

UTILISATION PRÉVUE

Le système de test ZEUS ELISA IgM du virus d'herpès simple de type 1 et 2 (VHS) est un test d'immunoenzymologie (ELISA) conçu pour la détection qualitative d'anticorps de classe IgM dirigés contre le virus d'herpès simple (VHS) dans un échantillon de sérum sanguin humain. Le test a été conçu pour évaluer le dépistage sérologique d'une primo-infection ou d'une infection réactivée par le virus d'herpès simple. Il est réservé à un usage diagnostique *in vitro*.

SIGNIFICATION ET CONTEXTE

Les infections au VHS sont qualifiées soit de primo-infection, soit d'infection récurrente. Après une infection, une infection latente est établie dans les neurones sensoriels et une infection récurrente résulte de la réactivation de l'infection latente (2). Les infections récurrentes ont tendance à être moins sévères et de plus courte durée que la primo-infection (1). Les infections par VHS sont généralement localisées au foyer initial de l'infection. Toutefois, une maladie grave, localisée ou disséminée, n'est pas à exclure chez les personnes présentant un déficit immunologique. Ces personnes incluent les nouveau-nés et les patients sous traitement immunosuppresseur, tels que les patients greffés et les patients cancéreux (1, 2).

Les infections au VHS sont transmises par des sécrétions contenant le virus lors de contacts personnels intimes. Les infections au VHS, autant primaires que récurrentes, sont souvent sous-cliniques et asymptomatiques. La séparation des cellules virales est le plus important facteur contribuant à la propagation du virus (2). Entre 75 et 90 % des personnes de faible niveau socio-économique acquièrent des anticorps anti-VHS dès la fin de leurs dix premières années de vie (5, 7). Chez les personnes de niveau socioéconomique supérieur, entre 30 et 40 % deviennent séropositives dès 15 ans (5).

Les primo-infections au VHS-1 de la muqueuse buccale sont généralement observées chez les enfants de moins de 5 ans (2). La plupart des infections sont asymptomatiques. Les infections symptomatiques sont caractérisées par une gingivostomatite associée à de la fièvre, une sensation de malaise et un gonflement tendre des glandes lymphatiques cervicales (2). Plusieurs petites vésicules se développent dans la muqueuse buccale, causant des ulcères qui guérissent après environ deux semaines. La forme la plus courante de VHS-1 récurrent est l'herpès labial, faisant apparaître des éruptions vésiculaires sur les lèvres, autour du nombril et sur la peau autour de la bouche (1, 2). Les symptômes de l'herpès génital sont des lésions ulcéraires multiples accompagnées de douleur, de fièvre, de dysurie et de lymphadénopathie (6).

La complication la plus grave de l'herpès génital est une maladie néonatale (2). À la différence du cytomégalovirus, le VHS traverse rarement le placenta pour infecter le fœtus *in utero* (1). Le VHS est transmis de la mère au nouveau-né au moment de l'accouchement (1). Les nourrissons acquièrent l'infection en traversant la filière pelvi-génitale infectée ou si la rupture des membranes a eu lieu il y a plus de six heures (6). Chez les mères ayant une primo-infection active, le risque de transmission aux bébés peut atteindre 40 % (5). Environ 69-80 % des bébés souffrant d'herpès néonatal sont nés de mère ne présentant aucun symptôme d'herpès génital lors de la naissance (5).

Les nourrissons infectés par le VHS apparaissent normaux à la naissance, mais développent quasi invariablement des symptômes durant la période néonatale (1, 5). L'infection néonatale par VHS peut rester localisée ou se disséminer (1, 5). Une infection localisée peut concerner un foyer ou une combinaison de foyers. Il s'agit de la peau, des yeux, de la bouche ou du système nerveux central. L'infection disséminée se manifeste par une pneumopathie, une hépatite, une coagulopathie intravasculaire disséminée et une encéphalite (1, 5). Parmi les nourrissons atteints de VHS néonatal, la moitié environ décèdent en l'absence de traitement et environ la moitié des survivants développent des séquelles neurologiques ou oculaires sévères (3).

Les procédures sérologiques peuvent être utiles pour le diagnostic d'une primo-infection au VHS, ainsi que pour démontrer l'existence d'une infection passée au VHS. Le diagnostic d'une primo-infection repose sur la démonstration d'une séroconversion ou d'une hausse significative du dosage entre deux sérums, l'un aigu, l'autre convalescent (2, 4). Les procédures sérologiques sont moins utiles pour le diagnostic d'infections récurrentes par le VHS dans la mesure où les infections récurrentes ne se manifestent souvent pas par un changement de niveau d'anticorps (2, 4). En outre, parmi les personnes présentant une primo-infection par le VHS-2 qui ont eu une infection passée par le VHS-1 durant l'enfance, peu voire aucune augmentation du niveau d'anticorps spécifiques anti-VHS-2 n'est constatée (24).

Plusieurs procédures sérologiques ont été développées pour détecter des anticorps dirigés contre le VHS. Elles incluent les suivantes : réaction de fixation du complément, dépistage d'anticorps par immunofluorescence indirecte, neutralisation sur plaque et test d'immunoenzymologie (ELISA) (2, 4 et 6). Le test ELISA a été décrit pour la première fois par Engvall et Perlman, et il a été appliqué par la suite à la détection d'un large éventail d'antigènes et d'anticorps différents (10-12). Comparé à d'autres tests sérologiques, le test ELISA peut être une méthode très spécifique, sensible et fiable de dépistage d'anticorps dirigés contre le VHS (6, 13 et 14). Le test ELISA permet la détermination objective du statut en matière d'anticorps en une seule dilution de l'échantillon et il est adapté au dépistage dans un grand nombre d'échantillons patient.

Les anticorps IgG anti-VHS de forte affinité, s'ils sont présents dans un échantillon, risquent d'interférer avec le dépistage d'anticorps IgM spécifiques (15, 20). Les anticorps IgG de forte affinité peuvent se lier de préférence à un antigène de VHS et produire par conséquent des résultats IgM négatifs (15). En outre, le facteur rhumatoïde, s'il est présent avec de l'IgG spécifique de l'antigène peut se lier à l'IgG, ce qui causera des IgM faux positifs (16). Les deux problèmes cités ci-dessus peuvent être éliminés en supprimant l'IgG de l'échantillon avant de faire le test de dépistage d'IgM (17-20). Plusieurs méthodes de séparation de l'IgG sont disponibles. Ces méthodes incluent la chromatographie sur gel (17), l'absorption avec protéine A (18), la chromatographie d'échange d'ions (19) et la précipitation d'IgG avec du sérum dirigé contre les IgG humaines (20).

PRINCIPE DU TEST

Le système de test ZEUS ELISA IgG à VHS-1 et VHS-2 a été conçu pour la détection d'anticorps de classe IgG contre le VHS dans un échantillon de sérum sanguin humain. Les puits des barrettes à micro-puits plastiques sont sensibilisés par une absorption passive d'antigène VHS. La procédure de test comprend trois étapes d'incubation :

1. Le sérum devant être testé est dilué avec le diluant d'échantillon fourni. Le diluant d'échantillon contient de l'IgG anti-humaine qui précipite et élimine l'IgG et le facteur rhumatoïde de l'échantillon, en laissant l'IgM libre de réagir avec l'antigène immobilisé. Lors de l'incubation de l'échantillon, tout anticorps IgM spécifique de l'antigène qui est présent dans l'échantillon se lie à l'antigène immobilisé. La plaque est lavée de façon à enlever les anticorps non fixés et les autres composants sériques.
2. Des anticorps IgM 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 IgM immobilisés sur la phase solide de l'étape 1. Les puits sont lavés pour enlever le conjugué non fixé.
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 diluant d'échantillon.

PLATE		1. Plaque : 96 puits configurés en douze bandes de 8 puits, enduits d'antigènes inactivés VHS-1 (souche MacIntyre) et VHS-2 (souche G produite dans E6 – purété 0 20 %). Les bandes sont emballées dans un porte-bandes et placées avec du desséchant dans une enveloppe hermétiquement fermée.
CONJ		2. Conjugué : Solution d'IgM antihumains d'origine caprine conjuguée à de la peroxydase du raifort (spécifique à la chaîne μ). 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. Diluant d'échantillon : Un flacon de 30 ml à bouchon bleu contenant du Tween-20, de l'albumine de sérum bovin et tampon phosphate salin. Solution pourpre. Prêt à l'emploi.
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	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.
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 (23).
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 ou aspiration) avant d'ajouter le conjugué ou le substrat. Ne pas laisser les puits sécher entre les incubations.
7. Le diluant d'échantillon, 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 évier 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.

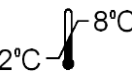
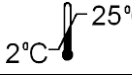
MATÉRIAUX NÉCESSAIRES MAIS NON FOURNIS

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, diluant d'échantillon
	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 fraîchement prélevé et correctement réfrigéré, obtenu selon la procédure de ponction veineuse aseptique de cette analyse (20, 21). 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 (24).

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 diluant d'échantillon) de contrôle négatif, d'étalon, de contrôle positif et de sérum de chaque patient.
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 diluant d'échantillon dans les 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 les 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 les 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. $\longrightarrow$ Incuber 25 ± 5 minutes.
4. Laver.
5. Ajouter le conjugué – 100 µl/puits.
6. $\longrightarrow$ Incuber 25 ± 5 minutes.
7. Laver.
8. Ajouter le TMB – 100 µl/puits.
9. $\longrightarrow$ 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 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 x DO moyenne de l'étalon = 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 x 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 IgM dirigés contre le VHS-1 ou le VHS-2. Un résultat négatif signifie une absence d'infection au VHS-1/VHS-2 actuelle ou passée.
- b. Un rapport DO égal ou supérieur à 1,10 signifie que des anticorps IgM spécifiques au VHS-1/VHS-2 ont été détectés. Ce système de test ne permet pas de distinguer les anticorps au VHS-1 des anticorps au VHS-2. Un résultat positif signifie la présence d'une primo-infection ou d'une infection réactivée au VHS-1/VHS-2.
- 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. Les échantillons obtenus trop tôt durant une primo-infection peuvent ne pas présenter de niveaux détectables d'anticorps IgM. Si une primo-infection est suspectée, un autre échantillon doit être prélevé sous 7 à 14 jours et analysé en même temps que l'échantillon d'origine pour déterminer la séroconversion.

LIMITES DE L'ESSAI

1. Un résultat négatif n'exclut pas une primo-infection par VHS-1 ou VHS-2 ou une infection réactivée dans la mesure où il se peut que les échantillons aient été prélevés à un stade trop précoce de l'infection ou que les titres d'IgM aient chuté en dessous des niveaux détectables.
2. Les anticorps IgG spécifiques de VHS peuvent être en compétition avec les IgM pour les sites de liaison et causer des faux négatifs. Le facteur rhumatoïde, s'il est présent avec des IgG spécifiques de VHS, causera des faux positifs. Le diluant d'échantillon contient un absorbant qui élimine les IgG des échantillons à doser et réduit sensiblement l'incidence des résultats erronés.

3. Une réponse hétérotypique des anticorps IgM peut se produire chez les patients infectés par le virus d'Epstein-Barr et donner des faux positifs dans les systèmes de test ZEUS ELISA IgM anti-VHS-1 et VHS-2.
4. Les anticorps IgM spécifiques du VHS peuvent réapparaître durant la réactivation d'une infection VHS (1, 2 et 3).
5. Les résultats des systèmes de test ZEUS ELISA IgM anti-VHS-1 et VHS-2 ne permettent pas à eux seuls de rendre un diagnostic et doivent être interprétés avec l'état clinique du patient et les résultats d'autres procédures diagnostiques.
6. Chez les patients immunodéprimés, la possibilité de réponse des IgM peut être compromise et les IgM spécifiques de VHS peuvent être faussement négatives durant une infection active.
7. La présence continue et le niveau d'anticorps ne peuvent servir à déterminer la réussite ou l'échec d'un traitement.
8. Les caractéristiques de performance n'ont pas été établies chez le nouveau-né et le nourrisson, pas plus que sur du sang prélevé au niveau du cordon ombilical.
9. Aucune caractéristique de performance de dosage n'a été établie pour une détermination visuelle des résultats.
10. Les systèmes de test ZEUS ELISA IgG à VHS-1 et VHS-2 n'ont pas pour objet de remplacer l'isolement et/ou l'identification du virus.
11. Étant donné les antigènes communs, les infections causées par un type de VHS en présence d'anticorps dirigés contre le type hétérologue peuvent produire une réponse anamnétique de l'anticorps préexistant dont le niveau deviendra supérieur au titre de l'anticorps de l'agent infectieux de l'infection en cours. Par conséquent, le diagnostic définitif du type de VHS doit être rendu par isolement viral.
12. Les caractéristiques de performance du test n'ont pas été définies pour d'autres matrices que du sérum.
13. La prévalence de l'analyte influera sur la valeur prédictive du test.

RÉSULTATS ESPÉRÉS

Pour définir ou estimer le taux de réactivité attendu, 219 échantillons, dosés dans deux centres cliniques, ont été analysés. Ils étaient formés de deux groupes d'échantillons ; 114 échantillons cliniques, envoyés au laboratoire pour analyse sérologique VHS standard, et 105 échantillons de donneurs « normaux » aléatoires. Comparativement à la population clinique, 48/114 (42,1 %) étaient positifs, 56/114 (49,1 %) négatifs et 10/114 (8,8 %) ambivalents. Comparativement à la population clinique, 22/105 (21 %) étaient positifs, 70/104 (66,7 %) négatifs et 13/105 (12,4 %) ambivalents.

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

1. Étude comparative

Une étude comparative a été réalisée pour démontrer l'équivalence du système de test ZEUS ELISA IgM anti-VHS-1 et/ou anti-VHS-2 et des résultats combinés de deux autres systèmes de tests ELISA actuellement disponibles dans le commerce (VHS-1 et VHS-2). La performance du système de test ZEUS ELISA IgM anti-VHS-1 et/ou anti-VHS-2 a été évaluée lors d'une étude clinique à deux centres. En résumé, un total de 219 échantillons ont été testés, 100 sur le site 1, et 119 sur le site 2. Les échantillons dosés au centre 1 comprenaient 50 échantillons normaux et 50 échantillons cliniques. Les échantillons dosés au centre 2 comprenaient 55 échantillons normaux et 64 échantillons cliniques. En ce qui concerne les échantillons cliniques, il s'agissait d'un total de 20 échantillons de femmes âgées de 17 à 38 ans. Les résultats de l'étude comparative sont récapitulés dans les tableaux 1 à 3 ci-dessous :

Tableau 1 : Centre clinique 1

		Système de test ZEUS ELISA IgM VHS-1 et VHS-2			
		Négatif	Ambivalent*	Positif	Total
Tests ELISA disponibles dans le commerce (combinés)	Négatif	68	1	13	82
	Ambivalent*	0	0	0	0
	Positif	4	0	14	18
	Total	72	1	27	100

Sensitivité relative = 14/18 = 77,8 %, Intervalle de confiance à 95 % = 58,6 % à 97,0 %

Spécificité relative = 68/81 = 84,0 %, Intervalle de confiance à 95 % = 76,0 % à 91,9 %

Concordance relative = 82/99 = 82,8 %, Intervalle de confiance à 95 % = 75,4 % à 90,3 %

Tableau 2 : Centre clinique 2

		Système de test ZEUS ELISA IgM VHS-1 et VHS-2			
		Négatif	Ambivalent*	Positif	Total
Tests ELISA disponibles dans le commerce (combinés)	Négatif	66	1	2	69
	Ambivalent*	0	0	0	0
	Positif	13	2	35	50
	Total	79	3	37	119

Sensitivité relative = 35/18 = 72,9 %, Intervalle de confiance à 95 % = 60,3 % à 85,5 %

Spécificité relative = 66/88 = 97,1 %, Intervalle de confiance à 95 % = 93,0 % à 100 %

Concordance relative = 101/116 = 87,1 %, Intervalle de confiance à 95 % = 81,0 % à 93,2 %

Tableau 3 : Centres cliniques combinés

		Système de test ZEUS ELISA IgM VHS-1 et VHS-2			
		Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
Tests ELISA disponibles dans le commerce (combinés)	Négatif	134	2	15	151
	Ambivalent*	0	0	0	0
	Positif	17	2	49	68
	Total	151	4	64	219

Sensitivité relative = 49/66 = 74,2 %, Intervalle de confiance à 95 % = 63,7 % à 84,8 %

Spécificité relative = 134/149 = 89,9 %, Intervalle de confiance à 95 % = 85,1 % à 94,8 %

Concordance relative = 183/215 = 85,1 %, Intervalle de confiance à 95 % = 80,4 % à 89,9 %

* Données exclues des calculs

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. Aucun jugement ne peut être fondé sur la précision comparative du test pour prédire la maladie.

2. Reproductibilité

La reproductibilité a été déterminée en interne. En résumé, six échantillons ont été dosés ; les valeurs allaient de « fortement positif » à « négatif ». Outre ces six membres du panel, le contrôle positif haut et le contrôle négatif du système de test se trouvaient inclus à titre de précision. Chaque échantillon a été dosé en triple, une fois par jour, chacun des trois jours. Les résultats ont permis de calculer la précision intra-essai et inter-essai.

Lot A	Intra-essai (3)						Inter-essai (n=24)	
	Jour 1		Jour 2		Jour 3			
Numéro d'échantillon	Rapport moyen	% CV	Rapport moyen	% CV	Rapport moyen	% CV	Rapport moyen	% CV
Échant. 1	3,36	2,7	3,13	11,3	3,18	3,7	3,22	6,8
Échant. 2	2,52	3,0	1,99	9,3	2,09	7,3	2,20	12,5
Échant. 3	1,97	1,8	1,88	7,4	2,00	1,9	1,95	4,7
Échant. 4	1,05	2,5	0,98	9,3	1,00	9,4	1,01	7,4
Échant. 5	0,18	11,5	0,38	6,5	0,25	13,4	0,27	33,8
Échant. 6	0,28	2,4	0,22	17,8	0,22	1,9	0,24	14,6
CN	0,08	21,2	0,13	11,2	0,00	0,0	0,07	84,0
CP	2,19	1,9	2,09	0,8	2,12	2,6	2,13	2,5

Lot B	Intra-essai (3)						Inter-essai (n=24)	
	Jour 1		Jour 2		Jour 3			
Numéro d'échantillon	Rapport moyen	% CV	Rapport moyen	% CV	Rapport moyen	% CV	Rapport moyen	% CV
Échant. 1	3,72	2,0	3,20	4,6	3,08	5,5	3,33	9,6
Échant. 2	2,29	3,8	1,89	4,6	1,64	13,7	1,94	16,2
Échant. 3	1,58	10,9	1,48	7,8	1,29	5,6	1,45	11,6
Échant. 4	0,88	10,6	0,87	3,5	0,81	5,5	0,85	7,2
Échant. 5	0,40	16,0	0,27	21,0	0,18	39,2	0,28	39,2
Échant. 6	0,17	3,6	0,12	39,2	0,07	68,0	0,12	44,1
CN	0,04	63,0	0,20	33,1	0,16	29,3	0,13	63,9
CP	2,46	2,7	2,09	6,0	2,16	4,0	2,24	8,5

Lot C	Intra-essai (3)						Inter-essai (n=24)	
	Jour 1		Jour 2		Jour 3			
Numéro d'échantillon	Rapport moyen	% CV	Rapport moyen	% CV	Rapport moyen	% CV	Rapport moyen	% CV
Échant. 1	3,18	2,9	3,69	5,2	3,02	2,4	3,30	9,8
Échant. 2	1,31	1,7	2,32	3,0	2,07	1,0	1,90	24,0
Échant. 3	2,21	3,2	2,34	6,2	1,98	3,6	2,17	8,3
Échant. 4	1,14	6,6	1,19	8,5	0,99	6,0	1,11	10,5
Échant. 5	0,27	3,0	0,36	28,3	0,29	22,3	0,30	23,6
Échant. 6	0,28	0,6	0,28	5,4	0,22	9,3	0,26	12,7
CN	0,13	11,8	0,15	15,7	0,30	7,3	0,19	43,0
CP	2,15	0,9	2,51	3,7	2,11	2,7	2,26	8,9

3. Réactivité croisée

Pour étudier le potentiel de réactions positives dues aux anticorps à réactivité croisée, vingt-quatre échantillons qui étaient réactifs IgM pour divers anticorps viraux (EBV-EA, EBV-VCA, CMV et rubéole) ont été dosés avec le système de test ZEUS ELISA IgM anti-VHS-1 et VHS-2. Dix-huit sur vingt-quatre (18/24) présentaient une activité IgM anti-VHS-1 et/ou VHS-2 négative et six sur vingt-quatre (6/24) étaient positifs. En ce qui concerne les échantillons positifs, quatre étaient issus du groupe EBV-VCA et deux du groupe CMV. Un test d'immunofluorescence a été effectué sur les échantillons positifs pour confirmer leur réactivité avec VHS-1 et VHS-2. Un seul (issu du groupe EBV-VCA) s'est révélé positif par cette méthode.

RÉFÉRENCES

- Nahmias AJ and Roizman BR: Infection with Herpes Simplex viruses 1 and 2. New Eng. J. Med. 289:667, 719, 781, 1983.
- Lycke E and Jeansson S: Herpesviridae: Herpes Simplex virus. In: EH Lennett, P Halonen and FA Murphy, eds., Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases: Principles and Practice, Vol II, Viral, Rickettsial and Chlamydial Diseases, Springer-Verlag. Berlin, pp 211, 1988.
- Nahmias AJ, Dannenberg J, Wickliffe C, and Muther J: Clinical aspects of infection with Herpes Simplex viruses I and II. In: AJ Nahmias, WR Dowdle and RF Schinazi, eds., The Human Viruses, and Interdisciplinary Perspective, Elsevier/North - Holland Publishing Co., New York, pp 2, 1980.
- Drew WL and Rawls WE: Herpes Simplex viruses, In: EH Lennette, A Balows, WJ Hausler and HJ Shadomy, eds., Manual of Clinical Microbiology, 4th ed., American Society for Microbiology, Washington, DC, pp 705, 1985.
- Whitley RJ and Hutto C: Neonatal Herpes Simplex virus infections. Ped. Rev. 7:119, 1985.
- Denoyel Ga, Gaspar A, and Novyrigat C: Enzyme immunoassay for measurement of antibodies to Herpes Simplex virus infection: Comparison of complement fixation, immunofluorescent-antibody, and neutralization techniques. J. Clin. Micro. 11:114-119, 1980.
- Nahmias AJ, Josey WE, Naib AZ, Luce CF, and Duffey A: Antibodies to Herpes virus hominis types 1 and 2 in humans. I. Patients with genital herpes 2 infections. Am. J. epidem. 91:539, 1970.
- Rawls We, Gardner HL, Flanders RW, Lowry SP, Kaufman RH, and Melnick JL: Genital herpes in two social groups. Am. J. Obstet. Gynecol. 110:682, 1971.
- McClung H, Seth P, and Rawls WE: Relative concentrations in human sera of antibodies to cross-reacting and specific antigens of Herpes Simplex virus types 1 and 2. Am. J. Epidem. 104:192, 1976.
- Engvall E, and Perlman P: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Quantitative assay of immunoglobulin G. Immunochem. 8:874, 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, 1972.
- Voller A, Bartlett A, and Bidwell DE: Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. J. Clin. Path. 31:507, 1978.
- Cremer NE, Cossen CK, Hanen CV, and Shell GR: Evaluation and reporting of enzyme immunoassay determinations of antibody to Herpes Simplex virus in sera and cerebrospinal fluid. J. Clin. Micro. 15:815, 1982.
- Gilman SC, and Docherty JJ: Detection of antibodies specific for herpes Simplex virus in human sera enzyme-linked immunosorbent assay. J. Infect. Dis. 136:5286, 1977.
- Fraser KB, Shirodaria PV, and Stanford CF: Fluorescent staining and human IgM. Salonen E-M, Vaheri A, Suni J, and Wager O: Rheumatoid factor in acute viral infections: Interference with determination of IgM, IgG and IgA antibodies in an enzyme immunoassay. J. Infect. Dis. 142:250-255, 1980.
- Pyndiah N, Krech U, Price P, and Wilhelm J: Simplified chromatography separation of immunoglobulin M from G and its application to Toxoplasma indirect immunofluorescence. J. Clin. Micro. 9:170-174, 1979.
- Sumaya CV, Ench Y, and Pope RM: Improved test for IgM antibody to Epstein-Barr virus using an absorption step with Staphylococcus aureus. J. Infect. Dis. 146, 518-523, 1982.
- Johnson RB, and Libby R: Separation of immunoglobulin M (IgM) essentially free of IgG from serum for use in systems requiring assay of IgM-type antibodies without interference from rheumatoid factor. J. Clin. Micro. 12:451-454, 1980.
- Joassin L, and Reginster M: Elimination of nonspecific cytomegalovirus immunoglobulin M activities in enzyme-linked immunosorbent assay by using antihuman immunoglobulin G. J. Clin. Micro. 23:576-581, 1984.
- Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture. Third Edition: Approved Standard (1991). Published by National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens: NCCLS H18-A, 1999.
- Charnesky MA, Ray CG and Smith TF: Laboratory diagnosis of viral infections. Cumitech 15, American Society for Microbiology, Washington, DC, 1982.
- U.S. Department of Labor (OSHA): Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens. Final Rule. 21CFR 1910.1030.
- 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

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
Système de test IgM VHS-1 et VHS-2

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 Tous droits réservés.



EMERGO EUROPE
Westervoortsedijk 60
6827 AT Arnhem
The Netherlands