

Validatie van Hepatitis E Virus antistofbepaling op EA-I

D. Ceysens, G. Gysembergt, ing. E. Houben, prof. apr. klin. biol. K. Lagrou

UZ Leuven: Laboratoriumgeneeskunde, Infectieuze Serologie

Inleiding

Het Hepatitis E Virus (HEV) met vier verschillende genotypen behoort tot de familie van *hepeviridae* virussen. Genotype 3 is meest prevalent in Europa en vertoont een ziektebeeld gelijkaardig met hepatitis A virus. Een manier van HEV detectie is het opsporen van HEV Immunoglobuline (Ig) G en M via een indirecte sandwich Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) [1].

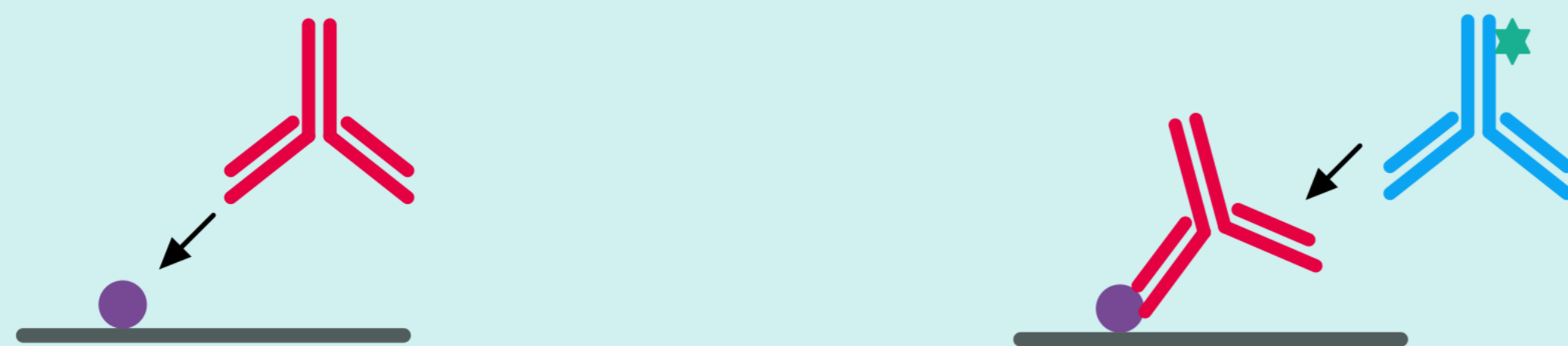
Wegens overschakeling van het huidige toestel BEPIII naar twee nieuwe EUROIMMUN Analyzers I (EA-I) is een toestelvalidatie vereist alvorens de routinestalen mogen geanalyseerd worden op EA-I. Deze validatie bevat een toestelvergelijking van de BEPIII met beide EA-I, een evaluatie van de accuraatheid, precisie en assaydrift.

Materiaal en Methoden

Testkit en Analyse

Alle analyses werden uitgevoerd met de Mikrogen Diagnostic – *RecomWell* HEV IgG of IgM testkit. Dit zijn 2 verschillende testkits maar worden steeds tezamen geanalyseerd wegens de parallele aanvraag van IgG en IgM per staal. De volledige indirecte sandwich ELISA werd uitgevoerd door de EA-I volgens de procedure beschreven in de bijsluiters (schematische weergave in figuur 1). Zowel de reagentia als de controles zijn kant en klaar aanwezig in de testkit. Enkel het conjugaat moet verdund worden vlak voor uitvoering van de analyse [2]. Voor elk onderdeel van de validatie zijn beoordelingscriteria opgesteld. Deze criteria met bijhorende stalen staan onder 'beoordelingscriteria en stalen'.

Indirecte sandwich ELISA



1) Recombinante HEV antigenen zijn gebonden aan vaste fase (microtiterplaat). Verdunde serumstalen worden toegevoegd.

2) Toevoegen van conjugaat: horseradish peroxidase gelabelde anti-humane antistof.

3) Kleurreactie door toevoeging van tetramethylbenzidine chromogeen substraat.

4) Reactie wordt stopgezet door fosforzuur. Extinctie aflezen op 450nm.

Figuur 1 Schematische weergave van de indirecte sandwich ELISA volgens het protocol van de test. (Notability, eigen werk)

Beoordelingscriteria en Stalen

Toestelvergelijking: Historische HEV serumstalen (n=30) en HEV routine stalen (n=37), concentratie bepaald met BEPIII, worden geanalyseerd op EA-I zoals beschreven in de bijsluiters. Er wordt een Deming regressie met volgende beoordelingscriteria opgesteld: $r^2 > 0,85$ en $0,80 \leq \text{helling} \leq 1,20$.

Accuraatheid: Historische externe kwaliteitsevaluatie (EKE) stalen (n=3) moeten kwalitatief overeenkomen met EKE rapport van desbetreffende test

Precisie: Gepoolde stalen in drie ranges, laag (10-20 U/ml), medium (30-50 U/ml) en hoog (90-110 U/ml), worden 5 dagen in duplo geanalyseerd zoals beschreven in de bijsluiters van de test. De withinrun (wr) en totale (tot) CV worden berekend en moeten voldoen aan $CV_{\text{totaal, EA-I}} \leq CV_{\text{BEPIII}}$.

Assaydrift: Analyse van 3 opeenvolgende iQC stalen vooraan en achteraan de microtiterplaat. Het gemiddeld resultaat $_{iQC, \text{well, laatste}}$ moet binnen de range van resultaat $_{iQC, \text{well, eerste}} \pm 3,5SD_{EA-I}$ liggen.

Resultaten en Discussie

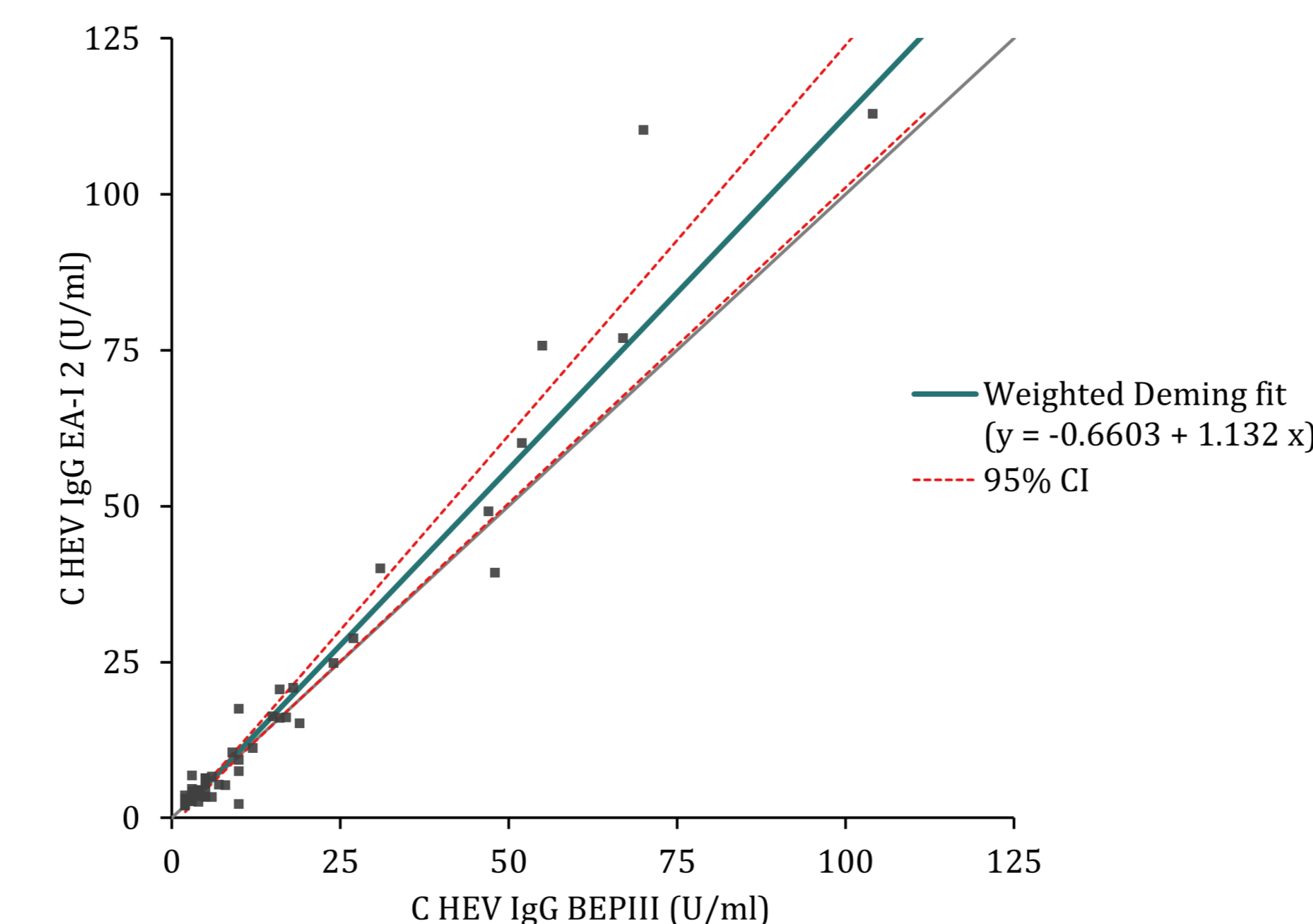
Toestelvergelijking

De resultaten van de Deming regressie zijn hieronder in tabel 1 weergegeven. Zowel de helling als de r^2 valt binnen de range van de beoordelingscriteria. Dit betekent dat de waarden van de 3 toestellen overeenkomen

Tabel 1 Resultaten van de toestelvergelijking: helling en r^2 van de Deming regressie

x-as / y-as	IgG		IgM	
	helling	r^2	helling	r^2
BEPIII / EA-I1	0,99	0,97	0,99	0,95
BEPIII / EA-I2	0,99	0,96	1,13	0,97
EA-I1 / EA-I2	1,02	0,99	1,16	0,99
EA-I2 / EA-I1	0,98	0,99	0,86	0,99

Figuur 2 toont de Deming regressie van HEV IgM van EA-I2 met BEPIII. De andere regressies van de toestelvergelijking zijn analoog opgesteld.



Figuur 2 Deming regressie voor concentratie HEV IgM (U/ml) van EA-I 2 in functie van BEPIII (Analyse-it versie 5.65.3, eigen werk)

Not 95% CI staat voor het betrouwbaarheidsinterval van 2SD.

Accuraatheid

De resultaten van de EKE-analyse op de EA-I kwamen overeen met het EKE rapport van desbetreffend staal. Bijgevolg waren er geen problemen met de kwaliteit van de laboratoriumanalyse noch het toestel.

Tabel 2 Resultaten van EKE stalen van EA-I toestel 1 en 2 met bijhorende EKE rapport

Staal	IgG			IgM		
	EA-I 1	EA-I 2	EKE rapport	EA-I 1	EA-I 2	EKE rapport
EKE 1	Positief	Positief	Positief	Negatief	Negatief	Negatief
EKE 2	Negatief	Negatief	Negatief	Negatief	Negatief	Negatief
EKE 3	Positief	Positief	Positief	Positief	Positief	Positief

Precisie

Wegens technische problemen zijn slechts drie precisie analyses uitgevoerd. De resultaten van de CV_{wr} en CV_{tot} staan opgelijst in tabel 3. De CV_{tot} van BEPIII is 15,3% (IgG) en 12,7% (IgM). Gebaseerd op deze resultaten is de grootste CV_{tot} van de EA-I nog steeds kleiner dan deze van BEPIII.

Tabel 3 Resultaten van de precisie.

Range	HEV IgG			HEV IgM		
	Laag	Medium	Hoog	Laag	Medium	Hoog
CV_{wr} (%)	3,55	5,27	2,86	6,44	4,05	4,19
CV_{tot} (%)	11,4	7,23	5,35	7,27	5,15	3,05

Assaydrift

Resultaten in tabel 4 tonen aan dat geen assaydrift aanwezig is. De gemiddelde $iQC_{\text{well, laatste}}$ ligt binnen de range van gemiddelde $iQC_{\text{well, laatste}} \pm 3,5SD_{EA-I}$.

Tabel 4 Resultaten assaydrift van EA-I toestel 1 en 2.

	EA-I1		EA-I2	
	IgG	IgM	IgG	IgM
Gem $iQC_{\text{well, begin}}$	65,0	98,8	76,73	108,93
SD_{EA-I}	5,38	3,36	5,38	3,36
Range $3,5SD_{EA-I}$	[46,20 - 83,86]	[87,00 - 110,55]	[57,90 - 95,56]	[97,15 - 120,70]
Gem $iQC_{\text{well, laatste}}$	78,38	107,22	79,65	115,66

Conclusie

Voor de validatie van HEV antistofbepaling op de EA-I werd een toestelvergelijking, accuraatheid, precisie en assaydrift analyse uitgevoerd. De resultaten liggen in lijn met de beoordelingscriteria. Echter is de validatie van HEV antistoffen op de EA-I nog niet volledig afgerond wegens het ontbreken van een volledige precisie. De volgende stap is het uitvoeren van een nieuwe precisie analyse waarmee de validatie van HEV antistofbepaling op de EA-I afgerond kan worden. De Mikrogen Diagnostic – *RecomWell* HEV IgG en IgM assay zal na afronding van precisie geïmplementeerd worden op EA-I.

Referenties

- Kamar N, Bendall R, Legrand-Abrevanel F, Xia N-S, Ijaz S, Izopet J, Phill HRD. Hepatitis E. Lancet. 2012;379(9835):370.
- Diagnostik M. recomWell HEV IgG/IgM. Neuried Germany 2016. p. 4.
- Figuur linksboven: art SSM. Hepatitis Virus. LES LABORATOIRES SERVIER, SAS.
- Tabellen en overige figuren (1 en 2): eigen werk