cliniques analysés dans les deux premiers centres comprenaient essentiellement des échantillons standard qui ont été envoyés à un laboratoire de référence du nord-est des États-Unis pour analyse sérologique de *Legionella* normale. Certains échantillons en dépôt déjà testés ont été inclus et se sont révélés positifs pour les anticorps dirigés contre *Legionella*. Les échantillons analysés dans le troisième centre clinique comprenaient 22 paires d'échantillons (aigus et convalescents) provenant de cas confirmés d'infections par *Legionella*. Les tableaux 1, 2 et 3 récapitulent ces études comparatives. Les échantillons ambivalents de ces analyses.

Tableau 1 : Calculs de sensibilité relative, de spécificité et de pourcentage de concordance, site 1

		Système ZEUS ELISA de dépistage d'IgG/IgM/IgA à <i>Legionella</i>			
		Positif	Négatif	Ambivalent	Total
Test ELISA disponible dans le commerce	Positif	12	1	2	15
	Négatif	5	67	10	82
	Ambivalent	11	0	1	12
	Total	28	68	13	109

Sensibilité relative = $12/13 = 92,3\%$ (intervalle de confiance à 95 %* = 77,8 % à 100 %)

Spécificité relative = $67/72 = 93,1\%$ (intervalle de confiance à 95 %* = 87,2 % à 98,9 %)

Concordance relative = $79/85 = 92,9\%$ (intervalle de confiance à 95 %* = 85,7 % à 98,4 %)

* Les intervalles de confiance à 95 % ont été calculés par la méthode exacte.

Tableau 2 : Calculs de sensibilité relative, de spécificité et de pourcentage de concordance, site 2

		Système ZEUS ELISA de dépistage d'IgG/IgM/IgA à <i>Legionella</i>			
		Négatif	Ambivalent	Positif	Total
Système de test ZEUS IFA de <i>Legionella</i>	< 1:128	56	2	7	65
	1:128	0	1	4	5
	≥ 1:256	1	0	16	17
	Total	57	3	27	87

Sensitivité relative = $16/17 = 94,1\%$ (intervalle de confiance à 95 %* = 82,9 % à 100 %)

Spécificité relative = $56/63 = 88,9\%$ (intervalle de confiance à 95 %* = 81,1 % à 96,6 %)

Concordance relative = $72/80 = 90,0\%$ (intervalle de confiance à 95 %* = 83,4 % à 96,6 %)

* Les intervalles de confiance à 95 % ont été calculés par la méthode exacte.

Tableau 3 : Calculs de sensibilité relative, de spécificité et de pourcentage de concordance, site 3 (résultats individuels d'analyse des échantillons aigus et convalescents)

		Système ZEUS ELISA de dépistage d'IgG/IgM/IgA à <i>Legionella</i>			
		Négatif	Ambivalent	Positif	Total
Test IFA de <i>Legionella</i> vendu dans le commerce	< 1:128	16	0	1	17
	1:128	3	1	1	5
	≥ 1:256	3	0	19	22
	Total	22	1	21	44

Sensitivité relative = $19/22 = 86,4\%$ (intervalle de confiance à 95 %* = 72 % à 100 %)

Spécificité relative = $16/17 = 94,1\%$ (intervalle de confiance à 95 %* = 89,2 % à 100 %)

Concordance relative = $35/39 = 89,7\%$ (intervalle de confiance à 95 %* = 80,2 % à 99,2 %)

* Les intervalles de confiance à 95 % ont été calculés par la méthode exacte.

Concernant le tableau 3 ci-dessus, sur les 22 paires d'échantillons aigus et convalescents, 17/22 étaient ELISA-négatifs pour les échantillons aigus et positifs pour les convalescents. Sur les cinq paires restantes, 3/22 étaient négatives et 2/22 positives, à la fois pour les échantillons aigus et convalescents. **REMARQUE :** Le terme « relatif » désigne la comparaison des résultats de ce test à ceux d'un test similaire. Aucune tentative de corrélation des résultats du test à la présence ou l'absence de la maladie n'a eu lieu.

2. Précision et reproductibilité :

Pour démontrer la reproductibilité inter-laboratoires des résultats du dosage, six échantillons ont été évalués ; deux présentant un titre par immunofluorescence indirecte < 1:128, deux présentant un titre par immunofluorescence indirecte de 1:512, et deux présentant un titre par immunofluorescence $\geq 1:1024$. Cinq tubes ont été préparés par échantillon, soit un total de 30. Ces 30 tubes ont été randomisés et simplement numérotés de 1 à 30. Le panel a été dosé à l'interne

et aux deux centres cliniques. L'étude a démontré une excellente reproductibilité inter-laboratoires, avec une concordance de 100 % entre les trois centres. La précision a été mesurée suivant le protocole CLSI/NCCLS, document EP5-T2 : [Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices - Second Edition](#). Des études de reproductibilité ont été menées dans les deux centres cliniques à partir des huit mêmes échantillons : deux relativement fortement positifs, deux près de la valeur seuil et deux nettement négatifs. En outre, le contrôle négatif et le contrôle positif haut du système ont été inclus. Chaque jour de test, chacun des huit échantillons a été analysé en double. Et chaque jour, l'analyse a été effectuée deux fois, une fois le matin et une fois dans l'après-midi pour un total quotidien de quatre répliqués par échantillon. Les centres cliniques ont réalisé cette étude de reproductibilité pendant vingt jours, pour un total de 80 observations pour chacun des huit membres du panel. Un résumé de cette étude apparaît dans le tableau 4 ci-dessous.

Tableau 4 : Résumé des analyses de précision sur les sites cliniques 1 et 2

Échantillon	Site	Rapport moyen	Résultat	SWR*	ET**	Jours	Observations totales	% CV global
L-1	1	2,264	Positif	0,204	0,249	19	76	10,99
	2	2,517		0,138	0,438	19	76	17,42
L-2	1	2,277	Positif	0,101	0,209	18	72	9,20
	2	2,435		0,123	0,357	20	80	14,67
L-3	1	0,479	Négatif	0,024	0,040	18	72	8,45
	2	0,245		0,023	0,049	20	80	19,91
L-4	1	0,281	Négatif	0,013	0,032	19	76	11,24
	2	0,077		0,020	0,027	20	80	35,33
L-5	1	1,055	Près de limite	0,081	0,199	19	76	11,32
	2	0,757		0,049	0,091	20	80	12,07
L-6	1	0,845	Près de limite	0,033	0,079	19	76	9,36
	2	0,606		0,060	0,095	20	80	15,72
Contrôle positif	1	6,414	Positif	0,114	0,297	20	80	4,64
Contrôle négatif	1	0,270	Négatif	0,019	0,033	20	80	12,14

*Estimation ponctuelle de l'écart-type de précision intra-essai.

**Estimation ponctuelle de l'écart-type de précision totale.

REMARQUE : Les résultats de reproductibilité décrits au tableau 4 représentent seulement un exemple des résultats obtenus lors de l'étude clinique, dans des conditions ambiantes, techniques et matérielles idéales. La reproductibilité doit être évaluée pour chaque laboratoire et peut varier en fonction des conditions présentes.

RÉFÉRENCES

- McDade JE, Shepard CC, Fraser DW, Tsai TR, Redus MA, Dowdle WR, and the Laboratory Investigation Team: Legionnaires' disease. Isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. N. Engl. J. Med. 297:1197-1203, 1977.
- Tilton RC, Balows A, Hohnadel DC, and Reiss RF, Editors: Lower respiratory tract specimens. IN: Clinical Laboratory Medicine, Mosby Year Book, Inc., St. Louis, MO. pp 591-603, 1992.
- Wilkinson HW: Manual of Clinical Immunology - Second Edition: Immune Response to *Legionella pneumophila*. Rose NR, Friedman H, editors. pp 500-503 (1980). Published by Am. Society for Microbiology, Washington, DC.
- Harrison TG, Taylor AG: Timing of seroconversion in legionnaires' Disease. Lancet (2):795, 1988.
- Wilkinson HW, Reingold AL, Brake BJ, McGiboney DL, Gorman GW, Broome CV: Reactivity of serum from patients with suspected Legionellosis against 29 antigens of legionellaceae and Legionella-like organisms by indirect immunofluorescent assay. J. Infect. Dis. 147:23-31, 1983.
- McIntyre M, Kurtz JB, Selkon JB: Prevalence of antibodies to 15 antigens of legionellaceae in patients with community-acquired pneumonia. Epidemiol. Infect. 104:39-45, 1990.
- Wilkinson HW, Farshy CE, Fikes BJ, Cruce DD, Yealy LP: Measure of immunoglobulin G-, M-, and A-specific titers against *L. pneumophila* and inhibition of titers against non-specific, gram negative bacterial antigens in the indirect immunofluorescent test for legionellosis. J. Clin. Microbiol. 10: 685-689, 1979.
- Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture - Second Edition: Approved Standard (1984). Published by National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens. NCCLS Document H18-A, Vol. 10, No. 12, Approved Guideline, 1990.
- Edelstein P: Laboratory Diagnosis of Legionnaires Disease; an Update from 1984, pp 7-11. In: Legionella, Current Status and Emerging Perspectives. Barbaree J, et al, editors. Published by American Society for Microbiology, 1993.
- Paszko-Kolva C, Shahamat M, Keiser J, and Colwell R: Prevalence of Antibodies Against Legionella Species in Healthy and Patient Populations, pp 24-26. In: Legionella, Current Status and Emerging Perspectives. Barbaree J, et al, editors. Published by American Society for Microbiology, 1993.
- Bangsborg J, et al: The *E. coli* Immunosorbent as used in serodiagnosis of legionella infections studied by crossed immunoelectrophoresis. A PMIL 96:177-184, 1988.
- U.S. Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration: Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens, Final Rule. Fed. Register 56:64175-64182, 1991.
- Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Tests; Approved Guidelines - 4th Edition (2010). CLSI Document GP44-A4 (ISBN 1-56238-724-3). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, PA 19087.



ZEUS Scientific, Inc.
 200 Evans Way, Branchburg, New Jersey, 08876, USA
 Toll Free (U.S.): 1-800-286-2111, Option 2
 International: +1 908-526-3744
 Fax: +1 908-526-2058
 Website: www.zeusscientific.com
 ZEUS ELISA et SAve Diluent® sont des marques de commerce de ZEUS Scientific, Inc.

Si vous désirez une assistance clientèle aux États-Unis, veuillez contacter votre distributeur local.
 Si vous avez besoin d'assistance technique aux États-Unis, veuillez contacter ZEUS Scientific au numéro de téléphone gratuit indiqué ou par courriel à support@zeusscientific.com.
 Les clients ayant besoin d'assistance commerciale ou technique hors des États-Unis doivent contacter leur distributeur régional.
 © 2017 ZEUS Scientific, Inc. Tous droits réservés.

