

**ELISA Anti-SARS-CoV-2 (IgG)
Mode d'emploi****Réservé au diagnostic in vitro** 

REFERENCE	ANTICORPS ANTI-	CLASSE D'IG	SUBSTRAT	FORMAT
EI 2606-9601 G	SARS-coronavirus-2 (SARS-CoV-2)	IgG	Puits de microplaque coatés avec l'Ag	96 x 01 (96)

**Utilisation prévue**

Le test ELISA EUROIMMUN Anti-SARS-CoV-2 (IgG) est un dosage immuno-enzymatique destiné à la détermination qualitative in vitro des anticorps humains d'immunoglobuline de classe IgG dirigés contre le SARS-CoV-2 dans le sérum et le plasma humains (EDTA, héparine ou citrate) dans la population générale.

- Le test doit être utilisé en conjonction avec la stratégie de test définie par les autorités de santé publique en charge.
- Des résultats négatifs n'excluent pas l'infection par le SARS-CoV-2 et ne doivent pas être utilisés comme seule base pour les décisions de prise en charge des patients.
- Des résultats faussement positifs pour les anticorps IgG peuvent survenir en raison de la réactivité croisée des anticorps préexistants ou d'autres causes possibles.
- Le test peut également détecter une réponse à la vaccination contre le SARS-CoV-2.
- Ce test n'est pas destiné à être utilisé pour le dépistage des patients ou comme aide au diagnostic des patients soupçonnés d'être atteints d'une infection par la COVID-19.
- Ce test n'est pas destiné aux tests à domicile (ou à l'autotest).
- Les résultats négatifs doivent être combinés avec les observations cliniques, les antécédents du patient et les informations épidémiologiques.
- Des résultats faussement négatifs peuvent se produire chez les personnes âgées et les patients immunocompromis.

Signification clinique

Le coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère (SARS-CoV-2, précédemment appelé 2019-nCoV) appartient à la famille des coronavirus et, comme le SARS-CoV, est classé dans le genre des *Bétacoronavirus* [1]. Le nouveau coronavirus est apparu en Chine dans la ville de Wuhan, dans la province de Hubei. Il a provoqué une vague d'infection, qui s'est rapidement propagée dans le pays et dans le monde entier [2, 3]. Quelques jours seulement après le premier signalement de patients atteints de pneumonie d'origine incertaine, l'agent pathogène responsable a été identifié comme étant le SARS-CoV-2 [2-5].

Le SARS-CoV-2 est principalement transmis par des gouttelettes lors de la toux ou des éternuements et par contact étroit avec des personnes infectées [2-4, 6]. Le personnel de santé et les membres de la famille sont particulièrement exposés au risque d'infection [6, 7]. Le réservoir zoonotique du virus semble être les chauves-souris [2, 4, 6].

La durée d'incubation du SARS-CoV est de trois à sept jours, avec un maximum de 14 jours [2]. Les symptômes de l'infection par le SARS-CoV-2 sont la fièvre, la toux, les difficultés respiratoires et la fatigue [2-4, 6]. Chez la plupart des patients, l'infection se manifeste par des symptômes d'une maladie fébrile légère avec des infiltrations pulmonaires irrégulières. Certains patients, en particulier les personnes âgées ou les malades chroniques, développent un syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) [2, 3, 5, 6]. Le taux de mortalité est compris entre 0,6% et 7,2%, selon les pays [5]. En février 2020, la maladie causée par SARS-CoV-2 a été nommée COVID-19 par l'OMS.



Les méthodes appropriées pour le diagnostic des infections par le SARS-CoV-2 sont la détection de l'ARN viral par réaction de polymérisation en chaîne par transcriptase inverse (RT-PCR) ou de la protéine virale par ELISA, principalement dans des échantillons des voies respiratoires supérieures (frottis nasopharyngé ou oropharyngé) ou inférieures (liquide de lavage broncho-alvéolaire, sécrétion trachéale, expectorations, sécrétion nasopharyngée, sécrétion oropharyngée, etc). La détermination des anticorps permet de confirmer l'infection par le SARS-CoV-2 chez les patients présentant des symptômes typiques et dans les cas suspects. Elle contribue également à la surveillance et au contrôle des épidémies [4, 5]. Pour obtenir des résultats sérologiques significatifs, deux échantillons de patients doivent être analysés, l'un provenant de la phase aiguë (semaine 1 de la maladie) et l'autre de la phase de convalescence (3 à 4 semaines plus tard) [4, 8, 9].

Des réactions croisées avec des anticorps issus du genre *Bêta*coronavirus ont été décrites [4, 5]. Actuellement, il n'existe aucun médicament ou vaccin disponible contre l'infection par ce nouveau virus [2, 7].

Antigènes

Les puits sont coâtés avec le domaine S1 de la protéine de spicule de SARS-CoV-2 exprimé de manière recombinante dans la lignée cellulaire humaine HEK293.

Principe du test

Le coffret contient des barrettes de microplaque de 8 puits sécables, coâtés avec recombinant de la protéine de spicule de SARS-CoV-2. Dans la première étape de la réaction, les échantillons patients dilués sont incubés dans les puits. Dans le cas d'échantillons positifs, les anticorps spécifiques de classe IgG (mais aussi IgA et IgM) se fixent sur les antigènes. Pour détecter les anticorps fixés, une seconde incubation est réalisée en utilisant un anticorps anti-IgG humaine couplé à une enzyme (conjugué enzymatique) catalysant une réaction colorée.

Composition du coffret

Composants	Couleur	Format	Symbole
1. Puits de microplaque coâtés avec les antigènes 12 barrettes de microplaque contenant chacune 8 puits sécables sur un support, prêts à l'emploi	---	12 x 8	
2. Calibrateur (IgG, humain), prêt à l'emploi	rouge foncé	1 x 2,0 ml	
3. Contrôle positif (IgG, humain), prêt à l'emploi	bleu	1 x 2,0 ml	
4. Contrôle négatif (IgG, humain), prêt à l'emploi	vert	1 x 2,0 ml	
5. Conjugué enzymatique anti-IgG humaine couplé à la peroxydase, prêt à l'emploi	vert	1 x 12 ml	
6. Tampon échantillon 0,09% d'azide de sodium, prêt à l'emploi	bleu clair	1 x 100 ml	
7. Tampon de lavage concentré 10x	incolore	1 x 100 ml	
8. Solution de chromogène/substrat TMB/H ₂ O ₂ , prête à l'emploi	incolore	1 x 12 ml	
9. Solution d'arrêt acide sulfurique 0,5 M, prête à l'emploi	incolore	1 x 12 ml	
10. Film de protection	-	3 pièces	
11. Certificat de contrôle qualité	-	1 protocole	-
12. Mode d'emploi	-	1 livret	-





8. WHO: **Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases. Interim guidance**, 17 January 2020
9. Okba NMA, Müller MA, Li W, Wang C, Geurts van Kessel CH, Corman VM, et al. **Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2-Specific Antibody Responses in Coronavirus Disease 2019 Patients**. Emerg Infect Dis. 2020; 26(7)
10. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DKW, et al. **Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR**. Euro Surveill. 2020; 25(3): pii=2000045

Support technique

En cas de problèmes techniques, vous pouvez obtenir de l'aide via le site web d'EUROIMMUN (www.euroimmun.com/contact).

Signification des symboles

Symbole	Signification	Symbole	Signification
	Barrettes de microplaque		Numéro de lot
	Calibrateur		Protéger de la lumière du soleil
	Contrôle positif		Température de conservation
	Contrôle négatif		Non ouvert, utilisable jusqu'à (AAAA-MM-JJ)
	Conjugué		Marquage CE
	Tampon échantillon		Date de fabrication (AAAA-MM-JJ)
	Tampon de lavage, concentré 10x		Fabricant
	Substrat		Respecter le mode d'emploi
	Solution d'arrêt		Référence
	Film de protection		Contenu suffisant pour <n> analyses
	Dispositif médical de diagnostic in vitro		Risques biologiques



Matériel et équipement supplémentaire (non fourni dans le coffret)

- Laveur automatique de microplaques: recommandé. Le lavage des microplaques peut également être effectué manuellement
- Lecteur de microplaques: longueur d'onde de 450 nm, gamme de longueurs d'onde de référence de 620 nm à 650 nm
- Pipettes étalonnées
- Cônes de pipette
- Pipette à répétition: recommandée pour le pipetage du conjugué enzymatique, du substrat et de la solution d'arrêt
- Eau distillée ou déionisée
- Incubateur: pour l'incubation de la microplaque à +37°C
- Incubateur ou bain-marie: recommandé pour réchauffer le tampon de lavage
- Minuteur

Conservation et stabilité

Le coffret doit être conservé à une température comprise entre +2°C et +8°C, ne pas congeler. Non ouverts, tous les composants du coffret sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée.

Stabilité d'utilisation après la première ouverture

Après ouverture, les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée lorsqu'ils sont conservés entre +2°C et +8°C et protégés de toute contamination, sauf s'il est stipulé autrement ci-dessous.

Avertissements et précautions

- Le produit ne doit être utilisé que par du personnel de laboratoire qualifié dans un laboratoire clinique ou de recherche.
- Ne pas utiliser le coffret si les réactifs emballés sont visiblement endommagés.
- Lire attentivement le mode d'emploi avant d'utiliser le produit. Utilisez uniquement la version valide fournie avec le produit.
- Ne pas remplacer ou mélanger les réactifs EUROIMMUN avec des réactifs d'autres fabricants.
- Respecter les Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL) et les consignes de sécurité. Certains réactifs contiennent des agents de conservation à des concentrations non déclarables. Éviter tout contact des yeux et de la peau avec les échantillons et les réactifs. En cas de contact avec les yeux ou la peau, rincer abondamment à l'eau. Enlever et laver les vêtements contaminés. En cas d'ingestion, consulter un médecin.
- Le calibrateur et les contrôles d'origine humaine ont été trouvés négatifs pour HBsAg, anti-VHC, anti-VIH-1 et anti-VIH-2. Néanmoins, tous les réactifs doivent être traités comme un risque potentiel d'infection et doivent être manipulés avec précaution.

Préparation et stabilité des échantillons

- **Echantillons:** Sérum humain ou plasma (EDTA, héparine ou citrate).
- **Préparation de l'échantillon:** Les **échantillons patients** sont dilués au **1:101** dans le tampon échantillon.

Par exemple: Diluer 10 µl de sérum dans 1,0 ml de tampon échantillon et bien mélanger au vortex (le mélange d'échantillon à la pipette n'est pas adapté)



- **Stabilité des échantillons patients:**

- conservés entre +2°C et +8°C: jusqu'à 14 jours
- incuber les échantillons dilués le jour même

Préparation et stabilité des réactifs

Remarque: Tous les réactifs doivent être placés à température ambiante (+18°C à +25°C) environ 30 minutes avant utilisation.

Le thermostat de l'incubateur ELISA doit être ajusté à +37°C ± 1°C.

- **Puits coatés:** Prêts à l'emploi. Déchirer l'emballage de protection refermable de la microplaque au niveau des encoches situées au-dessus de la fermeture rapide. Ne pas ouvrir avant que la microplaque n'ait atteint la température ambiante afin d'éviter toute humidification des barrettes. Replacer immédiatement les puits restants d'une microplaque partiellement utilisée dans l'emballage de protection et sceller hermétiquement avec la fermeture zip intégrée (ne pas retirer le sachet anti-humidité). Une fois que l'emballage protecteur a été ouvert pour la première fois, les puits coatés avec les antigènes peuvent être conservés dans un endroit sec et à une température comprise entre +2°C et +8°C pendant 4 mois.
- **Calibrateur et contrôles:** Prêts à l'emploi. Bien mélanger les réactifs avant emploi.
- **Conjugué enzymatique:** Prêt à l'emploi. Bien mélanger le réactif avant emploi.
- **Tampon échantillon:** Prêt à l'emploi.
- **Tampon de lavage:** Le tampon de lavage est concentré 10x. Si une cristallisation apparaît dans le flacon de tampon concentré, le chauffer à +37°C et bien mélanger avant de le diluer. La quantité requise doit être prélevée du flacon avec une pipette propre, et diluée 1:10 avec de l'eau distillée ou déionisée (1 volume de réactif plus 9 volumes d'eau). Par exemple: Pour 1 barrette de microplaque, utiliser 5 ml de tampon concentré plus 45 ml d'eau. Le tampon de lavage à la concentration de travail est stable pendant 4 semaines s'il est conservé entre +2°C et +8°C et correctement manipulé.
- **Solution de chromogène/substrat:** Prête à l'emploi. Fermer le flacon immédiatement après usage, le contenu étant sensible à la lumière. La solution de chromogène/substrat doit être limpide au moment de l'utilisation. Ne pas utiliser la solution si elle est colorée en bleu.
- **Solution d'arrêt:** Prête à l'emploi.

Élimination des déchets

Les échantillons patients, le calibrateur, les contrôles et les microplaques incubées doivent être manipulés comme des déchets infectieux. Tous les réactifs doivent être éliminés selon la réglementation officielle en vigueur.

Contrôle qualité

Pour toutes les séries de dosages réalisées, les valeurs de densité optique du calibrateur et les ratios déterminés pour les contrôles positif et négatif doivent se situer dans les limites fixées pour le lot de production du coffret. Un certificat de contrôle qualité contenant ces valeurs de référence est inclus. Si les valeurs spécifiées pour les contrôles ne sont pas obtenues, les résultats du test peuvent être inexacts et le dosage doit être refait.

Matériel de référence

Puisqu'il n'existe pas de sérum de référence international quantifié pour les anticorps dirigés contre SARS-CoV-2, la calibration est réalisée en ratios qui sont une mesure relative de la concentration d'anticorps dans le sérum ou le plasma.



- Un lavage insuffisant (exemple: moins de 3 cycles de lavage, volumes de tampon de lavage trop faibles ou temps de lavage trop courts) peut aboutir à des résultats de DO faussement élevés.
- Du liquide (>10 µl) restant dans les puits après le lavage peut interférer avec le substrat et générer des résultats de DO faussement faibles.
- L'adaptation partielle ou complète du test sur des appareils de traitement automatisé des échantillons ou d'autres dispositifs permettant de manipuler des produits liquides peut entraîner des différences entre les résultats obtenus par la procédure automatisée et ceux obtenus par la procédure manuelle. Il est de la responsabilité de l'utilisateur de valider les instruments utilisés afin qu'ils donnent des résultats de dosage dans la gamme de fiabilité.
- Les résultats concernent la détection des anticorps contre le SARS-CoV-2. Les anticorps IgG contre le SARS-CoV-2 deviennent détectables plus tard après l'infection. À l'heure actuelle, on ignore combien de temps les anticorps IgG peuvent persister après l'infection initiale.
- Des résultats positifs pour les IgG peuvent survenir après l'infection et peuvent être le signe d'une infection aiguë ou récente [et une réponse immunitaire réussie à un vaccin].
- La présence d'anticorps spécifiques est un signe d'une infection antérieure ou actuelle.
- Les laboratoires sont tenus de signaler tous les résultats positifs aux autorités de santé publique appropriées.
- Les interférences exogènes potentielles telles que les antibiotiques, les antiviraux, les métabolites de médicaments et les médicaments courants en vente libre n'ont pas été testés pour déterminer s'ils interfèrent avec les résultats des tests.
- Les performances de ce coffret n'ont pas été évaluées dans une population vaccinée contre la COVID-19.
- Ce test identifie les anticorps dirigés contre la protéine Spike du virus SARS-CoV-2 et ne permet donc pas de distinguer entre les personnes précédemment infectées et les personnes vaccinées.
- Les performances du coffret n'ont pas été évaluées sur des échantillons provenant de personnes ayant été infectées par de nouveaux variants émergents du SARS-CoV-2, notamment le variant britannique du SRAS-CoV-2, SARS-CoV-2 VOC 202012/01 (B.1.1.7) ou le nouveau variant sud-africain du SARS-CoV-2, 501Y.V2.
- Les études des réactions croisées avec le Rhinovirus et le hMPV ne sont pas terminées.

Bibliographie

1. Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. **The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2.** Nat Microbiol. 2020; 5(4): 536-44
2. Wang G, Jin X. **The progress of 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV) event in China.** J Med Virol. 2020; 92(5): 468-72
3. Gralinski LE, Menachery VD. **Return of the Coronavirus: 2019-nCoV.** Viruses 2020, 12(2), 135
4. Udugama B, Kadhiresan P, Kozłowski HN, Malekjahani A, Osborne M, Li VYC, et al. **Diagnosing COVID-19: The Disease and Tools for Detection.** ACS Nano. 2020 Apr 9
5. Cheng MP, Papenburg J, Desjardins M, Kanjilal S, Quach C, Libman M, et al. **Diagnostic Testing for Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus-2: A Narrative Review.** Ann Intern Med. 2020 Apr 13
6. Xiao SY, Wu Y, Liu H. **Evolving status of the 2019 novel coronavirus Infection: proposal of conventional serologic assays for disease diagnosis and infection monitoring.** J Med Virol. 2020; 1-4
7. WHO: **Clinical management of severe acute respiratory infection when novel coronavirus (2019-nCoV) infection is suspected. Interim guidance, 28 January 2020**



Évaluation	douteux = positif		douteux = négatif		sans douteux	
	Valeur	95% CI	Valeur	95% CI	Valeur	95% CI
Spécificité	99,1%	98,4% à 99,5%	99,6%	99,1% à 99,9%	99,6%	99,1% à 99,9%
Sensibilité	94,7%	86,9% à 98,5%	90,7%	81,7% à 96,2%	94,4%	86,4% à 98,5%
n	1419		1419		1409	

Spécificité: La spécificité du test ELISA Anti-SARS-CoV-2 (IgG) a été déterminée en analysant 222 échantillons de patients qui étaient positifs pour les anticorps dirigés contre d'autres coronavirus pathogènes humains, d'autres pathogènes ou pour les facteurs rhumatoïdes. En outre, 1122 échantillons de donneurs de sang, d'enfants et de femmes enceintes ont été analysés. Les échantillons avaient été prélevés avant la première apparition du SARS-CoV-2 et ne devaient pas contenir d'anticorps spécifiques du SARS-CoV-2. Les résultats se situant dans la zone douteuse (n = 7) n'ont pas été pris en compte dans le calcul. La spécificité du test ELISA Anti-SARS-CoV-2 (IgG) s'élevait à 99,6%.

Panel d'échantillons	n	EUROIMMUN Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG
		Spécificité
Anticorps contre la grippe (vaccination récente avec suivi)	40	100,0%
Infection EBV aiguë & anticorps hétérophiles	22	100,0%
Infections par d'autres coronavirus humains pathogènes	23	100,0%
Facteurs rhumatoïdes	40	100,0%
Donneurs de sang (Allemagne, 2010)	150	98,7%
Donneurs de sang (Allemagne, 2017)	250	99,2%
Donneurs de sang (Chine, 2013)	49	100,0%
Donneurs de sang (Etats-Unis, 2017)	400	99,3%
Femmes enceintes (Chine, 2013)	99	99,0%
Femmes enceintes (Allemagne, 2019)	100	100,0%
Enfants	74	100,0%
Personnes âgées	97	100,0%
Total	1344	99,6%

Limites du test

- Pour un diagnostic médical, le résultat du test sérologique doit toujours être interprété conjointement avec les symptômes cliniques du patient et d'autres résultats, par exemple ceux de la détection directe de l'agent du pathogène. Un résultat sérologique négatif n'exclut pas la présence de la maladie.
- Les volumes de pipetage, les temps d'incubation, les températures et les étapes de préparation données dans le mode d'emploi doivent être respectés.
- La bonne exécution du prélèvement et du stockage des échantillons est cruciale pour les résultats des tests.
- Le coffret est validé pour la détection des anti-SARS-CoV-2 IgG uniquement dans le sérum ou le plasma humain.
- L'activité de fixation des anticorps et l'activité de l'enzyme utilisée sont dépendantes de la température. Il est donc recommandé d'utiliser un incubateur ELISA thermostaté dans toutes les étapes d'incubation. Plus la température ambiante est élevée pendant les étapes d'incubation, plus les valeurs de densité optique seront élevées. Les mêmes variations s'appliquent aussi pour les temps d'incubation. Cependant, les calibrateurs sont soumis aux mêmes influences, de sorte que ces variations seront largement compensées dans le calcul du résultat.



Protocole du dosage

Réalisation du test (en partie) manuelle

Incubation des échantillons:

(1^{ère} étape)

Déposer **100 µl** du **calibrateur, des contrôles positif et négatif ou des échantillons patients** dilués dans les différents puits de la microplaque selon le protocole de pipetage. Incuber pendant **60 minutes à +37°C ± 1°C**.

Pour la réalisation manuelle des puits de la microplaque, couvrir la plaque une fois terminée avec le film de protection. Lors de l'utilisation d'un préparateur de microplaque automatisé pour l'incubation, suivre les recommandations du fabricant de l'automate.

Lavage:

Manuel: Retirer le film de protection. Vider et ensuite laver les puits **3 fois avec 300 µl de tampon de lavage à la concentration de travail** pour chaque lavage.

Automatique: Retirer le film de protection. Laver les puits **3 fois avec 450 µl de tampon de lavage à la concentration de travail** (programmation du lavage: par exemple, "Overflow Mode" pour le laveur TECAN Columbus).

Laisser le tampon de lavage dans chaque puits pendant 30 à 60 secondes par cycle de lavage et vider les puits. Après le lavage (tests manuels et automatisés), éliminer toute trace de liquide dans les puits en tapotant énergiquement la microplaque face vers le bas sur du papier absorbant, afin d'éliminer tout reste de tampon de lavage.

Remarque:

Les positions libres sur la barrette de microplaque doivent être complétées avec des puits vides du même format que celui de la microplaque du paramètre à analyser.

Incubation du conjugué:

(2^{ème} étape)

Déposer **100 µl de conjugué enzymatique** (anti-IgG humaine couplé à la peroxydase) dans chaque puits de la microplaque. Pour la réalisation du test en manuel, poser un film de protection sur les puits.

Incuber **30 minutes à +37°C ± 1°C**.

Lavage:

Retirer le film de protection. Vider les puits. Laver comme décrit ci-dessus.

Incubation du substrat:

(3^{ème} étape)

Déposer **100 µl de la solution de chromogène/substrat** dans chaque puits de la microplaque. Incuber pendant **30 minutes** à température ambiante (+18°C à +25°C) en protégeant de la lumière directe du soleil.

Arrêt:

Déposer **100 µl de la solution d'arrêt** dans chaque puits de la microplaque, dans le même ordre et avec la même cadence que la distribution de la solution de chromogène/substrat.

Lecture:

La **mesure photométrique** de l'intensité de coloration doit être faite à une **longueur d'onde de 450 nm** et avec une longueur d'onde de référence comprise entre 620 nm et 650 nm **dans les 30 minutes qui suivent l'ajout de la solution d'arrêt** afin d'obtenir l'**extinction** de chaque puits. Avant de mesurer, agiter légèrement la microplaque pour assurer une bonne homogénéisation de la solution.

Réalisation du test en utilisant des systèmes d'analyses entièrement automatisés

La dilution des échantillons et la réalisation du test sont effectuées de façon entièrement automatisée en utilisant un automate d'analyse. Les conditions d'incubation programmées sur les automates d'EUROIMMUN peuvent différer légèrement des spécifications indiquées dans le mode d'emploi de l'ELISA. Cependant, ces conditions ont été validées entre cet ELISA d'EUROIMMUN et l'Analyzer I d'EUROIMMUN. Les documents de validation sont disponibles sur demande.

Remarque: La réalisation sur d'autres automates est possible mais doit être validée par l'utilisateur.



Protocole de pipetage

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C	P 6	P 14	P 22								
B	pos.	P 7	P 15	P 23								
C	nég.	P 8	P 16	P 24								
D	P 1	P 9	P 17									
E	P 2	P 10	P 18									
F	P 3	P 11	P 19									
G	P 4	P 12	P 20									
H	P 5	P 13	P 21									

Le protocole de pipetage pour les barrettes de microplaque de 1 à 4 est donné à titre d'exemple pour une **analyse par ratio** de 24 échantillons patients (P 1 à P 24).

Le calibrateur (C), les contrôles positif (pos.) et négatif (nég.) et les échantillons patients ont été incubés chacun dans un puit. La fiabilité du dosage ELISA peut être améliorée en dosant chaque échantillon en double.

Les puits peuvent être séparés individuellement de la barrette. Cela permet d'ajuster le nombre de puits utilisés au nombre d'échantillons qui doivent être analysés et de minimiser le gaspillage de réactifs.

Les contrôles positif et négatif servent au contrôle interne pour vérifier que le test est valide. Ils doivent être incubés dans chaque série de dosages.

Évaluation du test

La densité optique (DO) du calibrateur définit la limite supérieure de la gamme de référence des personnes non infectées (**seuil**) recommandée par EUROIMMUN. Les valeurs supérieures au seuil indiqué doivent être considérées comme positives, celles qui sont inférieures comme négatives.

Analyse par ratio: Les résultats peuvent être évalués en calculant un ratio de la DO du contrôle ou de l'échantillon patient sur la DO du calibrateur. Calculer ce ratio selon la formule suivante:

$$\frac{\text{DO du contrôle ou de l'échantillon patient}}{\text{DO du calibrateur}} = \text{Ratio}$$

EUROIMMUN recommande d'interpréter les résultats de la manière suivante:

Ratio <0,8: **négatif**
Ratio ≥0,8 à <1,1: **douteux**
Ratio ≥1,1: **positif**

Pour les dosages en double, la moyenne des deux valeurs doit être utilisée. Si les deux valeurs varient significativement l'une de l'autre, EUROIMMUN recommande de tester à nouveau les échantillons.

Performance analytique

Gamme de mesure:

Limite du blanc (LoB): ratio 0,13
Limite de détection (LoD): ratio 0,14

La LoB et la LoD ont été définies sur la base des POS actuelles d'EUROIMMUN pour l'autorisation d'utilisation en cas d'urgence.



Précision: Les études sur la précision intra-laboratoire ont été réalisées conformément à la directive EP05-A3 du CLSI. Quatre échantillons (réactivité répartie sur toute la plage de mesure) ont été mesurés. La précision est donnée sous forme d'écart-type (ET) et de coefficient de variation (CV).

Précision intra-laboratoire

	Échantillon 1		Échantillon 2		Échantillon 3		Échantillon 4	
Moyenne	Ratio 0,07		Ratio 1,12		Ratio 2,36		Ratio 5,2	
	ET	% CV	ET	% CV	ET	% CV	ET	% CV
<i>Répétabilité</i>	0,012	16,0	0,060	5,4	0,091	3,9	0,231	4,4
<i>Inter-série</i>	0,000	0,0	0,021	1,9	0,058	2,4	0,168	3,2
<i>Intra-jour</i>	0,012	16,0	0,063	5,7	0,108	4,6	0,285	5,5
<i>Inter-jour</i>	0,002	2,3	0,060	5,4	0,174	7,4	0,089	1,7
<i>Intra-laboratoire</i>	0,012	16,2	0,087	7,8	0,205	8,7	0,299	5,7

Réactions croisées (spécificité analytique): Cependant, en raison de leur relation étroite, des réactions croisées entre SARS-CoV(-1) et SARS-CoV-2 sont probables. Les sérums de patients atteints d'infections par SARS-CoV(-1), MERS-CoV, HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-HKU1 ou HCoV-OC43 ont été étudiés pour approfondir cette question. Comme attendu, des réactions croisées prononcées ont été observées, en particulier avec les anticorps IgG anti-SARS-CoV(-1). Des réactions croisées avec d'autres coronavirus pathogènes humains n'ont pas été observées.

Groupe	N (positif) / n (négatif)	Réactions croisées [%]
RSV	0/30	0
Adénovirus	1/29	3,3
Entérovirus	1/29	3,3

Interférence: Dans ce dosage ELISA, les échantillons hémolysés, lipémiques et ictériques ne montrent pas d'influence sur les résultats, jusqu'à une concentration de 10 mg/ml pour l'hémoglobine, 20 mg/ml pour les triglycérides et 0,4 mg/ml pour la bilirubine. Les interférences potentielles endogènes suivantes n'ont pas été testées pour l'interférence : hématocrite, anticorps humains anti-souris (HAMA) et anticorps développés contre les systèmes d'expression de protéines utilisés pour générer des antigènes recombinants. Les interférences potentielles exogènes telles que les médicaments les plus souvent prescrits dans la population de patients cible (antibiotiques, antiviraux et métabolites de médicaments), et les médicaments courants en vente libre n'ont pas été testés pour l'interférence.

Performance clinique

Sensibilité diagnostique: La sensibilité a été déterminée en étudiant 166 échantillons de 152 patients européens, en utilisant le test ELISA Anti-SARS-CoV-2 (IgG). Chez ces patients, les infections par le SARS-CoV-2 ont été confirmées par RT-PCR [10] basé sur un échantillon prélevé au début de l'infection. Pour les échantillons prélevés avant le 10^{ème} jour (intervalle de temps après l'apparition des symptômes ou la détection directe positive du pathogène), le test ELISA Anti-SARS-CoV-2 (IgG) a montré une sensibilité de 43,7%. La sensibilité du test ELISA Anti-SARS-CoV-2 (IgG) pour les échantillons prélevés après le 10^{ème} jour était de 94,4%. Les résultats douteux (n = 7) n'ont pas été pris en compte dans le calcul.

Jours après l'apparition des symptômes ou une détection directe positive	EUROIMMUN ELISA Anti-SARS-CoV-2 (IgG)		
	Positif	Négatif	Sensibilité
≤10	38	49	43,7%
>10	68	4	94,4%