Product No.: YF-500

YF MAC-HD 1.0

Kit de detection de l'IgM spécifique au virus de la Virus de la Fièvre Jaune

Uniquement pour la recherche (RUO)

Ne pas utiliser dans les procédures de diagnostic

Stocker le kit à 4ºC

NE PAS GELER

American Type Culture Collection (ATCC®)
10801 University Blvd.
Manassas, VA 20110 USA
www.atcc.org

(800) 638-6597 or 703-365-2700
Fax: 703-365-2750
Doc ID: TMP-000006
Effective Date: 13 Jun 2021

Contents

Contexte 3
Principe du test 3
Utilization prévue 3
Prélèvement de spécimens 3
Stockage et transport 4
Disposition 4
Recommandations 4
Limitations du YF MAC-HD 4
Caractéristiques du YF MAC-HD Assay 4
Articles inclus pour chaque assay (10 assays par kit): 5
Articles requis non inclus dans le kit: 5
Articles recommandés non inclus dans le kit: 5
Protocol YF MAC-HD (Routine – Jusqu'a 24 échantillions téstés en singlicate) 6
YF MAC-ON (jusqu'à 8 échantillons téstés en triple pendant la nuit) - Protocol de Résolution Équivoque 7
Notes de Technique 7
Calculations automatique 9
Calculs manuels 11
Validité 11
Analyse des résultats de l'échantillon 12
Interprétation des resultats 12
YF MAC-ON (jusqu'à 8 échantillons testés en triple pendant la nuit) - Protocole de Résolution Équivoque 13
Analyse des résultats de l'échantillon 123
Interprétation des resultats 13
Addendum 15
Variabilité entre les replicats du côntrol 15
DO de côntrol positif a réagi sur YFVA 15
DO de côntrole negative a a réagi sur YFVA ..... 15DO de côntrole Positif a réagi sur l'antigène normal 16
Performance du kit YF MAC-HD 17
Durée de conservation/stabilité 17
Sensibilité analytique (LOD) 17
Spécificité analytique 16
Panel de performance clinique 20
Sensibilité clinique 20
Spécificité clinique 20
Études de Performances cliniques supplémentaires 20
Utilisation dans les régions endémiques 22
Précision 21
Références 21

American Type Culture Collection (ATCC®)
10801 University Blvd.
Manassas, VA 20110 USA
www.atcc.org

(800) 638-6597 or 703-365-2700
Fax: 703-365-2750
Doc ID: TMP-000006
Effective Date: 13 Jun 2021

Contexte

Le virus de la fièvre jaune (YFV) appartient au genre Flavivirus et se trouve dans les zones tropicales et subtropicales d'Amérique du Sud et d'Afrique. Il est lié à d'autres virus tels que la dengue et les virus du Nil occidental. Le virus est transmis à l'homme par la piqûre d'un moustique infecté. La gravité de la maladie varie d'une maladie fébrile spontanément résolutive à une maladie hépatique grave avec saignement. La fièvre jaune est diagnostiquée sur la base des symptômes, des signes physiques, des tests de laboratoire et des antécédents de voyage, y compris la possibilité d'exposition à des moustiques infectés. Il n'existe pas de traitement spécifique pour la fièvre jaune ; les soins sont basés sur les symptômes mais comprennent du repos, des liquides et l'utilisation d'analgésiques et de médicaments pour réduire la fièvre. Les étapes pour prévenir l'infection par le virus de la fièvre jaune comprennent l'utilisation d'un insectifuge, le port de vêtements de protection, l'utilisation de moustiquaires et la vaccination.

- Chez les personnes qui développent des symptômes, la période d'incubation (durée entre l'infection et la maladie) est généralement de 3 à 6 jours.

- Les premiers symptômes comprennent l'apparition soudaine de fièvre, des frissons, des maux de tête intenses, des maux de dos, des courbatures générales, des nausées et des vomissements, de la fatigue et de la faiblesse. La plupart des personnes s'améliorent après la présentation initiale.

- Après une brève rémission de quelques heures à une journée, environ 15 % des cas évoluent vers une forme plus grave de la maladie. La forme sévère se caractérise par une forte fièvre, une jaunisse, des saignements et éventuellement un choc et une défaillance de plusieurs organes.

- Parmi ceux qui développent une maladie grave, 20 à 50 % peuvent mourir.

- Ceux qui guérissent de la fièvre jaune ont généralement une immunité durable contre une infection ultérieure.

- Un diagnostic présomptif de fièvre jaune est souvent basé sur les caractéristiques cliniques du patient, les lieux et dates de voyage et les antécédents épidémiologiques du lieu où l'infection présumée s'est produite.

- La surveillance de la fièvre jaune est essentielle à la détection précoce des flambées. Le test d'immunoglobuline M (IgM) est un moyen d'identifier les infections dans la communauté.

PRINCIPE DU TEST

Le YF MAC-HD est pour la recherche uniquement et est un test qualitatif basé sur la méthode interne YF MAC-ELISA développée par le CDC qui détecte les IgM contre le virus de la fièvre jaune (voir référence 1, page 22). Le YF MAC-HD utilise des IgM anti-humains pour capturer les IgM dans le sérum humain. Si une IgM réactive à la fièvre jaune est présente, celle-ci réagit avec l'antigène du virus entier non infectieux de la fièvre jaune, qui est détecté à l'aide d'un anticorps monoclonal réactif au groupe flavivirus conjugué à la peroxydase de raifort, et une réaction colorimétrique mesurable est produite à l'aide d'un substrat de 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine. Le test a été adapté à un format de kit avec un temps d'exécution plus rapide et intègre stabilité et facilité d'utilisation, ce qui le rend pratique dans une grande variété de paramètres de laboratoire. Le protocole pour résoudre les résultats équivoques est inclus dans cette notice d'utilisation (Voir page 8 « YF MAC-ON »).

Utilisation prévue

Le YF MAC-HD est destiné à la recherche uniquement (RUO) et est destiné à être utilisé dans la détection des IgM anti-virus de la fièvre jaune dans le sérum humain. Il doit être utilisé en laboratoire par du personnel de laboratoire qualifié. Les résultats de ce test sont qualitatifs et doivent être utilisés dans le cadre de la surveillance en laboratoire de la fièvre jaune. Les résultats doivent être confirmés conformément aux directives de laboratoire applicables. Le test n'a pas été validé à des fins cliniques (c'est-à-dire le diagnostic de la fièvre jaune).

Prélèvement de spècimens

Les échantillons de sérum doivent être obtenus an utilisant des tubes séparateurs de sérum conformément aux instructions du tube. Le sang peut être conservé entre 4 °C et 8 °C jusqu'à 24 heures avant que le sérum ne soit séparé. Le sang doit pouvoir coaguler et se rétracter en le laissant à température ambiante pendant une demi-heure à une heure. Une

centrifugation à 1000 x g pendant 10 minutes séparera le sérum du caillot. Le sérum doit être immédiatement transféré dans un nouveau flacon étiqueté et stocké entre 4 °C et 8 °C jusqu'au test. Si aucune centrifugeuse n'est disponible, le sérum peut être retiré de manière aseptique du caillot rétracté au moyen d'une pipette stérile et transféré dans un flacon stérile étiqueté et stocké entre 4 °C et 8 °C jusqu'au test. Des précautions doivent être prises pour éviter de transférer des globules rouges. L'hémolyse peut entraîner des résultats incorrects. Les tests utilisant du sérum séparé doivent être effectués dès que possible et dans les 7 jours. Une fois le test terminé, les sérums restants peuvent être conservés à -20°C, ou en dessous de -60°C s'ils sont utilisés pour la procédure d'isolement.

Stockage et transport

Le kit YF MAC-HD doit être conservé à 4 °C jusqu'à la date de péremption, après quoi le kit doit être éliminé (voir la section relative à l'élimination). La température de transport doit être maintenue à 4°C. Un Tempilabel® est apposé sur le flacon substrat. **Si le point est noir, cela indique que le kit peut avoir été compromis en raison d'une température élevée et que le kit doit être jeté.**

Attention MATIÈRE POTENTIELLEMENT DANGEREUSE Ce kit contient des réactifs à base de sérum humain. Le sérum est d'origine commerciale et testé négatif pour le VIH-1 et le VIH-2, le VIH-Ag, le VHC, l'HBsAg et le RPR par des méthodes approuvées par la FDA. Manipulez tous les sérums et kits comme s'ils contenaient des agents infectieux. Observez les précautions établies contre les risques microbiologiques lors de l'exécution de toutes les procédures et suivez les procédures standard pour une élimination appropriée des échantillons.

Disposition

Les matériaux restants du kit YF MAC-HD doivent être éliminés par autoclavage ou conformément aux politiques internes du laboratoire.

Recommandations

- Pour l'interprétation des données obtenues à l'aide de ce kit, il est essentiel d'obtenir la date d'apparition des symptômes, la date de prélèvement de l'échantillon, le lieu de résidence/les antécédents de voyage du patient et d'autres informations pertinentes sur la santé.
- Les échantillons prélevés dans les premiers jours après le début peuvent ne pas contenir d'anticorps IgM contre la fièvre jaune et des échantillons de suivi doivent être obtenus.
- Le résultat doit être interprété conformément aux directives nationales de surveillance, aux algorithmes de test et en tenant compte des antécédents cliniques et vaccinaux.

Limitations du YF MAC-HD

- À utilizer uniquement pour la recherche en laboratoire/ La surveillance du virus de la fievre jaune.
- La présence de résultats faussement positifs et négatifs doit être prise en compte, y compris les faux positifs dus à une infection aiguë par le paludisme, des taux élevés de facteur rhumatoïde et une réactivité croisée avec les IgM d'autres flavivirus.
- Étant donné que les IgM de la fièvre jaune peuvent être détectées après la vaccination, les antécédents vaccinaux doivent être recherchés pour aider à déterminer la source d'exposition (au virus sauvage ou après la vaccination).
- Ce kit doit être utilisé conformément aux algorithmes nationaux de FJ et la confirmation des résultats doit être effectuée comme indiqué.
- Ce kit ne peut pas faire la distinction entre les anticorps induits par le vaccin et les anticorps dirigés contre le virus de la fièvre jaune de type sauvage.
- Ce test YF MAC-HD est considéré comme un test de haute complexité et ne doit être effectué que dans des laboratoires disposant des conditions de stockage et d'exécution appropriées et d'un personnel de laboratoire formé.
- Un seul utilisateur ne doit pas essayer plus de 2 plaques par jour pour éviter les surincubations et l'absence d'ajout de composants.
- Le kit MAC-HD FJ n'a été validé que pour une utilisation avec du sérum; D'autres sources potentielles d'anticorps n'ont pas été validées et on ne peut pas assurer précisement des résultats.

Caractéristiques du YF MAC-HD

- **À Usage unique (c'est-à-dire, pas de stockage des composants restants du kit même s'il en reste après ouverture)**
- Utiliser pour tester 24 échantillons individuellement ou 8 échantillons en trois exemplaires en suivant le protocole de nuit lors du test des équivoques (YF MAC-ON)
- Environ 3,5 heures du début à la fin (sans compter la préparation des échantillons de test)
- Tous les réactifs et diluants sont inclus à l'exception de l'eau utilisée pour diluer le tampon de lavage
- Réactifs fournis à dilution de travail ou lyophilisés et à dilution de travail après reconstitution. Aucun titrage de réactif ou dilution supplémentaire requis
- Tous les réactifs stockés ensemble (Note technique #2, page 8)
- Durée de conservation minimale 1 an à compter de la fabrication
- Tolérance aux fluctuations de la température d'expédition (Note technique #3, page 8)
- Sensibilité similaire à celle du CDC-ELISA (test 72 h)
- Spécificité similaire à celle du CDC-ELISA (Note Technique #4, page 8)
- Aucune restriction d'expédition pour la solution d'arrêt
- Le test est optimisé pour les incubations du sérum et du conjugué à effectuer à 28 °C (recommandé), mais 21 °C, 26 °C et 37 °C fonctionnent également avec ce test, sur la base de données limitées
- Les résultats équivoques doivent être vérifiés en retestant l'échantillon en utilisant le protocole de nuit (YF MAC-ON, page 8)
- Tests d'IgM contre le virus de type sauvage ou de souche vaccinale dans le sérum (Note technique #5, page 7)
- **Les échantillons doivent être manipulés en utilisant des mesures appropriées de lutte contre l'infection appropriées pour la manipulation des échantillons cliniques. (Note technique #1, page 8)**

Articles inclus pour chaque test (10 tests par kit)

1. Concentré de tampon de lavage (liquide, concentration 10X) (bouteille transparente) (YF-1)
2. Concentré de conjugué (liquide dans un stabilisateur) (flacon ambré avec couvercle blanc) (YF-2)
3. Diluant conjugué (lyophilisé) (flacon en verre avec sceau d'argent marqué ●) (YF-3)
4. Eau stérile pour reconstitution (bouteille opaque avec autocollant vert) (YF-4)
5. Sérum de contrôle négatif (lyophilisé dans un tampon) (flacon en verre avec joint bleu) (YF-5)
6. Antigène normal – surnageant de culture de cellules Vero inactivées (lyophilisé dans du tampon) (flacon en verre avec joint vert) (YF-6) **Un antigène normal est nécessaire pour détecter les réactions de fond non spécifiques qui résultent de NEG. Ne pas eliminer du test.**
7. Une plaque de microtitrage à 96 puits revêtue d'IgM et stabilisée (YF-7)
8. Contrôle positif YF IgM (anticorps monoclonal humanisé) (lyophilisé dans un tampon) (flacon en verre avec phoque rouge) (YF-8)
9. Diluant échantillon (liquide, à la dilution de travail) (flacon opaque avec autocollant orange) (YF-9)
10. Solution d'arrêt (liquide, à dilution de travail) (flacon opaque) (YF-10)
11. Substrat (liquide, à dilution de travail) (bouteille brune) (Note technique #6) (YF-11)
12. Antigène de la fièvre jaune – surnageant de culture cellulaire YF 17D Vero inactivé (lyophilisé dans un tampon) (flacon en verre avec sceau d'argent) (YF-12)
13. Trois (3) scellants à plaques
14. Le classeur MAC-HD FJ Calculations Workbook, disponible dans les versions Excel 2022.

Le classeur peut être obtenu auprès de: https://www.atcc.org/yellow-fever-surveillance-kits

Articles requis non inclus dans le kit:

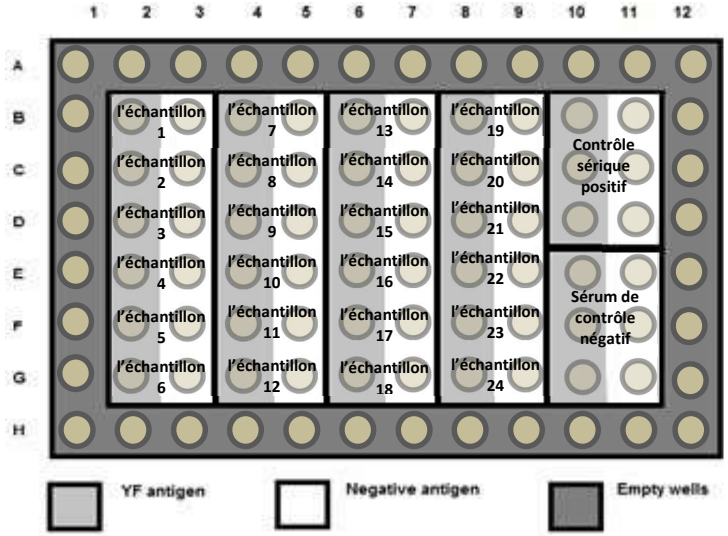
1. Pipettes calibrées [(P-10, P-200, P-1000, multicanal (200 µL)]
2. Enceinte de biosécurité pour la manipulation d'échantillons potentiellement infectieux (Note technique #1, page 8)

3. Réservoirs de réactifs (minimum de 2) - requis pour une utilisation avec une pipette multicanaux
4. Eau déminéralisée (DI) pour tampon de lavage
5. Flacon PETG de 1L ou récipient similaire pour mélanger l'eau DI et le tampon de lavage
6. Lecteur de plaques (filtre 450 nm)
7. Réfrigérateur (2°C à 8°C)
8. Marqueur indélébile
9. Tubes de dilution d'échantillon (par ex. Polypropylène; tubes de 1 mL; 1 par échantillon testé) et bouchons

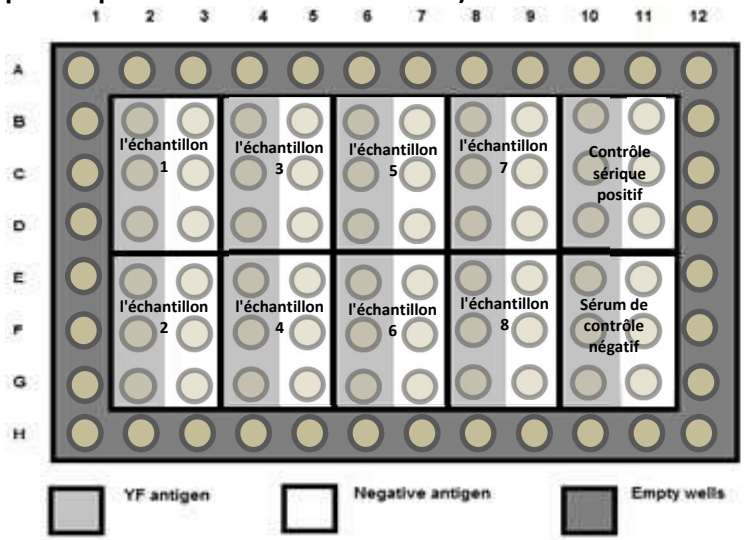
Articles recommandés non inclus dans le kit:

1. Contrôle positif IgM FJ interne- Fortement recommandé pour assurer la cohérence des tests
2. Lave-assiettes (préféré au lavage des assiettes à la main)
3. Vortexer (utile mais pas obligatoire)
4. Incubateur réglé a 28°C (de préférence)
5. Ciseaux
6. Aide a la pipette (100 ml dan 900 ml) ou vous pouvez verser le tampon de lavage 10X Prémesuré de 100 ml dans les 900 ml d’eau DI prémesurés.

Format de routine sur plaque unique (jusqu'à 24 échantillons d'essai)



Format de résolution équivoque (8 plaques d'échantillon de test pour le protocole de nuit YF MAC-ON)



YF MAC-HD (ROUTINE – JUSQU'À 24 ÉCHANTILLONS TESTÉS EN REPLIQUES UNIQUES) -PROTOCOLE

NE LAISSEZ JAMAIS LA PLAQUE SÉCHER

1. Attendre que tous les réactifs du kit aient attaint la température ambiante.
2. Diluer les échantillons de sérum à tester et le controle positif interne à 1:100 dans le diluant de l'échantillon (fourni); mélanger. (Recommander 4 µL de sérum dans un échantillon de diluant de 396 µL pour un volume total de 400 µL). Utilisez un nouveau embout de pipette pour chaque échantillon.
3. Ajouter 400 µL d'eau stérile (fournie) aux flacons témoins négatifs et positifs; Mélanger et utiliser dès que possible.
4. Ouvrir le paquet contenant la plaque avec des ciseaux; Annoter les puits à l'aide d'un marqueur permanent (les puits extérieurs ne sont pas revêtus). Le placement des témoins positifs et négatifs est pré-marqué.
5. Ajouter 50 µL de sérum à tester dans 2 puits (1 antigène viral + 1 puits d'antigène normal par échantillon). Ajouter 50 µL de témoins négatifs et positifs à 6 puits par témoin (3 puits viraux et 3 puits d'antigènes normaux).
6. Plaque de recouvrement avec scellant. Incuber 30 min à 28°C (Note technique #7, page 7).
7. Pendant l'incubation dans l'étape 6, préparer 1X tampon de lavage. Ajouter 900mL d'eau désionisée à 100 mL de tampon de lavage 10X (fourni) mélanger.
8. 10 minutes avant la fin de l'incubation dans l'étape 6, reconstituer l'antigène de la fièvre jaune et l'antigène normal dans 1,8 mL d'eau stérile et mélanger.
9. A La fin de l'incubation dans l'étape 6, Retirez délicatement le scellant et jetez-le.
10. Laver la plaque de lavage utilisant 5 cycles si vous utilisez une laveuse à plaques ou 3 cycles si vous utilisez un lavage manuel (Note technique #8, et #9, page 7).

11. Ajouter 50 µL/puits d'antigène YF aux colonnes paires (à gauche); Antigène normal de 50 µL aux colonnes impaires (à droite).
12. Couvrir la plaque avec un scellant. Incuber 2 heures à 4°C.
13. **5 minutes avant la fin de l'incubation d'étape 12, ajouter 3,45 mL d'eau stérile au diluant conjugué, puis ajouter 50 µL de conjugué au diluant; mélanger**.
14. Suivant de l'incubation dans l'étape 12**,** Retirez délicatement le scellant et jetez-le.
15. Laver la plaque de lavage utilisant 5 cycles si vous utilisez une laveuse à plaques ou 3 cycles si vous utilisez un lavage manuel (Note technique #8, et #9, page 7).
16. **Ajouter 50 µL/mélange conjugué puits à tous les puits.** Plaque de recouvrement avec scellant. Incuber 30 min à 28°C.
17. Suivant d'incubation dans l'étape 16, retirez délicatement le scellant et jetez-le.
18. Laver la Plaque de lavage 15 cycles de rotation de la plaque tous les 5 cycles si vous utilisez une laveuse à plaques à 96 puits, 10 cycles si vous utilisez une laveuse à bandes (Note technique #8, page #9, page 7) ou 6 cycles si vous utilisez un lavage manuel.
19. **Ajouter 75 µL/solution d'arrêt de puits à tous les puits**, (Note technique #3 et #6, page 7). Placez l'assiette à découvert dans l'obscurité. Incuber 10 min. à température ambiante.
20. **Ajouter 75 µL/solution d'arrêt de puits à tous les puits, y compris A1-D1** (Note technique #10, page 8).
21. Lire à 450 nm en 15 minutes (Note technique #11, page 8). Pour les calculs, voir pages 9 à 11 et addendum, pages 15 et 16.
22. Jetez les composants de test inutilisés.

YF MAC-ON (JUSQU'À 8 ÉCHANTILLONS TESTÉS EN TRIPLE PENDANT LA NUIT) – PROTOCOLE DE RÉSOLUTION ÉQUIVOQUE

Méthode facultative pour aider à résoudre les résultats équivoques. Pour YF MAC-ON avec jusqu'à 8 échantillons testés en triple exemplaire pendant la nuit, utilisez le format de 8 échantillons à la page 6. Suivez le protocole pour YF MAC-HD à la page 6 avec les exceptions suivantes:

5. Ajouter l'échantillon dilué à 3 puits d'antigènes viraux et 3 puits d'antigènes normaux.

10. Couvrir la plaque et incuber l'antigène pendant une nuit (18-24h) à 4°C.

Pour les calculs, voir pages 9 et 13.

NOTES TECHNIQUES

1. En raison de la nature potentiellement infectieuse des échantillons de sérum, le confinement minimal devrait comprendre une enceinte de biosécurité, des lunettes de sécurité, une blouse de laboratoire et des gants. Les déchets tampons de lavage doivent être traités avec de l'eau de Javel ou un autre désinfectant approuvé. Si une enceinte de biosécurité n'est pas disponible, les échantillons doivent être inactivés dans un bain-marie à 56 °C pendant 30 minutes avant d'être utilisés afin de minimiser les risques. Notez que cela ne garantit pas l'inactivation de tous les agents infectieux.

2. La stabilité a été optimisée pour le stockage à 4°C pour tous les composants du kit. D'autres températures n'ont pas été étudiées. La congélation inactivera le conjugué. **NE PAS CONGELER.**

3. Si le capteur de température sur le conteneur de substrat affiche un point noir solide, cela indique que le kit a été soumis à des conditions inacceptables pendant le transport. Jetez le kit.

4. Des résultats faussement positifs se produisent et peuvent être dus à une infection par d'autres flavivirus, au paludisme, à une vaccination antérieure contre la fièvre jaune et à une interférence due à des niveaux élevés de facteur rhumatoïde. Consultez les lignes directrices régionales de l'OMS pour obtenir des recommandations sur les tests supplémentaires.

5. YF MAC-HD n'a pas été validé pour une utilisation avec des types d'échantillons autres que le sérum.

6. Si le substrat a une couleur bleu pâle, jetez. Il est recommandé de verser le substrat dans un réservoir de réactif (non inclus) et d'utiliser un pipeteur

multichannel pour distribuer, car l'entrée répétée des pointes de pipette dans le substrat entraînera une contamination de couleur.

7. Placez les plaques scellées en une seule couche pour l'incubation. Ne pas empiler. Le kit est optimisé pour les incubations de sérum et de conjugué à 28°C. Des données limitées montrent que des températures d'incubation comprises entre 21 °C et 37 °C sont également acceptables.

8. Les plaques lavées avec **une bande de lavage** doivent être lavées en utilisant 10 cycles avec un tampon de lavage de 250 µL pour l'étape finale de lavage.

9. L'utilisation d'une **laveuse de plaques automatique** (soit une laveuse à 96 puits ou une laveuse à bandes) est recommandée, avec un programme comme suit:

a. Laveuse de plaques (5 cycles): Aspirer pendant 2 secondes ; laver pendant 1 seconde ; aspirer pendant 2 secondes ; laver pendant 1 seconde ; aspirer pendant 2 secondes; laver pendant 1 seconde ; aspirer pendant 2 secondes; laver pendant 1 seconde ; aspirer pendant 2 secondes ; laver pendant 1 seconde; aspirer pendant 4 secondes. Le volume de solution de lavage est de 250 µL/puits. Ajouter 100 mL de tampon de lavage concentré 10X (fourni) à 900 mL d'eau désionisée.

b. Lavage manuel des plaques: Verser le contenu d' une plaque dans un recipient à déchets (dans une enceinte de biosécurité si les échantillons sont potentiellement infectieux). Ajouter 200 µL de tampon de lavage à chaque puits. Jeter. Répétez l'opération pour obtenir le nombre de cycles requis. Après le cycle final, sécher la plaque sur une surface absorbante pour éliminer tout tampon de lavage restant des puits. Les résultats de plaques lavées à la main peuvent varier légèrement par rapport à ceux des plaques lavées automatiquement.

10. Pour éviter de créer des bulles, distribuer une solution d'arrêt en plaçant les embouts de pipette contre la paroi des puits. Ne pas distribuer au-delà de la première position d'arrêt de la pipette. Des lectures OD incorrectes se produiront si des bulles sont présentes.

11. Si vous utilisez le classeur Excel pour les calculs, il n'est pas nécessaire de configurer le lecteur pour effacer automatiquement les puits à l'aide de A1, B1, C1, D1. Cependant, l'occultation automatique à l'aide du lecteur de plaques est très utile si vous effectuez des calculs manuels.

AUTOMATED CALCULATIONS

Pour effectuer des calculs automatisés, utilisez le classeur Excel "**MAC-HD FJ Cahier de Calculs"**

disponible dans les versions Excel 2022. Le classeur peut être obtenu auprès de: https://www.atcc.org/yellow-fever-surveillance-kits.

Suivez les directions dans l'instruction de tab Suivre.

Pour le format à 24 échantillons (demi-journée de routine), utilisez l'onglet YF MAC-HD pour saisir les résultats A450 dans les cellules B2:M9. La validité, les valeurs de contrôle et les résultats des tests seront calculés automatiquement.

Pour le protocole de nuit (triplicate en utilisant le format à 8 échantillons), utilisez l'onglet YF MAC-ON pour entrer les résultats A450 dans les cellules B2:M9 La validité, les valeurs de contrôle et les résultats des tests seront calculés automatiquement.

Des exemples pour chaque format de test sont donnés sur des onglets distincts dans le cahier de calculs 2022 YF MAC-HD.

CALCULS MANUELS

Pour effectuer des calculs manuels, utilisez le modèle fourni ci-dessous.

Format YF MAC-HD 24 échantillons

Abréviations

YFVA = Antigène viral de la fièvre jaune
NA = Antigène normal
PCVA = contrôle positif moyen sur YFVA
AACV = contrôle négatif moyen sur la JFVA
PCNA = contrôle positif moyen sur NA Format YF MAC-HD 24 échantillons

Validité

1. Entrez les DO des échantillons moins le moyen du blanc [(A1+B1+C1+D1)/4] dans le modèle fourni à la page 13.

2. Calculer PCVA.

Avant de calculer la PCVA, examiner toute variabilité dans les répétitions de contrôle positif sur l'antigène viral (voir Addenda, pages 16-17).

Utiliser les répliques de PCVA qui ne dépassent pas la limite de variabilité (VL) de DO 0,3 pour calculer la PCVA

Exemple : (B10+C10+D10)/3 = PCVA

3. Calculer NCVA.

Avant de calculer le NCVA, examiner de toute variabilité du contrôle négatif sur les réplicats de YFVA (voir Addendum, pages 16-17).

REMARQUE IMPORTANTE : si le NCVA est <0,05, utilisez la valeur du NCVA de 0,05 pour calculer les valeurs P/N ; Dans cette situation, les calculs de variabilité ne sont pas nécessaires.

Utilisez les répétitions de la NCVA qui ne dépassent pas la limite de variabilité (VL) de 0,025 pour calculer la NCVA

Exemple : (E10+F10+G10)/3 = NCVA

4. Calculer PCNA.

Avant de calculer la PCNA, examiner de toute variabilité dans les répliques de contrôle positif sur NA (voir Addendum, pages 16-17).

Exemple : (B11+C11+D11)/3 = PCNA

Notez que les DO du contrôle négatif ayant réagi à la NA ne sont pas utilisées dans les calculs

5. Calculez le P/N du contrôle positif (P/N) : **PCVA/NCVA = P/N**

6. Calculez le rapport de fond normal (NBR) : **PCVA/PCNA = NBR**

7. Déterminez si le test est valide :

a. Si le PCVA-VL de contrôle positif n'est pas dépassé, le test est valide. Si ce n'est pas le cas, répétez le test
b.
c. Si le NCVA-VL de contrôle négatif n'est pas dépassé, le test est valide. Si ce n'est pas le cas, répétez le test.
d. Si le NCVA est de <0,2, le test est valide. Si ce n'est pas le cas, répétez le test.
e. Si P/N de contrôle positif ≥3, le test est valide; Si ce n'est pas le cas, répétez le test
f. Si le NBR du témoin positif est ≥2, le test est valide ; Si ce n'est pas le cas, répétez le test

Remarque : En cas de variabilité des paramètres de contrôle des paramètres orientaux, vérifier les techniques de pipetage et de mélange, ainsi que la technique de lavage à plaques ou de lavage manuel.

Analyse des résultats de l'échantillon

8. Calculer et entrer le résultat (P/N) pour chaque échantillon : P/N = DO de l'échantillon sur YFVA/NCVA

REMARQUE IMPORTANTE : si la NCVA est <0,05, utilisez la valeur NCVA de 0,05 pour calculer les valeurs P/N.

9. Calculer et entrer le rapport de fond normal (NBR) pour chaque échantillon : NBR = DO de l'échantillon sur YFVA/DO de l'échantillon sur NA

Interprétation des résultats

10. Interpréter les résultats en utilisant ce qui suit:

IgM FJ positif (POS) P/N ≥2	NBR ≥1,5
IgM FJ équivoque (EQ) P/N ≥1,5 <2	NBR ≥1,5 Éventuellement, retest avec protocole de nuit YF MAC-ON (page 8)
IgM FJ négatif (NEG) P/N <1,5	NBR TOUT
IgM FJ négatif (NEG) P/N TOUT	NBR <1,5

Tableau des résultats 24 échantillons

	YF VA	NA	YF VA	NA	YF VA	NA	YF VA	NA	YF VA	NA
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
B	Nom de l'échantillon:		Nom de l'échantillon:		Nom de l'échantillon:		Nom de l'échantillon:		Contrôle positif	Contrôle positif
	P/N=	NBR=	P/N=	NBR=	P/N=	NBR=	P/N=	NBR=		
	Pos/Neg/EQ		Pos/Neg/EQ		Pos/Neg/EQ		Pos/Neg/EQ			
C	Nom de l'échantillon:		Nom de l'échantillon:		Nom de l'échantillon:		Nom de l'échantillon:		PCVA=	PCNA=
									P/N=	NBR=
	P/N=	NBR=	P/N=	NBR=	P/N=	NBR=	P/N=	NBR=		**Test valide si tout est vrai:**
	Pos/Neg/EQ		Pos/Neg/EQ		Pos/Neg/EQ		Pos/Neg/EQ			PCVA≥0.6
D	Nom de l'échantillon:		Nom de l'échantillon:		Nom de l'échantillon:		Nom de l'échantillon:			Contrôle Pos P/N ≥3.0
	P/N=	NBR=	P/N=	NBR=	P/N=	NBR=	P/N=	NBR=		NBR≥2.0
	Pos/Neg/EQ		Pos/Neg/EQ		Pos/Neg/EQ		Pos/Neg/EQ			NCVA<0.2
E	Nom de l'échantillon:		Nom de l'échantillon:		Nom de l'échantillon:		Nom de l'échantillon:		Contrôle negatif	PCVA/NCVA -VL pas dépassé
	P/N=	NBR=	P/N=	NBR=	P/N=	NBR=	P/N=	NBR=		**Le test est-il valide?**
	Pos/Neg/EQ		Pos/Neg/EQ		Pos/Neg/EQ		Pos/Neg/EQ			**Oui/Non**
F	Nom de l'échantillon:		Nom de l'échantillon:		Nom de l'échantillon:		Nom de l'échantillon:		NCVA=	
	P/N=	NBR=	P/N=	NBR=	P/N=	NBR=	P/N=	NBR=		
	Pos/Neg/EQ		Pos/Neg/EQ		Pos/Neg/EQ		Pos/Neg/EQ			
G	Nom de l'échantillon:		Nom de l'échantillon:		Nom de l'échantillon:		Nom de l'échantillon:			
	P/N=	NBR=	P/N=	NBR=	P/N=	NBR=	P/N=	NBR=		
	Pos/Neg/EQ		Pos/Neg/EQ		Pos/Neg/EQ		Pos/Neg/EQ			

Méthode de lavage: Manual / Bande / 96-puis (cercle un)

Date d'expiration du kit_____) de lo

ID de la plaque_____

Nom_____

American Type Culture Collection (ATCC®)
10801 University Blvd.
Manassas, VA 20110 USA
www.atcc.org

(800) 638-6597 or 703-365-2700
Fax: 703-365-2750
Doc ID: TMP-000006
Effective Date: 13 Jun 2021

YF MAC-ON [INCUBATION D'ANTIGENE DE NUIT A UTILISER AVEC DES RESOLUTIONS EQIVOQUES, JUSQU'A 8 ECHANTILLIONS, TESTES EN TRIPLICATE] PROTOCOLE DE RÉSOLUTION ÉQUIVOQUE

Effectuez les étapes 1 à 7 du calcul de la validité aux pages 11 à 12, suivies de l'analyse et de l'interprétation des résultats de l'échantillon comme suit:

Analyse des résultats des échantillons

8. Calculez et entrez le résultat (P / N) pour chaque échantillon: P/N = DO moyenne de l'échantillon sur YFVA/NCVA

Si un échantillon répliqué ayant réagi sur YFVA ou NA est manifestement différent des 2 autres réplicats, jetez ce réplicat et utilisez les 2 autres pour calculer

REMARQUE IMPORTANTE: si NCVA est <0,05, utilisez la valeur NCVA de 0,05 pour calculer les valeurs P/N.

9. Calculez et entrez le rapport dufond normal (NBR) pour chaque échantillon: NBR = DO moyenne de l'échantillon sur YFVA/DO moyenne de l'échantillon sur NA

Interprétation des résultats

10. Interpréter et encercler les résultats en utilisant les éléments suivants:

IgM FJ positif (POS)	P/N ≥3	NBR ≥2,0
IgM FJ équivoque (EQ)	P/N ≥2,0 <3,0	NBR ≥2,0
IgM FJ négatif (NEG)	P/N <2,0	NBR TOUT
IgM FJ négatif (NEG)	P/N TOUT	NBR <2,0

Tableau des résultats 8 échantillons

	YF VA	NA	YF VA	NA	YF VA	NA	YF VA	NA	YF VA	NA
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	Nom de l'échantillon:		Nom de l'échantillon:		Nom de l'échantillon:		Nom de l'échantillon:		Contrôle positif	Contrôle positif
B										
C										
D										
Mean OD									PCVA=	PCNA=
	P/N=	NBR=	P/N=	NBR=	P/N=	NBR=	P/N=	NBR=	P/N=	NBR=
Interp	Pos/Neg/EQ		Pos/Neg/EQ		Pos/Neg/EQ		Pos/Neg/EQ			**Test valide si tout est vrai:**
	Nom de l'échantillon:		Nom de l'échantillon:		Nom de l'échantillon:		Nom de l'échantillon:		Contrôle negatif	PCVA≥0.6
E										Contrôle Pos P/N ≥3.0
F										NBR≥2.0
G										NCVA<0.2
Mean OD									NCVA=	PCVA/NCVA -VL pas dépassé
	P/N=	NBR=	P/N=	NBR=	P/N=	NBR=	P/N=	NBR=		**Le test est-il valide?**
Interp	Pos/Neg/EQ		Pos/Neg/EQ		Pos/Neg/EQ		Pos/Neg/EQ			**Oui/Non**

Méthode de lavage : Manual / Bande / 96-puis (cercle un)

Numéro de kit lot_____

Date d'expiration du kit_____

ID de la plaque_____

Nom_____

Date_____

Laboratoire_____

American Type Culture Collection (ATCC®)
10801 University Blvd.
Manassas, VA 20110 USA
www.atcc.org

(800) 638-6597 or 703-365-2700
Fax: 703-365-2750
Doc ID: TMP-000006
Effective Date: 13 Jun 2021

ADDENDUM
Variabilité entre les répliques

DO de contrôle positif a réagi sur YFVA

Identifiez si la variabilité entre les répliques dépasse la limite de PCVA variabilité (PCVA-VL) de DO 0,3.

1. Identifiez la réplique avec la valeur médiane et calculez la différence entre elle et les 2 autres valeurs:

   a) Si les valeurs supérieures et inférieures sont de <0,3 différentes de la Valeur médiane utilisez les 3 valeurs pour calculer le PCVA. Le VL de la PCVA n' est pas dépassé.
   b) Si les valeurs supérieures ou inférieures sont de ≥0,3 différentes de la valeur médiane, jetez la valeur qui est de ≥0,3 différente. Calculez le PCVA en utilisant les 2 valeurs qui restent. Le VL de la PCVA n' est pas dépassé.
   c) Si les valeurs supérieures et inférieures sont de ≥0,3 à la valeur médiane, le test dépasse le VL de la PCVA; répéter le test. Vérifiez la technique de pipetage, le mélange des réactifs, et la méthode de lavage de plaque.

Par exemple:
Réplique 1 1,495 Réplique 2 0,975 Réplique 3 1,167

1. Le nombre moyen est Replicate 3 (1,167)
Réplique 1 moins Réplique 3 = 0,328
Réplique 3 moins Réplique 2 =0,192

a) Pas applicable
b) La Réplique 1 est de ≥0,3 différent de La Réplique 3. Jeter Replicate 1. La Réplique 3 n' est pas <0,3 différent de celle de La Réplique 2 ; utiliser les Réplique 2 et 3 pour calculer le PCVA. PCVA (0,975 + 1,167)/2 = 1,071
c) Pas applicable

DO de contrôle négatif a réagi sur YFVA
Identifiez si la variabilité entre les répliques dépasse la limite de variabilité (VL) NCVA de 0,025 DO.

1. Identifiez la réplique avec la valeur médiane et calculez la différence entre elle et les 2 autres valeurs:
   a) Si les valeurs supérieures et inférieures sont de <0,025 différentes de la valeur médiane, utilisez les 3 valeurs pour calculer le NCVA.
   b) Si les valeurs supérieures ou inférieures sont de ≥0,025 de la valeur médiane, jetez la valeur qui est de ≥0,025 autre. Calculez le NCVA en utilisant les 2 valeurs restantes.
   c). Si les valeurs supérieures et inférieures sont de ≥0,025 dela valeur médiane, le test dépasse le VL de la NCVA; répéter le test. Vérifiez la technique de pipetage, le mélange des réactifs, et la méthode de lavage de plaque.

Par exemple:

Réplique 1 0,053 Réplique 2 0,045 Réplique 3 0,063

1. Le nombre moyen est Replicate 1 (0,053).

Réplique 3 moins Réplique 1 = 0,01

Réplique 1 moins Réplique 2 = 0,008

a) Les valeurs supérieures et inférieures sont de <0,025 différentes de la valeur médiane; utiliser les 3 valeurs pour calculer le NCVA. NCVA (0,053 + 0,045 + 0,063)/3 = 0,054

b) Pas applicable

c) Pas applicable

DO de contrôle positif a réagi sur l'antigène normal

Identifiez s'il y a trop de variabilité entre les répliques. Remarque: il n'y a pas de limite de variabilité pour PCNA.

1. Identifiez la réplique avec la Valeur médiane et calculez la différence entre celle-ci et les 2 autres valeurs:
   a) Si les valeurs supérieures et inférieures sont de <0,3 de la valeur médiane, utilisez les 3 valeurs pour calculer le PCNA.
   b) Si les valeurs supérieures ou inférieures sont de ≥0,3 de la valeur médiane, jetez la valeur qui est de ≥0,3 differente. Calculez le PCNA en utilisant les 2 valeurs restantes.
   c) Si les valeurs supérieures et inférieures sont différentes de ≥0,3 de la valeur au milieu, calculez le PCNA en utilisant les 3 valeurs, mais vérifiez la technique de pipetage, le mélange des réactifs et la méthode de lavage des plaques.

Par exemple:

Réplique 1 0,102 Réplique 2 1,345 Réplique 3 0,187

1. *Le nombre moyen est Replicate 3 (0.187).*

   Réplique 2 moins Réplique 3 = 1,158

   Réplique 3 moins Réplique 1 = 0,085

   a) Pas applicable

   b) La réplique 2 est de ≥0,3 différent de La Réplique 3. Jeter Replicate 2. La réplique 1 est <0,3 différente de Celle de La Réplique 3. Utilisez les Réplique 1 et 3 pour calculer le PCNA. PCNA (0,102 + 0,187)/2 e= 0,145

   c) Pas applicable

Performances du kit YF MAC-HD

Durée de conservation/stabilité

Les kits doivent être conservé à 4 ° C pendant 12 mois et ne doivent pas être utilisés après la date d'expiration. Les kits sont à usage unique et les composants ne doivent pas être stockés après ouverture.

Sensibilité analytique (LOD)

En l'absence de norme internationale, une estimation comparative de la sensibilité analytique a été déterminée pour YF MAC-HD en utilisant 3 répliques de chacune des 8 concentrations d'échantillons positifs pour les IgM FJ faibles, moyennes et élevées et comparée à des titrages similaires des échantillons en utilisant le CDC YF MAC-ELISA. Chaque échantillon a été utilisé non dilué, 1: 2, 1: 4, 1: 8, 1:16, 1:32, 1:64, 1: 128, où des dilutions ont été faites dans du sérum humain normal. Les dilutions d'échantillon ont ensuite été diluées jusqu'à la dilution de travail du test pour chaque test en utilisant le diluant d'échantillon approprié, et testées. Des échantillons de sérum positifs pour les IgM FJ faibles, moyens et élevés ont été utilisés.

Test	Ech. No.	Non-dil	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
YF MAC-HD	1 (Faible pos)	POS	POS	**POS**	EQ	EQ	NEG	NEG	NEG
CDC MAC-ELISA		POS	**POS**	EQ	EQ	NEG	NEG	NEG	NEG
YF MAC-HD	2 (Moyen pos)	POS	POS	POS	POS	**POS**	NEG	NEG	NEG
CDC MAC-ELISA		POS	POS	POS	**POS**	EQ	EQ	EQ	EQ
YF MAC-HD	3 (Moyen pos)	POS	POS	**POS**	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
CDC MAC-ELISA		POS	**POS**	EQ	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
YF MAC-HD	4 (Haut pos)	POS	POS	POS	POS	POS	**POS**	EQ	NEG
CDC MAC-ELISA		POS	POS	POS	**POS**	EQ	EQ	NEG	NEG
YF MAC-HD	5 (Haut pos)	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	**POS**
CDC MAC-ELISA		POS	POS	POS	POS	POS	POS	**POS**	EQ

Conclusion: Tous les échantillons ont donné des résultats positifs dans le YF MAC-HD à des dilutions égales ou supérieures à celles du CDC MAC-ELISA de référence.

Spécificité analytique

Des échantillons de sérum contenant des IgM contre des flavivirus autres que le VFJ, des alphavirus et d'autres infections ou substances ont été dosés en utilisant le YF MAC-HD kit Pour déterminer le potentiel du test à détecter uniquement les IgM spécifiques de la fievre jaune.

Virus	No. de spécimens	YF MAC-HD résultats POS	YF MAC-HD résults NEG	% SPECIFICITÉ[4]
Flaviviruses				
Dengue[3]	10	4	6	60
Zika[3]	10	1	9	90
West Nile[2]	20	4	16	80
Powassan[2]	19	6	13	68
Japanese encephalitis[3]	9	5	4	44
St. Louis encephalitis[2]	2	0	2	100
Hepatitis C[3]	20	0	20	100
Alphaviruses				
Chikungunya[3]	2	0	2	100
Eastern equine encephalitis[3]	2	0	2	100
Ross River[2]	11	0	11	100
Autre Infections ou Substances				
Cytomegalovirus[2]	7	2	5	71
Leptospira[2]	7	1	6	85
Epstein-Barr virus[2]	2	1	1	50
Varicella-Zoster virus[1]	1	0	1	100
Malaria[3]	10	9	1	10
Facteur rhumatoïde[3]	3	2	1	33
Antigène humain de leucocyte[1]	3	0	3	100
Anticorps antinuclé [2]	11	1	10	90
Jaunisse obstructive possible[1]	9	0	9	100
Sera de patients rhumatismales[1]	3	1	2	66
Anticorps humain anti-souris[3]	5	0	5	100
Auto-anticorps positif[1]	2	0	2	100
Virus de l'immunodéficience humaine[5]	9	0	9	100

[1] Données des tests effectués par le CDC
[2] Données de CDC et provenant d'essais en laboratoire indépendants
[3] Données provenant d'essais en laboratoire indépendants
[4] Les petits nombres d'échantillons ne peuvent pas refléter les niveaux réels de spécificité
[5] Testé à l'aide de kits fabriqués à l'ATCC avec de sérum séropositif de VIH

Conclusion: Le YF MAC-HD réagit de manière non spécifique avec certains échantillons positifs aux IgM anti-flavivirus arboviraux, en particulier ceux qui ont un titre élevé. Ceci est attendu car l'antigène utilisé dans le kit YF MAC-HD comprend la protéine d'enveloppe qui est connue pour avoir des épitopes à réactivité croisée de flavivirus. Il est cohérent avec la référence CDC YF MAC-ELISA. Les échantillons avec une réaction positive dans le YF MAC-HD doivent être étudiés plus avant en utilisant des méthodes supplémentaires pour confirmer l'infection par la FJ.

Panel de performance clinique

Des échantillons d'Afrique et des Amériques ont été utilisés pour évaluer les performances cliniques du YF MAC-HD

Sensibilité Clinique[1]

YF IgM sérums positifs	No. de spécimens	YF MAC-HD POS résultats	YF MAC-HD NEG résultats	% Sensibilité clinique	Intervalle de confiance à 95%
Haut positif	14	14	0	100%	78.5% - 100%
Moyen positif	13	13	0	100%	77.2% - 100%
Faible positif	3	1	2	33%	6.2% - 79.2%
Totale	30	28	2	93%	78.7% - 98.2%

Spécificité Clinique[1]

	No. de spécimens	YF MAC-HD POS résultats	YF MAC-HD NEG résultats	% Spécificité clinique	Intervalle de confiance à 95%
YF IgM sérums négatifs	50	1	49	98%	89.5% - 99.6%

[1]Données provenant d'essais en laboratoire indépendants.

Études de performances cliniques supplémentaires

Un total de 237 échantillons positifs de référence et 398 échantillons négatifs de référence d'Afrique et d'Amérique du Sud ont donné une sensibilité de 95% et une spécificité de 97% en utilisant les kits YF MAC-HD produits par un fabricant différent utilisant la même méthodologie que l'ATCC. Des panels de compétence composés de 10 à 20 échantillons positifs et négatifs de FJ ont été réalisés dans des laboratoires de 43 pays à travers les continents d'Afrique et des Amériques en utilisant le YF MAC-HD, et 42/43 laboratoires ont obtenu des résultats corrects à 100%.

Utilisation dans les régions endémiques

Quarante-trois laboratoires nationaux d'Afrique et des Amériques ont reçu des kits YF MAC-HD produits par un autre fabricant et des panels de compétences de 10 à 20 échantillons. Quarante-deux des laboratoires ont obtenu des résultats 100% corrects et 1 a obtenu des résultats corrects à 90%. Cela indique que le FJ MAC-HD est utile dans des conditions de laboratoire dans les régions d'endémie FJ.

Précision

La précision intra-essai (répétabilité) a été mesurée en utilisant trois répliques de chacun des 10 échantillons de positivité IgM FJ différente dosés dans le même test au même moment par le même opérateur. Le coefficient de variation (CV) était de 5% (intervalle de 0 à 8%).

La précision inter-essai a été mesurée en utilisant trois réplicats de chacun des 10 échantillons de positivité IgM différente dosés par trois opérateurs différents sur trois jours différents. Le CV était de 14,6% (intervalle de 10 à 18%)

RÉFÉRENCES :

1. Martin DA[1], Muth DA, Brown T, Johnson AJ, Karabatsos N, Roehrig JT. Standardization of immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assays for routine diagnosis of arboviral infections. **J Clin Microbiol. 2000;38(5):1823-6.**
2. Basile AJ, Goodman C, Horiuchi K, Laven J, Panella AJ, Kosoy O, Lanciotti R, Johnson BW. Development and validation of an ELISA kit (YF MAC-HD) to detect IgM to yellow fever virus. **Journal of Virological Methods. 2015; 225:41-48.**
3. Goodman C, Demanou M, Mulders M, Mendez-Rico J, Basile AJ. Technical viability of the YF MAC-HD ELISA kit for use in yellow fever-endemic regions. **PLOS Neglected Tropical Diseases. 2021; 15(6): e0009417.**