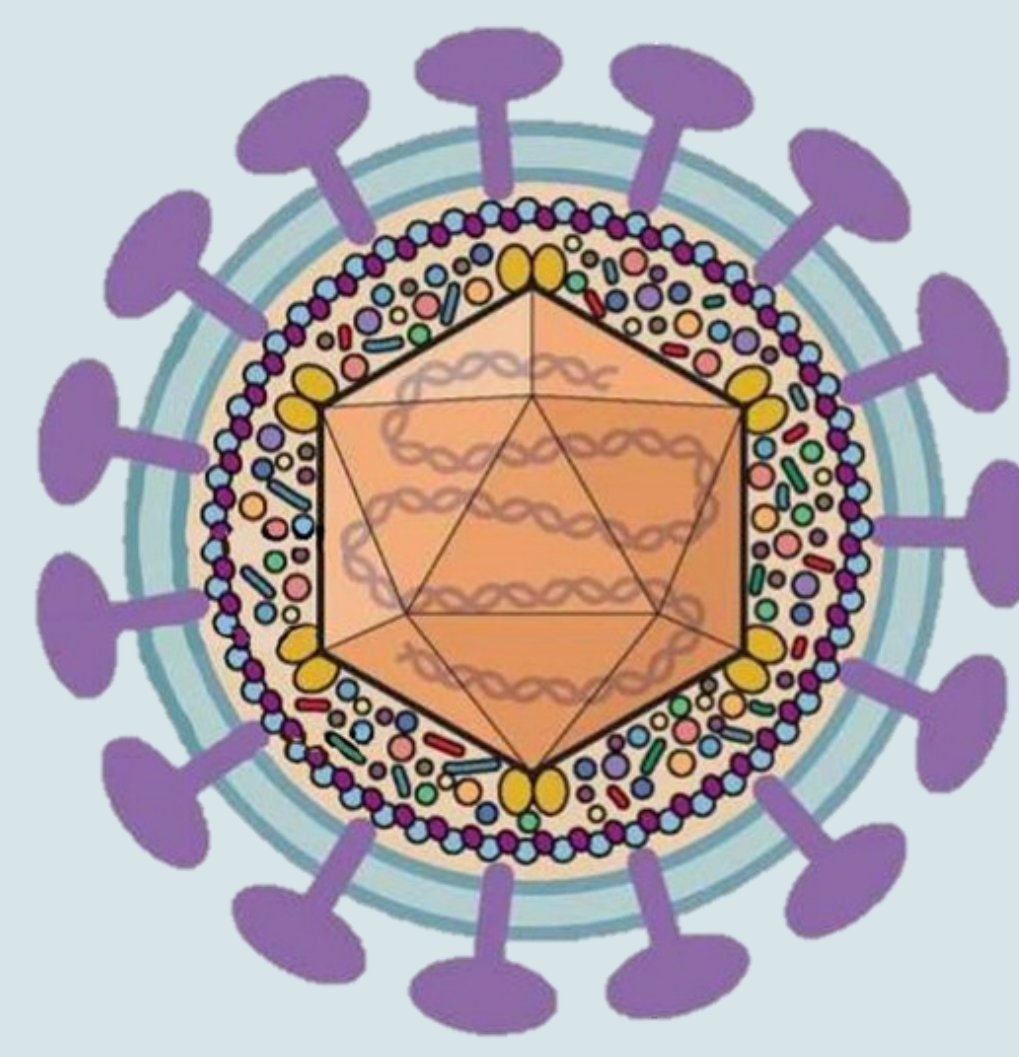


Validatie van Herpes simplex virus antistofbepaling op EUROIMMUN Analyzer-I

V. Coelst, G. Gysembergt, ing. E. Houben, Dr. Els Keyaerts, prof. apr. klin. biol. K. Lagrou

Laboratorium Infectieuze Serologie, UZ Leuven



Inleiding

Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) en type 2 (HSV-2) zijn twee van de meest prevalentie humane virussen. HSV-1 en 2 Immunoglobuline G en M (IgG en IgM) concentraties kunnen bepaald worden aan de hand van immunoassays, zoals indirecte enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) (1).

De automatisatie van EUROIMMUN HSV-1/2 pool IgG en IgM assays op de EUROIMMUN Analyzers I (EA-I) wordt geëvalueerd om in de routine toe te passen. Performantie van deze test wordt nagegaan met een methodevergelijking, een beoordeling van de juistheid en de precisie.

Materialen en methode

Validatieonderdelen en acceptatiecriteria

Methodevergelijking: Left-over serum patiënten stalen (n=41) met gekende resultaten werden geanalyseerd op de EA-I volgens testinstructies. Stalen (n=5) met Epstein barr virus (EBV) positieve IgM, 5 stalen met IgM positieve cytomegalovirus (CMV) stalen werden op dezelfde manier getest. Bij concordante resultaten komen de recente waarde overeen met de oude.

Juistheid: Resultaten van deelname aan extern kwaliteitsprogramma moeten overeenkomen met gekende resultaten uit INSTAND EKE rapporten (2).

Precisie: Stalen met overeenkomende recente en oude resultaten werden geselecteerd om pools te maken. Voor IgG en IgM werden in duplo gedurende 5 dagen 3 ranges getest. IgG ranges zijn 140 tot 160 RU/ml, 90 tot 115 RU/ml en 4 tot 6 RU/ml. IgM ranges zijn ratios 2.20 tot 3.00, 1.20 tot 1.90 en 0.30 tot 0.80. Volgens Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI)-EP5 richtlijnen werden de within-run (CV_{wr}) en de totale variatiecoëfficiënt (CV_{tot}) berekend (3). De CV_{tot} IgG en IgM moeten lager liggen dan de intra-assay CV gegeven in de kitinstructies.

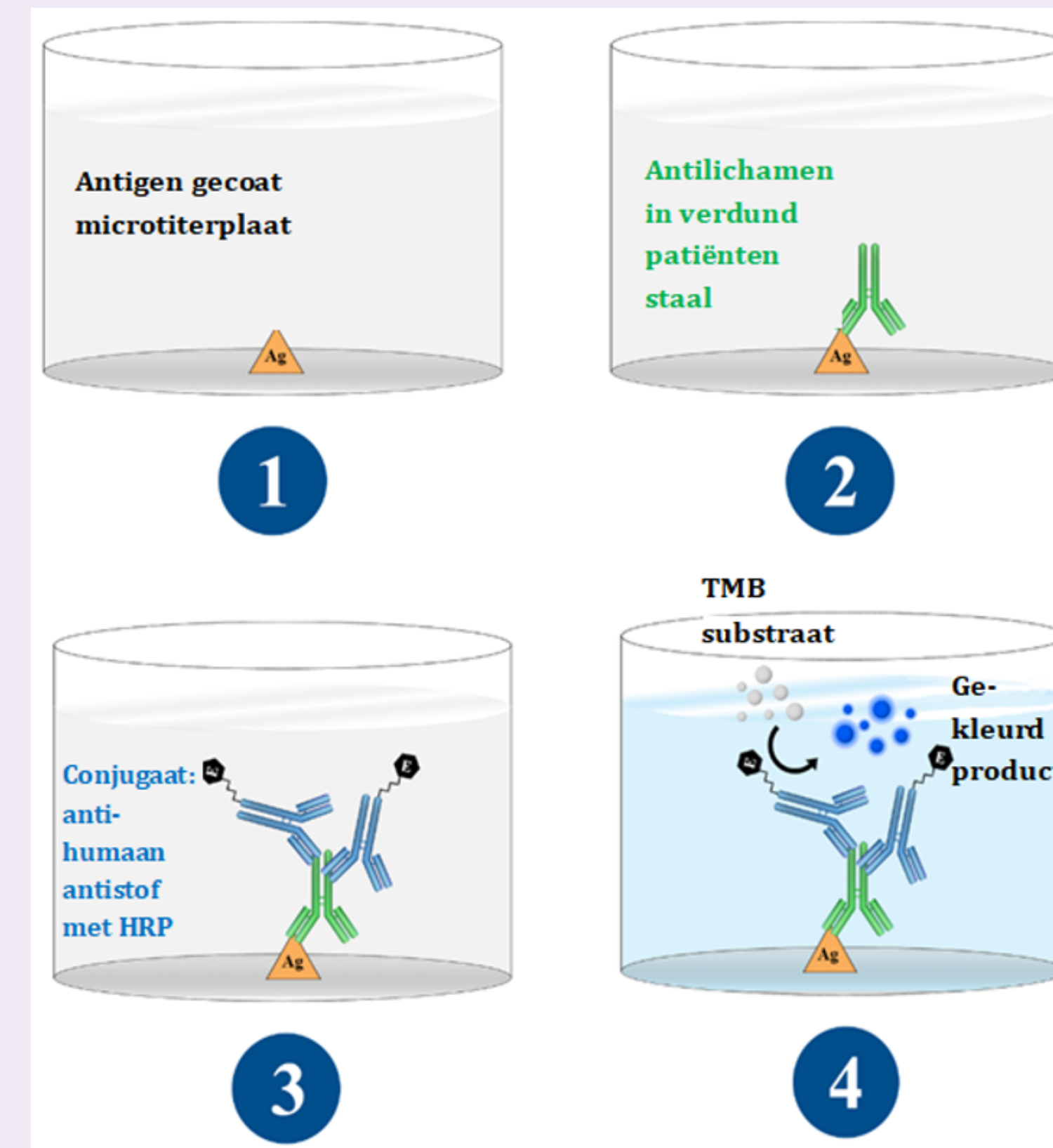
Analyse

Elke analyse werd volledig en automatisch uitgevoerd met de EUROIMMUN Anti HSV 1/2 pool IgG en IgM testkits op EA-I toestel (figuur 1). Alle reagentia zijn aanwezig in de testkits. Alle ELISA analyses werden uitgevoerd volgens testinstructie. De microtiter wells zijn gecoat met HSV-1/2 pool IgG of IgM antigenen (Ag'en) te



Figuur 1 EUROIMMUN ANALYZER-I toestel (4)

zien in stap 1 figuur 2. Stalen worden 1/101 verdund en toegevoegd in de wells. Als het staal positief is zullen antilichamen (Ab) binden aan de gecoate Ag (stap 2). Stap 3 toont toegevoegde enzym gelabelde Ab in het conjugaat gebonden aan staal Ab. Tetramethylbenzidine (TMB) substraat wordt toegevoegd en reageert met horseradish peroxidase (HRP) wat een kleurreactie veroorzaakt in stap 4. De bekomen kleur werd fotometrisch gemeten op 450nm.



Figuur 2 Schematische weergave van indirecte ELISA volgens de bijsluiter (5)

Resultaten en Discussie

Methodevergelijking

Na de methodevergelijking werden alle IgG resultaten klinisch concordant gevonden, te zien in tabel 1. De specificiteit en sensitiviteit bedragen 100%. Dit kan te wijten zijn aan de grootte van de data.

Tabel 1 Resultaten IgG recente vergeleken met oude en concordantie

Recente data	Oude data	
	Pos	Neg
Pos	11	0
Neg	0	9

Voor IgM werden 82% van de data concordant gevonden, weergegeven in tabel 2. De specificiteit bedraagt 100% en de sensitiviteit 33%. Lage sensitiviteit kan zijn door een verschil in cut-off waardes.

Tabel 2 IgM recente en oude resultaten concordantie

Recente data	Oude Data	
	Pos	Neg
Pos	2	4
Neg	0	16

Van de 5 stalen positief voor EBV werden voor 3 stalen data bekomen dat wel overeenkomt met oude data. Voor CMV waren dit 4 stalen. Dit zijn ge-

deeltelijke concordante resultaten en toont dat kruisreactiviteit voor HSV IgM niet uit gesloten kan worden.

Juistheid

De resultaten van de testen gerund op de EKE stalen worden hier naast getoond in tabel 3. Voor de drie stalen komen de resultaten voor de overeen met de data in de EKE rapporten. De accuraatheid voldoet aan het criterium. EKE's worden periodiek opgestuurd en getest door erkende laboratoria (2).

Tabel 3 Juistheid resultaten van EKE stalen vergeleken met EKE rapporten

Staal	EUROIMMUN Anti HSV 1/2 IgG en IgM	
	IgG	IgM
EKE 1	+	-
EKE 2	-	-
EKE 3	+	-

Precisie

In tabel 4 worden de resultaten van de precisie weergegeven. Over het algemeen liggen de CV waarden voor IgG lager dan voor IgM. De IgG intra-assay CV is 12% en voor IgM 10.4%. Alle IgG CV_{tot} liggen onder de intra-assay CV. Voor de lage IgM range ligt de CV_{tot} hoger dan de intra-assay CV. Dit is te verklaren door een precisie run waarvan de data laag liggen. IgM en IgG precisie worden ook geaccepteerd.

Tabel 4 Resultaten van de precisie voor HSV 1/2 IgG en IgM in %

Range	HSV 1/2 IgG			HSV 1/2 IgM		
	Hoge	Midden	Lage	Hoge	Midden	Lage
CV_{tot}	2.90	5.60	4.61	8.20	11.45	23.46
CV_{wr}	1.79	4.23	5.50	4.29	7.76	6.88

Conclusie

De methodevergelijking toont dat de specificiteit voor IgG en IgM goed ligt. De sensitiviteit van IgG ligt goed en van IgM kan dit beter. Kruisreactiviteit kan niet uitgesloten worden. Uit de resultaten is te concluderen dat de assays ook accuraat en precies zijn waardoor deze analyse toegepast kan worden in de routine.

Om over de kwaliteit van de analyse te waken zal er deelgenomen worden aan externe kwaliteits programma's. De medisch laboratorium technologen zullen de interne controles bijhouden en evalueren met eventuele aanpassingen als gevolg.

Referenties

1. Arama V, Cercel AS, Vladareanu R, Mihai C, Mihailescu R, Rankin J, et al. Type-specific herpes simplex virus-1 and herpes simplex virus-2 seroprevalence in Romania: Comparison of prevalence and risk factors in women and men. *International Journal of Infectious Diseases*. 2010;14(2):14.
2. Wojtalewicz N, Schellenberg I, Hunfeld K-P. Evaluation of INSTAND E.V.'s external quality assessment for C-reactive protein and Procalcitonin. *PLOS ONE*. 2019;14(8).
3. Ramakers C, Westerhuis LWJM, Triepels RH, Van den Berg GB. Een csi-EP5- en -EP9-Validatie van een kleinformat ... - NVKC [Internet]. *Nederlands Tijdschrift Klinische Chemie Labgeneeskunde*. 2010 [cited 2023Jan18]. Available from: <https://www.nvkc.nl/sites/default/files/NTKG/2010-1-p45-49.pdf>
4. Analyzer1.
5. What is an Indirect ELISA? | AAT Bioquest [Internet]. www.aatbio.com/resources/faq-frequently-asked-questions/What-is-an-Indirect-ELISA-1 [Internet]. *Diagnostics*. 2019 [cited 2023Jan18]. Available from: <https://www.biogost.be/diagnostics/nl/solution/automatisatie/elisa/analyzer-1/>