

UTILISATION PRÉVUE

Le système de test ZEUS ELISA IgG du virus Epstein-Barr (EBV-VCA) est un test d'immunoenzymologie (ELISA) conçu pour la détection qualitative d'anticorps de classe IgG dirigés contre l'antigène de la capsid du virus Epstein-Barr (EBV-VCA) dans le sérum humain. Ce test a pour but d'aider au diagnostic sérologique en cas d'infection antérieure par le virus Epstein-Barr et il est destiné à un usage de diagnostic *in vitro*.

SIGNIFICATION ET CONTEXTE

Le virus d'Epstein-Barr (EBV) est un virus ubiquitaire humain responsable de la mononucléose infectieuse (MNI), une maladie auto-limitative lymphoproliférative (1). À l'âge adulte presque tout le monde a été infecté et a développé une immunité contre ce virus. Dans les pays sous-développés, la séroconversion au virus a lieu dans la petite enfance et est généralement asymptomatique (2). Dans les pays plus riches, les infections EBV sont souvent retardées jusqu'à l'adolescence, voire plus tard, pour se manifester sous forme de MNI chez environ 50 % des personnes de ce groupe d'âge (3-5).

Après la séroconversion, symptomatique ou non, l'EBV provoque une infection latente chronique à lymphocytes B qui dure probablement toute la vie (6). L'EBV se réplique dans les cellules épithéliales oropharyngées et est présent dans la salive de la plupart des patients ayant une MNI (7). Ainsi, 10-20 % des personnes en bonne santé qui sont positives aux anticorps EBV excrètent le virus dans leurs sécrétions orales (6-8). La réactivation du porteur viral à l'état latent, comme en témoigne l'augmentation de l'excrétion virale, peut être induite par l'immunosuppression, la grossesse, la malnutrition ou la maladie (8, 9). Les infections chroniques par EBV, soient latentes ou actives, sont rarement associées à la maladie. Cependant, l'EBV a été impliqué en tant que facteur aggravant dans l'étiologie du carcinome du nasopharynx, le lymphome de Burkitt et les lymphomes chez les patients immunodéprimés (4,8).

Le test de Paul-Bunnell-Davidsohn (détection d'anticorps hétérophiles) est hautement spécifique pour la MNI (10). Cependant, 10-15 % des adultes, et un pourcentage plus élevé d'enfants et de nourrissons avec des infections primaires à EBV, ne développent pas d'anticorps hétérophiles (11). Des tests sérologiques spécifiques à l'EBV sont nécessaires pour différencier les infections primaires à EBV dites hétérophiles négatives, des maladies de type mononucléose causées par d'autres agents en recherchant le cytomégalovirus, l'adénovirus et le *Toxoplasma gondii* (4).

Les titres d'anticorps contre les antigènes EBV spécifiques sont en corrélation avec les différentes étapes de la MNI (4, 10-12). Les deux anticorps IgM et IgG contre l'antigène de la capsid virale (VCA) atteignent un pic 3 à 4 semaines après l'infection à l'EBV. Les taux d'IgM anti-VCA diminuent rapidement et sont habituellement indétectables après 12 semaines. Les titres d'anticorps IgG anti-VCA diminuent lentement après avoir atteint un pic et peuvent durer indéfiniment. Les anticorps aux antigènes nucléaires EBV (EBNA) se développent de 1 à 6 mois après l'infection et, comme les anticorps IgG anti-VCA, ils persistent indéfiniment (11, 12). La présence d'anticorps anti-EBNA indique que l'infection est ancienne (11).

L'antigène précoce à EBV (EA) est fait de deux composants : une partie diffuse (D) et une partie cachée (R). Les termes D et R reflètent les différents modèles de coloration par immunofluorescence exposés par les deux composants (13,14). Les anticorps dirigés contre les antigènes précoces EA peuvent apparaître de manière transitoire pendant une durée maximale de trois mois durant la phase aiguë de la MNI chez 85 % des patients (15). La réponse des anticorps à EA chez des patients atteints de MNI est en général contre le composant D, alors qu'une séroconversion asymptomatique à EBV durant l'enfance produit des anticorps contre le composant R (5,11). Un diagnostic définitif à une infection par l'EBV peut être faite dans 95% des cas lors de la phase aiguë avec du sérum en se basant sur la détection des anticorps contre VCA, EBNA et EA (12).

De hauts niveaux d'anticorps anti-VCA, avec des anti-EBNA et des anti-EA-R sont associés à une réactivation du porteur viral latent (16,17). De hauts niveaux d'IgG anti-VCA ont été trouvés dans le sérum de patients immunodéficients (6,18), atteints de parotidite (19), de sclérose en plaques (20), de carcinome nasopharyngé (21), mais aussi chez des patients immunodéprimés (8,22), chez les femmes enceintes (23), et chez les personnes âgées (17).

Le dépistage de la présence des anticorps anti-VCA et des antigènes relatifs à EBV peuvent fournir d'importantes informations pour le diagnostic d'une infection à EBV. L'immunofluorescence indirecte est la méthode sérologique la plus communément utilisée pour détecter les anticorps anti-EBV (11). Cependant, la méthode ELISA, d'abord décrite par Engvall et Perlman (24,25), peut être une méthode alternative sensible et fiable pour la détection des anticorps anti-EBV (26,27). La technique ELISA permet une détermination objective de l'état des anticorps par une simple dilution de l'échantillon à tester et est compatible avec le dépistage d'un grand nombre d'échantillons.

PRINCIPE DU TEST

Le système de test ZEUS ELISA IgG du virus Epstein-Barr (EBV-VCA) est conçu pour la détection d'anticorps de classe IgG dirigés contre le virus Epstein-Barr dans le sérum humain. Les puits des barrettes à micro-puits plastiques sont sensibilisés par une absorption passive d'antigène EBV. 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. Des anticorps IgG antihumains d'origine caprine conjugués à de la peroxydase sont ajoutés dans les puits et la plaque est incubée. Le conjugué réagira avec les anticorps IgG 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®.

Composant			Description
PLATE	1	5	Plaque : 96 puits configurés en douze bandes de 8 puits, enduits d'antigène EBV-VCA inactivé. Les bandes sont emballées dans un porte-bandes et placées avec du desséchant dans une enveloppe hermétiquement fermée.
CONJ	1	5	Conjugué : Solutions d'immunoglobulines de chèvre anti-IgG humaines conjuguée à de la peroxydase de raifort (spécifique à la chaîne Fc), flacons de 15 ml à bouchon blanc. Prêt à l'emploi.
CONTROL +	1	2	Contrôle positif (sérum humain) : Ampoule(s) de 0,35 ml avec bouchon rouge.
CAL	1	4	Étalon (sérum humain) : Ampoule(s) de 0,5 ml avec bouchon bleu.

CONTROL	-	1	2	Contrôle négatif (sérum humain) : Ampoule(s) de 0,35 ml avec bouchon vert.
DIL	SPE	1	4	SAVE Diluent® : Flacon(s) 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	1	5	TMB : Flacon(s) de 15 ml à bouchon ambre contenant du tétraméthyl-3, 3', 5, 5'-benzidine (TMB). Prêt à l'emploi.
SOLN	STOP	1	3	Solution d'arrêt : Flacon(s) de 15 ml à bouchon rouge contenant du 1M H ₂ SO ₄ , 0,7M HCl. Prêt à l'emploi.
WASHBUF	10X	1	5	Tampon de lavage concentré (10 x) : Dilution d'un volume de concentré dans neuf volumes d'eau distillée ou déionisée. Flacon(s) 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

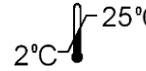
1. Pour utilisation diagnostique *in vitro* uniquement.
2. Observer les précautions normalement applicables lors de toute manipulation de réactif de laboratoire. En cas de contact oculaire, rincer immédiatement les yeux avec beaucoup d'eau et consulter un médecin. Porter des vêtements protecteurs appropriés, 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.
4. 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 (28).
5. 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.
6. 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 aspiration) avant d'ajouter le conjugué ou le substrat. Ne pas laisser les puits sécher entre les incubations.
7. La solution SAVE Diluent®, les solutions de contrôle et la solution étalon contiennent de l'azoture de sodium sous une concentration inférieure à 0,1 % (volume d'eau). Il a été signalé que l'azoture de sodium pouvait former des accumulations de plomb ou d'azoture 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'azoture de sodium.
8. 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.
9. La solution TMB est nocive. Ce produit peut irriter les yeux, le système respiratoire et la peau.
10. Le tampon de lavage concentré est IRRITANT. Ce produit peut irriter les yeux, le système respiratoire et la peau.
11. 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.
12. La dilution et l'adultération de ces réactifs peuvent produire des résultats erronés.
13. Ne pas utiliser les réactifs d'autres vendeurs ou fabricants.
14. 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.
15. Ne jamais pipeter à la bouche. Éviter tout contact de la peau ou des muqueuses avec des réactifs ou des échantillons humains.
16. Éviter toute contamination microbienne des réactifs. Des résultats incorrects pourraient survenir.
17. Toute contamination des réactifs ou des échantillons pourrait fausser les résultats.
18. Les récipients en verre réutilisables doivent être lavés et abondamment rincés de façon à enlever tout résidu de détergent.
19. Éviter les éclaboussures et la génération d'aérosols.
20. Ne pas exposer les réactifs à une lumière puissante durant leur stockage ou durant une incubation.
21. 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.
22. 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.
23. Mise en garde : Avant d'ajouter une solution de javel, neutraliser les résidus liquides jusqu'à l'obtention d'un pH acide.
24. Ne jamais utiliser une plaque ELISA dont la bande indicatrice du sachet de déshydratant est passée du bleu au rose.
25. Ne pas laisser le conjugué entrer en contact avec des récipients ou des instruments pouvant avoir précédemment contenu une solution utilisant de l'azoture de sodium comme agent de conservation. Des quantités résiduelles d'azoture de sodium peuvent détruire l'activité enzymatique du conjugué.
26. 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

1. 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.**
2. Pipettes pouvant mesurer avec précision des quantités de 10 – 200 µl.
3. Pipette à canaux multiples pouvant mesurer avec précision des quantités de 50 – 200 µl.
4. Réservoirs de réactif pour pipettes à canaux multiples.
5. Flacon de lavage ou système de lavage de micropuits.
6. Eau distillée ou déionisée.
7. Cylindre gradué d'un litre.

8. Pipettes sérologiques.
9. Embouts de pipettes jetables.
10. Serviettes en papier.
11. Minuterie de laboratoire pour mesurer les étapes d'incubation.
12. 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, étalon, 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

1. 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).
2. 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.
3. Utiliser uniquement du sérum sanguin fraîchement prélevé et correctement réfrigéré, obtenu selon la procédure de ponction veineuse aseptique de cette analyse (27, 28). 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 (31).

PROCÉDURE D'ESSAI

1. Sortir les composants de leur lieu de stockage et laisser les composants se réchauffer à température ambiante (20 – 25 °C).
2. 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	

3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Incuber la plaque à température ambiante (20 – 25 °C) pendant 25 ± 5 minutes.
7. Laver les bandes de micropuits 5 fois.
 - a. **Procédure de lavage manuel :**
 1. Secouer vigoureusement pour faire sortir le liquide des puits.
 2. Remplir chaque micropuits de tampon de lavage. S'assurer qu'aucune bulle d'air n'est emprisonnée dans les puits.
 3. Répéter les étapes 1 et 2 jusqu'à un total de 5 lavages.
 4. 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.
 - b. **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.
8. 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.
9. Incuber la plaque à température ambiante (20 – 25 °C) pendant 25 ± 5 minutes.
10. Laver les micropuits conformément à la procédure décrite dans l'étape 7.
11. 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.
12. Incuber la plaque à température ambiante (20 – 25 °C) pendant 10 ± 15 minutes.
13. 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.
14. 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

1. Diluer le sérum 1:21.
2. Ajouter l'échantillon dilué dans les micropuits à raison de 100 µl/puits.
3. $\xrightarrow{\hspace{2cm}}$ Incuber 25 ± 5 minutes.
4. Laver.
5. Ajouter le conjugué – 100 µl/puits.
6. $\xrightarrow{\hspace{2cm}}$ Incuber 25 ± 5 minutes.
7. Laver.
8. Ajouter le TMB – 100 µl/puits.
9. $\xrightarrow{\hspace{2cm}}$ Incuber 10 - 15 minutes.
10. Ajouter la solution d'arrêt, 50 µl/puits – Mélanger.
11. LIRE les résultats dans les 30 minutes.

CONTRÔLE DE QUALITÉ

1. 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.
2. 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.
3. 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

- a. 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 ≥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 dans 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	≤0,90
Échantillons ambivalents	0,91 à 1,09
Échantillons positifs	≥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 dirigés contre EBV-VCA. Un résultat négatif signifie une absence d'infection à l'EBV actuelle ou passée. Ces personnes sont présumées être sensibles à l'infection primaire.
- b. Un rapport DO égal ou supérieur à 1,10 signifie que des anticorps IgG spécifiques à EBV-VCA ont été détectés. Un résultat positif signifie une infection à l'EBV actuelle ou passée.
- 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.
- d. Il n'existe pas de norme internationale pour VCA IgG. Par conséquent, l'affectation des valeurs des contrôles et de l'étalon a été basée sur une préparation de référence interne.

LIMITES DE L'ESSAI

1. La plupart des individus positifs pour une MNI (80 %) ont un pic de VCA-IgG avant qu'ils consultent un médecin (4). Par conséquent, des tests jumelés de sérum prélevés lors de la phase aiguë et de la convalescence pour voir des changements significatifs des niveaux d'anticorps ne sont pas utiles chez la plupart des patients atteints de MNI (4).
2. Le taux d'anticorps d'un seul échantillon de sérum ne devrait pas être utilisé pour diagnostiquer une infection récente. Les résultats des tests anti-VCA-IgG doivent être interprétés conjointement à une évaluation clinique et aux résultats des tests pour les autres anticorps anti-EBV, c'est-à-dire EBNA, EA et VCA-IgM.

RÉSULTATS ESPÉRÉS

Toutes les personnes immunocompétentes infectées par EBV produisent des anticorps anti-VCA (6). Les anticorps IgM et IgG à VCA apparaissent rapidement après l'infection et atteignent une concentration maximum en 3 à 4 semaines (4). Les anticorps IgG à VCA déclinent lentement après le pic mais restent indéfiniment (15). Une première infection aiguë par EBV est indiquée par la présence des anticorps IgG à VCA, couplés avec des anti EA et/ou des IgM à VCA et par l'absence d'anticorps EBNA (4, 11). La présence des anticorps IgG à VCA et anti EBNA indique que l'infection n'est pas récente (4, 11). L'incidence d'une infection à EBV varie avec l'âge et le statut socioéconomique (6). Dans les pays sous développés, la plupart des personnes sont infectés par l'EBV dans la petite enfance et l'infection est généralement asymptomatique (2, 4). Dans une étude réalisée aux États-Unis, environ 50% des étudiants de première année étaient séropositifs pour l'EBV (30). Dans une étude conduite par Zeus Scientific Inc., en utilisant 135 échantillons normaux provenant du sud-ouest des États-Unis, 134/135 étaient positifs aux deux tests ZEUS ELISA de Système de dépistage d'anticorps IgG à EBV-VCA

dépistage d'IgG à VCA et ZEUS IFA de dépistage d'IgG à VCA. Dans une autre étude comprenant 32 échantillons pédiatriques normaux, 32/32 étaient négatifs aux deux tests ZEUS ELISA de dépistage d'IgG à VCA et ZEUS IFA de dépistage d'IgG à VCA. Le nombre d'individus ayant des IgG à EBV-VCA varie avec l'âge et le statut socioéconomique. ZEUS Scientific recommande que chaque laboratoire établisse ses propres valeurs normales en fonction de la population locale.

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

1. Étude comparative

Le système de test ZEUS ELISA de dépistage d'IgG à EBV-VCA a été comparé à un autre test commercial ELISA du même type. Une étude comparative sur de 199 échantillons a été faite à partir de spécimens collectés dans deux centres de donneurs de sang et un laboratoire de référence. Les résultats de cette étude sont résumés ci-dessous.

Tableau 1 : Comparaison du système de test ZEUS ELISA de dépistage d'IgG à EBV-VCA avec un test commercial ELISA du même type

		Système de test ZEUS ELISA de dépistage d'IgG à EBV-VCA			
		Positif	Négatif	Ambivalent*	Total
Test commercial ELISA de dépistage d'IgG à EBV-VCA	Positif	104	8**	3	115
	Négatif	10**	46	4	60
	Ambivalent*	11	12	1	24
	Total	125	66	8	199

Sensibilité relative : $104/112 = 92,9\%$

Spécificité relative : $46/56 = 82,1\%$

Pourcentage de concordance : $150/168 = 89,3\%$

*Les échantillons ambivalents ne sont pas pris en compte dans les calculs.

**Résultats discordants.

Le tableau 2 ci-dessous présente les résultats des reprises de tests sur les échantillons discordants avec le système de test ZEUS ELISA de dépistage d'IgG à EBV-VCA.

Tableau 2 : Analyse des résultats discordants

N° d'échantillon	Système de test ZEUS ELISA de dépistage d'IgG à EBV-VCA	Test commercial ELISA de dépistage d'IgG à EBV-VCA	Système de test ZEUS IFA de dépistage d'IgG à EBV-VCA
26	0,251	1,16	-
29	0,261	1,00	-
38	0,358	1,00	-
39	0,368	1,13	-
41	0,391	1,30	-
53	0,582	1,05	-
63	0,767	1,10	+
34	0,797	1,30	+
81	1,243	0,65	+
83	1,270	0,70	+
89	1,399	0,73	+
93	1,449	0,39	-
101	1,614	0,57	+
111	1,859	0,60	+
133	2,216	0,48	+
137	2,254	0,75	+
139	2,320	0,77	+
152	2,730	0,20	+

Résumé :

- Huit échantillons étaient négatifs avec le test ELISA ZEUS et positifs avec le test commercial ELISA équivalent. Six de ces huit échantillons se sont confirmés négatifs par le test IFA ZEUS.
- Dix échantillons étaient positifs avec le test ELISA ZEUS et négatifs avec le test commercial ELISA équivalent. Neuf de ces dix échantillons se sont confirmés positifs par le test IFA ZEUS.
- En se basant sur les résultats en IFA des échantillons discordants, la sensibilité relative, la spécificité relative et le pourcentage de concordance ont été recalculés. Ces résultats sont dans le tableau 3 :

Tableau 3 : Reprise des calculs de sensibilité relative, de spécificité et de pourcentage de concordance

Sensibilité relative :	$113/115 = 98,3\%$
Spécificité relative :	$52/53 = 98,1\%$
Pourcentage de concordance :	$165/168 = 98,2\%$

2. Reproductibilité

Afin d'évaluer la variabilité inter et intra-essai, cinq échantillons de sérum ayant des résultats allant de positifs à négatifs ont été testés en utilisant deux lots de production différents, sur trois jours. Durant chacun des trois jours, un technicien a testé chaque échantillon une fois par jour, à huit reprises chaque fois, sur chaque lot maître. La moyenne des DO et le coefficient de variation (CV) ont été calculés pour chaque échantillon. Les résultats de cette étude sont décrits dans le tableau 4 (lot A) et dans le tableau 5 (lot B). Le tableau 6 résume la variabilité globale du test en combinant les données lot à lot et jour à jour.

Tableau 4 : Résumé de la variabilité inter et intra-essai pour le test ZEUS ELISA de dépistage d'IgG à EBV-VCA

Lot A	Jour 1			Jour 2			Jour 3			Rapport moyen	ET	% CV
	Rapport moyen	ET	% CV	Rapport moyen	ET	% CV	Rapport moyen	ET	% CV			
1. Ambivalent	0,96	0,04	4,2	0,77	0,04	5,2	0,99	0,04	4,0	0,91	0,10	11,0
2. Faiblement positif	1,53	0,12	7,8	1,29	0,11	8,5	1,51	0,07	4,6	1,44	0,15	10,4
3. Faiblement positif	1,33	0,11	8,3	1,12	0,10	8,9	1,25	0,04	3,2	1,23	0,12	9,8
4. Faiblement positif	1,52	0,12	7,9	1,12	0,09	8,0	1,43	0,12	8,4	1,36	0,21	15,4
5. Négatif	0,15	0,03	20,0	0,11	0,02	18,2	0,15	0,02	13,3	0,14	0,03	21,4

Tableau 5 : Résumé de la variabilité inter et intra-essai pour le test ZEUS ELISA de dépistage d'IgG à EBV-VCA

Lot B	Jour 1			Jour 2			Jour 3			Rapport moyen	ET	% CV
	Rapport moyen	ET	% CV	Rapport moyen	ET	% CV	Rapport moyen	ET	% CV			
1. Ambivalent	1,03	0,06	5,8	0,97	0,06	6,2	1,11	0,07	6,3	1,04	0,08	7,7
2. Faiblement positif	1,38	0,09	6,5	1,38	0,03	2,2	1,29	0,08	6,2	1,35	0,09	6,7
3. Faiblement positif	1,48	0,10	6,8	1,44	0,02	1,4	1,34	0,05	3,7	1,42	0,09	6,3
4. Faiblement positif	1,69	0,14	8,3	1,55	0,12	7,7	1,49	0,10	6,7	1,58	0,15	9,5
5. Négatif	0,28	0,02	7,1	0,22	0,02	9,1	0,24	0,03	12,5	0,25	0,03	12,0

Tableau 6 : Résumé de la variabilité du test ZEUS ELISA de dépistage d'IgG à EBV-VCA – Combinaison des lots A et B (n=48)*

Échant.	Rapport moyen	ET	% CV
1. Ambivalent	0,97	0,11	11,9
2. Faiblement positif	1,40	0,13	9,5
3. Faiblement positif	1,32	0,14	10,9
4. Faiblement positif	1,47	0,21	14,5
5. Négatif	0,19	0,06	32,2

* La variabilité a été testée en utilisant huit puits par échantillon, provenant de deux lots différents, trois jours différents. Ces données représentent une compilation des données des tableaux 4 et 5.

3. Réactivité croisée

Des études ont été réalisées pour évaluer les réactions croisées du test ZEUS ELISA de dépistage d'IgG à EBV-VCA en utilisant des sérums négatifs aux anticorps contre l'EBV-VCA mais positifs pour des anticorps anti antigènes nucléaires (n = 9) et aux virus herpétiques suivants :

HSV-1 IgG	(n=8)
HSV-2 IgG	(n=6)
VZV IgG	(n=10)
CMV IgG	(n=6)

Ces études indiquent que les interférences lors du déroulement du test avec la liste des anticorps nommés ci-dessus sont minimales.

RÉFÉRENCES

- Rapp CE, and Heweston JF: Infectious mononucleosis and the Epstein-Barr virus. *Am. J. Dis. Child.* 132:78, 1978.
- Biggar RJ, Henle W, Fleisher G, Bocker J, Lennette ET, and Henle G: Primary Epstein-Barr virus infections in African infants. I: Decline of maternal antibodies and time of infection. *Int. J. Cancer.* 22:239, 1978.
- Fry J: Infectious mononucleosis: Some new observations from a 15 year study. *J. Fam. Prac.* 10:1087, 1980.
- Lennette ET: Epstein-Barr virus. In: *Manual of Clinical Microbiology*, 4th edition. Lennette ET, Balows A, Hausler WJ, Shadomy HJ, eds. Washington DC, American Society for Microbiology, p. 326, 1987.
- Fleisher G, Henle W, Henle G, Lennette ET, and Biggar RJ: Primary infection with Epstein-Barr virus in infants in the United States: Clinical and Serological Observations. *J. Infect. Dis.* 139:553, 1979.
- Merlin TL: Chronic mononucleosis: Pitfalls in the laboratory diagnosis. *Hum. Path.* 17:2, 1986.
- Sixbey JW, Nedrud JG, Raab-Traub N, Hanes RA, Pagano JS: Epstein-Barr virus replication in oropharyngeal epithelial cells. *New Eng. J. Med.* 310:1225, 1984.
- Chang RS, Lewis JP, Reynolds RD, Sullivan MJ, Neuman J: Oropharyngeal excretion of Epstein-Barr virus by patients with lymphoproliferative disorders and by recipients of renal homografts. *Ann. Intern. Med.* 88:34, 1978.
- Jones JF, Ray G, Minnich LL, Hicks MJ, Kibler R, Lucus DO: Evidence of active Epstein-Barr virus infection in patients with persistent, unexplained illness. Elevated anti-early antigen antibodies. *Ann. Intern. Med.* 102:1, 1985.
- Evans AS, Neiderman JC, Cenabre LC, West B, and Richards VA: A prospective evaluation of heterophile and Epstein-Barr virus-specific IgM antibody tests in clinical and subclinical infectious mononucleosis: Specificity and sensitivity of the tests and persistence of antibody. *J. Infect. Dis.* 132:546, 1975.
- Henle W, Henle GE, and Horowitz CA: Epstein-Barr virus specific diagnostic tests in infectious mononucleosis. *Hum. Path.* 5:551, 1974.
- Lennette ET, and Henle W: Epstein-Barr virus infections: Clinical and serological features. *Lab Management.* p. 23, June, 1987.
- Reedman BM, and Klein G: Cellular localization of an Epstein-Barr virus (EBV) associated complement-fixing antigen in producer and non-producer lymphoblastoid cell lines. *Int. J. Cancer* 11:499, 1973.
- Henle G, Henle W, and Horowitz CA: Antibodies to Epstein-Barr virus-associated nuclear antigen in infectious mononucleosis. *J. Infect. Dis.* 130:231, 1974.
- Horowitz CA, Henle W, Henle G, Rudnick H, and Lutts E: Long-term serological follow-up of patients for Epstein-Barr virus after recovery from infectious mononucleosis. *J. Infect. Dis.* 151:1150, 1985.
- Horowitz CA, Henle W, Henle G, and Schmitz H: Clinical evaluation of patients with infectious mononucleosis and development of antibodies to the R component of the Epstein-Barr virus-induced early antigen complex. *Am. J. Med.* 58:330, 1975.
- Sumaya CV: Endogenous reactivation of Epstein-Barr virus infections. *J. Infect. Dis.* 135:374, 1977.
- Joncas J, Lapointe N, Gervais F, Leyritz M, and Wills A: Unusual prevalence of antibodies to Epstein-Barr virus early antigen in ataxia telangiectasia. *Lancet* 1: 1160, 1977.
- Akaboshi I, Jamamoto J, Katsuki T, and Matsuda I: Unique pattern of Epstein-Barr virus specific antibodies in recurrent parotitis. *Lancet* 2:1049, 1983.
- Larson PD, Bloomer LC, and Brag PF: Epstein-Barr nuclear antigen and viral capsid antigen antibody titers in multiple sclerosis. *Neurology* 35: 435, 1985.
- Henle W, Ho H-C, Henle G, and Kwan HC: Antibodies to Epstein-Barr virus related antigens in nasopharyngeal carcinoma. Comparison of active cases with long-term survivors. *J. Natl. Cancer Inst.* 51:361, 1973.
- Henle W, and Henle G: Epstein-Barr virus-specific serology in immunologically compromised individuals. *Cancer Res.* 41:4222, 1981.
- Fleisher G, and Bolognese R: Persistent Epstein-Barr virus infection and pregnancy. *J. Infect. Dis.* 147:982, 1983.
- Engvall E and Perlman P: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochem.* 8:871-874, 1971.
- Engvall E and Perlman P: Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen coated tubes. *J. Immunol.* 109:129-135, 1972.
- Voller A, Bartlett A, and Bidwell DE: Enzyme immunoassays with special reference to ELISA technique. *J. Clin. Pathol.* 31:507-520, 1978.
- Hopkins RF, Witmer TJ, Neubauer RH, and Rabin H: Detection of antibodies to Epstein-Barr virus antigens by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Infect. Dis.* 146:734-740, 1982.
- 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.
- Hallee TJ, Evans AS, Neiderman JC, Brooks CM and Boegly: Infectious mononucleosis at the United States Military Academy, a prospective study of a single class over four years. *Yale J. Biol. Med.* 47:182-192, 1974.
- U.S. Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration: Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens. Final Rule, Fed. Register 56:64175-64182, 1991.



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.

Système de dépistage d'anticorps IgG à EBV-VCA

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.



(Actualisé le 12/19/2017)