



---

# EIAgen

## HCV Ab (v.4) Kit

---

REF 071067

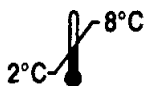
$\Sigma$  96

REF 071064

$\Sigma$  192

REF 071068

$\Sigma$  480



IVD

CE 0459

This package insert must be read carefully before product use.

Package insert instructions must be carefully followed.

Reliability of assay results cannot be guaranteed if there are any deviations from the instructions in this package.



**Manufacturer:**

**Adaltis S.r.l**

Via Durini, 27






















20122 Milano (Italy)

Tel. +39-0774-5791 - Fax +39-0774-353085

[www.adaltis.net](http://www.adaltis.net)

en

**SYMBOLS USED ON LABELS**

<p align="center"><b>English</b> <b>EN</b></p>							
	In Vitro Diagnostic Medical Device	Catalogue Number	Lot Number	Attention, See Instructions For Use	Temperature Limitation	Use By	Number of Test
							
	Manufacturer	Keep away from Sunlight	Date of Manufacture	Microplate	Positive Control	Negative Control	Calibrator
							
	Conjugate	Sample Diluent	Substrate TMB	Stop Solution (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,3 M)	Wash Buffer Conc. (20x)	Assay Diluent	Reconstitute with x mL

## A. INTENDED USE

Fourth generation Enzyme ImmunoAssay (ELISA) for the determination of antibodies to Hepatitis C Virus in human plasma (EDTA, Heparin and Citrate) and sera. The kit may be used for the screening of blood units of HCV-infected patients.

For "in vitro" diagnostic use only.

## B. INTRODUCTION

The World Health Organization (WHO) define Hepatitis C infection as follows:

"Hepatitis C is a viral infection of the liver which had been referred to as parenterally transmitted "non A, non B hepatitis" until identification of the causative agent in 1989. The discovery and characterization of the hepatitis C virus (HCV) led to the understanding of its primary role in post transfusion hepatitis and its tendency to induce persistent infection.

HCV is a major cause of acute hepatitis and chronic liver disease, including cirrhosis and liver cancer. Globally, an estimated 170 million persons are chronically infected with HCV and 3 to 4 million persons are newly infected each year. HCV is spread primarily by direct contact with human blood. The major causes of HCV infection worldwide are use of unscreened blood transfusions, and re-use of needles and syringes that have not been adequately sterilized. No vaccine is currently available to prevent hepatitis C and treatment for chronic hepatitis C is too costly for most persons in developing countries to afford. Thus, from a global perspective, the greatest impact on hepatitis C disease burden will likely be achieved by focusing efforts on reducing the risk of HCV transmission from nosocomial exposures (e.g. blood transfusions, unsafe injection practices) and high-risk behaviours (e.g. injection drug use).

Hepatitis C virus (HCV) is one of the viruses (A, B, C, D, and E), which together account for the vast majority of cases of viral hepatitis. It is an enveloped RNA virus in the flaviviridae family which appears to have a narrow host range. Humans and chimpanzees are the only known species susceptible to infection, with both species developing similar disease. An important feature of the virus is the relative mutability of its genome, which in turn is probably related to the high propensity (80%) of inducing chronic infection. HCV is clustered into several distinct genotypes which may be important in determining the severity of the disease and the response to treatment.

The incubation period of HCV infection before the onset of clinical symptoms ranges from 15 to 150 days. In acute infections, the most common symptoms are fatigue and jaundice; however, the majority of cases (between 60% and 70%), even those that develop chronic infection, are asymptomatic. About 80% of newly infected patients progress to develop chronic infection. Cirrhosis develops in about 10% to 20% of persons with chronic infection, and liver cancer develops in 1% to 5% of persons with chronic infection over a period of 20 to 30 years. Most patients suffering from liver cancer who do

not have hepatitis B virus infection have evidence of HCV infection. The mechanisms by which HCV infection leads to liver cancer are still unclear. Hepatitis C also exacerbates the severity of underlying liver disease when it coexists with other hepatic conditions. In particular, liver disease progresses more rapidly among persons with alcoholic liver disease and HCV infection. HCV is spread primarily by direct contact with human blood. Transmission through blood transfusions that are not screened for HCV infection, through the reuse of inadequately sterilized needles, syringes or other medical equipment, or through needle-sharing among drug-users, is well documented. Sexual and perinatal transmission may also occur, although less frequently. Other modes of transmission such as social, cultural, and behavioural practices using percutaneous procedures (e.g. ear and body piercing, circumcision, tattooing) can occur if inadequately sterilized equipment is used. HCV is not spread by sneezing, hugging, coughing, food or water, sharing eating utensils, or casual contact.

In both developed and developing countries, high risk groups include injecting drug users, recipients of unscreened blood, haemophiliacs, dialysis patients and persons with multiple sex partners who engage in unprotected sex. In developed countries, it is estimated that 90% of persons with chronic HCV infection are current and former injecting drug users and those with a history of transfusion of unscreened blood or blood products. In many developing countries, where unscreened blood and blood products are still being used, the major means of transmission are unsterilized injection equipment and unscreened blood transfusions. In addition, people who use traditional scarification and circumcision practices are at risk if they use or re-use unsterilized tools.

WHO estimates that about 170 million people, 3% of the world's population, are infected with HCV and are at risk of developing liver cirrhosis and/or liver cancer. The prevalence of HCV infection in some countries in Africa, the Eastern Mediterranean, South-East Asia and the Western Pacific (when prevalence data are available) is high compared to some countries in North America and Europe.

Diagnostic tests for HCV are used to prevent infection through screening of donor blood and plasma, to establish the clinical diagnosis and to make better decisions regarding medical management of a patient. Diagnostic tests commercially available today are based on Enzyme immunoassay (EIA) for the detection of HCV specific antibodies. EIAs can detect more than 95% of chronically infected patients but can detect only 50% to 70% of acute infections. A recombinant immunoblot assay (RIBA) that identifies antibodies which react with individual HCV antigens is often used as a supplemental test for confirmation of a positive EIA result. Testing for HCV circulating by amplification tests RNA (e.g. polymerase chain reaction or PCR, branched DNA assay) is also being utilized for confirmation of serological results as well as for assessing the effectiveness of antiviral therapy. A positive result indicates the presence of active infection and a potential for spread of the infection and or/the development of chronic liver disease.

Antiviral drugs such as interferon taken alone or in combination with ribavirin, can be used for the treatment of persons with chronic hepatitis C, but the cost of treatment is very high. Treatment with interferon alone is effective in about 10% to 20% of patients. Interferon combined with ribavirin is effective in about 30% to 50% of patients. Ribavirin does not appear to be effective when used alone.

There is no vaccine against HCV. Research is in progress but the high mutability of the HCV genome complicates vaccine development. Lack of knowledge of any protective immune response following HCV infection also impedes vaccine research. It is not known whether the immune system is able to eliminate the virus.

Some studies, however, have shown the presence of virus neutralizing antibodies in patients with HCV infection. In the absence of a vaccine, all precautions to prevent infection must be taken including (a) screening and testing of blood and organ donors; (b) Virus inactivation of plasma derived products; (c) implementation and maintenance of infection control practices in health care settings, including appropriate sterilization of medical and dental equipment; (d) promotion of behaviour change among the general public and health care workers to reduce overuse of injections and to use safe injection practices; and (e) Risk reduction counselling for persons with high-risk drug and sexual practices. “

The genome encodes for structural components, a nucleocapsid protein and two envelope glycoproteins, and functional constituents involved in the virus replication and protein processing. The nucleocapsid-encoding region seems to be the most conservative among the isolates obtained all over the world.

### C. PRINCIPLE OF THE TEST

Microplates are coated with HCV-specific antigens derived from “core” and “ns” regions encoding for conservative and immunodominant antigenic determinants (Core peptide, recombinant NS3, NS4 and NS5 peptides).

The solid phase is first treated with the diluted sample and HCV Ab are captured, if present, by the antigens. After washing out all the other components of the sample, in the 2nd incubation bound HCV antibodies, IgG and IgM as well, are detected by the addition of polyclonal specific anti hlgG&M antibodies, labelled with peroxidase (HRP).

The enzyme captured on the solid phase, acting on the substrate TMB mixture, generates an optical signal that is proportional to the amount of anti HCV antibodies present in the sample. A cut-off value let optical densities be interpreted into HCV antibody negative and positive results.

### D. COMPONENTS

The kit contains reagents for 96 tests (code 071067), 192 tests (code 071064), or 480 tests (code 071068).

<b>Microplate</b>	1
<b>Negative Control</b>	1x4 mL/vial
<b>Positive Control</b>	1x2 mL/vial
<b>Calibrator</b>	2 vials
<b>Wash Buffer Concentrate 20x</b>	1x50 mL/vial
<b>Conjugate</b>	1x16 mL/vial
<b>Sample Diluent</b>	1x50 mL/vial
<b>Substrate TMB</b>	1x16 mL/vial
<b>Stop Solution</b>	1x15 mL/vial
<b>Assay Diluent</b>	1x8 mL/vial
<b>Plate sealing foils</b>	2
<b>Number of tests</b>	96
<b>Code</b>	071067

<b>Microplate</b>	2
<b>Negative Control</b>	2x4 mL/vial
<b>Positive Control</b>	1x4 mL/vial
<b>Calibrator</b>	3 vials
<b>Wash Buffer Concentrate 20x</b>	2x50 mL/vials
<b>Conjugate</b>	2x16 mL/vials
<b>Sample Diluent</b>	2x50 mL/vials
<b>Substrate TMB</b>	2x16 mL/vials
<b>Stop Solution</b>	2x15 mL/vial
<b>Assay Diluent</b>	2x8 mL/vial
<b>Plate sealing foils</b>	4
<b>Number of tests</b>	192
<b>Code</b>	071064

<b>Microplate</b>	5
<b>Negative Control</b>	1x20 mL/vial
<b>Positive Control</b>	1x10 mL/vial
<b>Calibrator</b>	7 vials
<b>Wash Buffer Concentrate 20x</b>	5x50 mL/vials
<b>Conjugate</b>	2x40 mL/vial
<b>Sample Diluent</b>	5x50 mL/vials
<b>Substrate TMB</b>	2x40 mL/vials
<b>Stop Solution</b>	2x40 mL/vial
<b>Assay Diluent</b>	1x40 mL/vial
<b>Plate sealing foils</b>	10
<b>Number of tests</b>	480
<b>Code</b>	071068

#### 1. Microplate

12 strips of 8 microwells coated with Core peptide, recombinant NS3, NS4 and NS5 peptides. Plates are sealed into a aluminium pouch with desiccant.

Bring the microplate to room temperature (18...24°C) before opening the bag. Unused strips have to be returned into the pouch and the pouch has to be sealed and stored back to 2...8°C, in presence of the desiccant.

#### 2. Negative Control

Ready to use control. It contains 10 mM Na-citrate buffer pH 6.0 ± 0.1, 2% casein as protein base and 0.1% Kathon CG as preservative. The negative control is olive green colour coded.

#### 3. Positive Control

Ready to use control. It contains 1% goat serum proteins, human antibodies positive to HCV, 10 mM Na-citrate buffer pH 6.0 ± 0.1, 0.5% Tween 20, 0.09% Na-azide and 0.1% Kathon CG as preservatives. The Positive Control is dark green colour coded.

**Important Note:** The absence of viable pathogens in the Positive Control can not be fully ensured, and therefore,

*the reagent should be handled as potentially biohazardous, in accordance with good laboratory practices.*

#### 4. Calibrator

Lyophilized calibrator. To be dissolved with the volume of EIA grade water reported on the label. It contains foetal bovine serum proteins, human antibodies to HCV whose content is calibrated on the NIBSC Working Standard code 06/188-006, 10 mM Na-citrate buffer pH 6.0 ± 0.1, 0.3 mg/mL gentamicin sulfate and 0.1% Kathon CG as preservatives.

**Important Note:** *The absence of viable pathogens in the Calibrator can not be fully ensured, and therefore, the reagent should be handled as potentially biohazardous, in accordance with good laboratory practices.*

**Note:** *The volume necessary to dissolve the content of the vial may vary from lot to lot. Please use the right volume reported on the label.*

#### 5. Wash Buffer Concentrate 20x

20x concentrated solution. Once diluted, the wash solution (wash buffer diluted) contains 10 mM phosphate buffer pH 7.0 ± 0.2, 0.05% Tween 20 and 0.05% Kathon CG.

Once diluted, the wash solution is stable for 1 week at 2...8°C.

#### 6. Conjugate

Ready to use and red colour coded reagent. It contains Horseradish Peroxidase conjugated goat polyclonal antibodies to human IgG and IgM, 5% BSA, 10 mM Citrate buffer pH 6.4 ± 0.1, 0.1% Proclin and 0.05% Tween 20 as preservatives.

#### 7. Substrate TMB

Ready-to-use component. It contains 50 mM citrate-phosphate buffer pH 3.5-3.8, 4% dimethylsulphoxide, 0.03% tetra-methyl-benzidine or TMB and 0.02% hydrogen peroxide or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Mix gently before use.

**Note:** *To be stored protected from light as sensitive to strong illumination.*

#### 8. Assay diluent

Ready-to-use component. It contains goat serum, 10 mM tris buffered solution pH 8.0 ± 0.1 containing 0.1% Kathon CG and 0.09% Na azide for the pre-treatment of samples and controls in the plate, blocking interference.

#### 9. Stop Solution

Ready-to-use component.

It contains 0.3 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution. Mix gently before use.

**The MSDS is available upon request of laboratory personnel.**

#### 10. Sample Diluent

Ready-to-use component and dark green colour coded. It contains 1% casein, 10 mM Na-citrate buffer pH 6.0 ± 0.1 and 0.1% Kathon CG as preservative.

To be used to dilute the sample.

**Note:** *The diluent changes colour from olive green to dark bluish green in the presence of sample.*

#### E. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

1. Calibrated Micropipettes (200 µL and 10 µL) and disposable plastic tips.
2. EIA grade water (bidistilled or deionised, charcoal treated to remove oxidizing chemicals used as disinfectants).
3. Timer with 60 minute range or higher.
4. Absorbent paper tissues.
5. Calibrated ELISA microplate thermostatic incubator capable to provide a temperature of +37°C.
6. Calibrated ELISA microwell reader with 450nm (reading) and possibly with 620-630nm (blanking) filters.
7. Calibrated ELISA microplate washer.
8. Vortex or similar mixing tools.

#### F. WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. The kit has to be used by skilled and properly trained technical personnel only, under the supervision of a medical doctor responsible of the laboratory. This package insert must be read carefully before product use.
2. When the kit is used for the screening of blood units and blood components, it has to be used in a laboratory certified and qualified by the national authority in that field (Ministry of Health or similar entity) to carry out this type of analysis.
3. All the personnel involved in performing the assay have to wear protective laboratory clothes, talc-free gloves and glasses. The use of any sharp (needles) or cutting (blades) devices should be avoided. All the personnel involved should be trained in biosafety procedures, as recommended by the Center for Disease Control, Atlanta, U.S. and reported in the National Institute of Health's publication: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
4. All the personnel involved in sample handling should be vaccinated for HBV and HAV, for which vaccines are available, safe and effective.
5. The laboratory environment should be controlled so as to avoid contaminants such as dust or air-born microbial agents, when opening kit vials and microplates and when performing the test. Protect the Substrate (TMB) from strong light and avoid vibration of the bench surface where the test is undertaken.
6. Upon receipt, store the kit at 2...8°C into a temperature controlled refrigerator or cold room.
7. Do not interchange components between different lots of the kits. It is recommended that components between two kits of the same lot should not be interchanged.
8. Check that the reagents are clear and do not contain visible heavy particles or aggregates. If not, advise the laboratory supervisor to initiate the necessary procedures for kit replacement.
9. Avoid cross-contamination between serum/plasma samples by using disposable tips and changing them after each sample.
10. Avoid cross-contamination between kit reagents by using disposable tips and changing them between the use of each one.
11. Do not use the kit after the expiration date stated on the external container and internal (vials) labels.

12. Treat all specimens as potentially infective. All human serum specimens should be handled at Biosafety Level 2, as recommended by the Center for Disease Control, Atlanta, U.S. in compliance with what reported in the Institutes of Health's publication: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
13. The use of disposable plastic-ware is recommended in the preparation of the liquid components or in transferring components into automated workstations, in order to avoid cross contamination.
14. Waste produced during the use of the kit has to be discarded in compliance with national directives and laws concerning laboratory waste of chemical and biological substances. In particular, liquid waste generated from the washing procedure, from residuals of controls and from samples has to be treated as potentially infective material and inactivated before waste. Suggested procedures of inactivation are treatment with a 10% final concentration of household bleach for 16-18 hrs or heat inactivation by autoclave at 121°C for 20 min.
15. Accidental spills from samples and operations have to be adsorbed with paper tissues soaked with household bleach and then with water. Tissues should then be discarded in proper containers designated for laboratory/hospital waste.
16. The Stop Solution contains 0.3M sulphuric acid. Avoid contact with skin and eyes. In the event of contact, rinse immediately with plenty of water.
17. Dispose of reagent solutions containing sodium azide as preservatives according to all local, state and national regulations. To dispose of reagents containing azide, flush away using copious amounts of water. Dispose with caution as sodium azide can form explosive compounds on prolonged contact with lead or copper piping.
18. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas in which specimens or kit reagents are handled
19. Other waste materials generated from the use of the kit (example: tips used for samples and controls, used microplates) should be handled as potentially infective and disposed according to national directives and laws concerning laboratory wastes.
20. Do not pipette by mouth.

#### G. SPECIMEN: PREPARATION AND RECCOMANDATIONS

1. Blood is drawn aseptically by venepuncture and plasma or serum is prepared using standard techniques of preparation of samples for clinical laboratory analysis. No influence has been observed in the preparation of the sample with citrate, EDTA and heparin.
2. Avoid any addition of preservatives to samples; especially sodium azide as this chemical would affect the enzymatic activity of the conjugate, generating false negative results.
3. Samples have to be clearly identified with codes or names in order to avoid misinterpretation of results. When the kit is used for the screening of blood units, bar code labeling and electronic reading is strongly recommended.
4. Haemolysed (red) and visibly hyperlipemic ("milky") samples have to be discarded as they could

generate false results. Samples containing residues of fibrin or heavy particles or microbial filaments and bodies should be discarded as they could give rise to false results.

5. Sera and plasma can be stored at +2°...8°C for up to five days after collection. For longer storage periods, samples can be stored frozen at -20°C for several months. Any frozen samples should not be frozen/thawed more than once as this may generate particles that could affect the test result.
6. If particles are present, centrifuge at 2.000 rpm for 20 min or filter using 0.2-0.8µ filters to clean up the sample for testing.

#### H. PREPARATION OF COMPONENTS AND WARNINGS

A study conducted on an opened kit has not pointed out any relevant loss of activity up to 1 re-use of the device and up to 6 months.

##### 1. Microplates:

Allow the microplate to reach room temperature (about 1 hr) before opening the pouch. Check that the desiccant has not turned to dark green, indicating a defect in manufacturing. In this case, call Adaltis's customer service.

Unused strips have to be placed back inside the aluminium pouch, with the desiccant supplied, firmly zipped and stored at +2°...8°C. After first opening, remaining strips are stable until the humidity indicator inside the desiccant bag turns from yellow to green.

##### 2. Negative Control:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

##### 3. Positive Control:

Ready to use. Mix well on vortex before use. Handle this component as potentially infectious.

##### 4. Calibrator:

Dissolve carefully the content of the lyophilised vial with the volume of EIA grade water reported on its label. Mix well on vortex before use.

Handle this component as potentially infectious.

**Note:** When dissolved the Calibrator is not stable. Store in aliquots at -20°C.

##### 5. Wash Buffer Concentrate 20x (vial of 50 mL):

The whole content of the 20x concentrated solution has to be diluted with EIA grade water up to 1000 mL (the volume is reported on the label) and mixed gently end-over-end before use. As some salt crystals may be present into the vial, take care to dissolve all the content when preparing the solution. During preparation avoid foaming as the presence of bubbles could impact on the efficiency of the washing cycles.

**Note:** Once diluted, the wash solution is stable for 1 week at +2...8°C.

##### 6. Conjugate:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Be careful not to contaminate the liquid with oxidizing chemicals, air-driven dust or microbes. If this component has to be transferred use only plastic, possibly sterile disposable containers.

### 7. Substrate TMB:

Ready to use. Mix well on vortex before use. Avoid contamination of the liquid with oxidizing chemicals, air-driven dust or microbes. Do not expose to strong illumination, oxidizing agents and metallic surfaces. If this component has to be transferred use only plastic, and if possible, sterile disposable container.

### 8. Assay Diluent:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

### 9. Stop Solution:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

### 10. Sample Diluent:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

## I. INSTRUMENTS AND TOOLS USED IN COMBINATION WITH THE KIT

1. Micropipettes have to be calibrated to deliver the correct volume required by the assay and must be submitted to regular decontamination (household alcohol, 10% solution of bleach, hospital grade disinfectants) of those parts that could accidentally come in contact with the sample or the components of the kit. They should also be regularly maintained in order to show a precision of 1% and a trueness of  $\pm 2\%$ . Decontamination of spills or residues of kit components should also be carried out regularly.
2. The ELISA incubator has to be set at  $+37^{\circ}\text{C}$  (tolerance of  $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ) and regularly checked to ensure the correct temperature is maintained. Both dry incubators and water baths are suitable for the incubations, provided that the instrument is validated for the incubation of ELISA tests.
3. The ELISA washer is extremely important to the overall performances of the assay. The washer must be carefully validated and correctly optimized. Usually 4-5 washing cycles (aspiration + dispensation of  $350\mu\text{l/well}$  of washing solution = 1 cycle) are sufficient to ensure that the assay performs as expected. A soaking time of 20-30 seconds between cycles is suggested. In order to set correctly their number, it is recommended to run an assay with the kit controls/calibrator and well-characterized negative and positive reference samples, and check to match the values reported below in sections O "Internal Quality Control". Regular calibration of the volumes delivered and maintenance (decontamination and cleaning of needles) of the washer has to be carried out according to the instructions of the manufacturer.
4. Incubation times have a tolerance of  $\pm 5\%$ .
  - ✓ Short Incubation Method (for 1<sup>st</sup> / 2<sup>nd</sup> incubation tolerance between 43 min to 47 min; for 3<sup>rd</sup> incubation tolerance between 14 and 16 min).
  - ✓ Standard Incubation Method (for 1<sup>st</sup> incubation tolerance between 57 min to 63 min; for 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> incubation tolerance between 29 and 31 min).
5. The ELISA microplate reader has to be equipped with a reading filter of 450nm and ideally with a second filter (620-630nm) for blanking purposes. Its standard performances should be (a) bandwidth  $\leq 10\text{ nm}$ ; (b) absorbance range from 0 to  $\geq 2.0$ ; (c) linearity to  $\geq 2.0$ ;

repeatability  $\geq 1\%$ . Blanking is carried out on the well identified in section "Assay Procedure". The optical system of the reader has to be calibrated regularly to ensure that the correct optical density is measured. It should be regularly maintained according to the manufacturer's instructions.

6. When using an ELISA automated work station, all critical steps (dispensation, incubation, washing, reading, shaking, data handling) have to be carefully set, calibrated, controlled and regularly serviced in order to match the values reported in sections O "Internal Quality Control". The assay protocol has to be installed in the operating system of the unit and validated as for the washer and the reader. In addition, the liquid handling part of the station (dispensation and washing) has to be validated and correctly set. Particular attention must be paid to avoid carry over by the needles used for dispensing samples and for washing. This must be studied and controlled to minimize the possibility of contamination of adjacent wells due to strongly reactive samples, leading to false positive results. The use of ELISA automated work stations is recommended for blood screening and when the number of samples to be tested exceed 20-30 units per run.

## L. PRE ASSAY CONTROLS AND OPERATIONS

1. Check the expiration date of the kit printed on the external label of the kit box. Do not use if expired.
2. Check that the liquid components are not contaminated by naked-eye visible particles or aggregates. Check that the Substrate TMB is colorless or pale blue by aspirating a small volume of it with a sterile transparent plastic pipette. Check that no breakage occurred in transportation and no spillage of liquid is present inside the box. Check that the aluminum pouch, containing the microplate, is not punctured or damaged.
3. Dilute all the content of the 20x concentrated Wash Buffer as described above.
4. Dissolve the Calibrator as described above.
5. Allow all the other components to reach room temperature (about 1 hr) and then mix as described.
6. Set the ELISA incubator at  $+37^{\circ}\text{C}$  and prepare the ELISA washer by priming with the diluted wash solution, according to the manufacturers instructions. Set the right number of washing cycles as found in section I.3.
7. Check that the ELISA reader has been turned on at least 20 minutes before reading.
8. If using an automated workstation, turn it on, check settings and be sure to use the right assay protocol.
9. Check that the micropipettes are set to the required volume.
10. Check that all the other equipment is available and ready to use.
11. In case of problems, do not proceed further with the test and advise the supervisor.

## M. ASSAY PROCEDURE

The assay has to be carried out according to what reported below, taking care to maintain the same incubation time for all the samples in testing.

The Assay Procedure can be done with two times incubation procedures. Choose the one that is required by your regulation:

1. Standard Incubation (1<sup>st</sup> incubation 60 minutes, 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> incubation 30 minutes)
2. Short Incubation (1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> incubation 45 minutes, 3<sup>rd</sup> incubation 15 minutes)

**1. Standard Incubation - Manual assay:**

1. Place the required number of microwells in the microwell holder. Leave the 1st well empty for the operation of blanking.
2. Dispense 200 µL of Negative Control in triplicate, 200 µL Calibrator in duplicate and 200 µL Positive Control in single in proper wells. Do not dilute Controls and Calibrator as they are pre-diluted, ready to use!
3. Add 200 µL of Sample Diluent to all the sample wells; then dispense 10 µL sample in each properly identified well. Mix gently the plate, avoiding overflowing and contaminating adjacent wells, in order to fully disperse the sample into its diluent.

**Important note:** Check that the colour of the Sample Diluent, upon addition of the sample, changes from light green to dark bluish green, monitoring that the sample has been really added.

4. Dispense 50 µL Assay Diluent into all the controls/calibrator and sample wells. Check that the color of samples has turned to dark blue.
5. Incubate the microplate for **60 min at +37°C**.  
Important note: Strips have to be sealed with the adhesive sealing foil, supplied, only when the test is carried out manually. Do not cover strips when using ELISA automatic instruments.
6. Wash the microplate with an automatic washer by delivering and aspirating 350 µL/well of diluted wash solution as reported in section I.3.
7. Pipette 100 µL Enzyme Conjugate into each well, except the 1st blanking well, and cover with the sealer. Check that this red coloured component has been dispensed in all the wells, except A1.

**Important note:** Be careful not to touch the plastic inner surface of the well with the tip filled with the Enzyme Conjugate. Contamination might occur.

8. Incubate the microplate for **30 min at +37°C**.
9. Wash microwells as reported in section I.3.
10. Pipette 100 µL Substrate TMB mixture into each well, the blank well included. Then incubate the microplate at room temperature (18-24°C) for **30 minutes**.

**Important note:** Do not expose to strong direct illumination. High background might be generated.

11. Pipette 100 µL Stop Solution into all the wells using the same pipetting sequence as in step 10 to stop the enzymatic reaction. Addition of stop solution will turn the positive control and positive samples from blue to yellow.
12. Measure the colour intensity of the solution in each well, as described in section I.5, at 450nm filter

(reading) and possibly at 620-630nm (background subtraction), blanking the instrument on A1.

**Important notes:**

1. If the second filter is not available, ensure that no finger prints are present on the bottom of the microwell before reading at 450nm. Finger prints could generate false positive results on reading.
2. Reading has should ideally be performed immediately after the addition of the Stop Solution but definitely no longer than 20 minutes afterwards. Some self oxidation of the substrate can occur leading to a higher background.
3. Shaking at 350 ±150 rpm during incubation has been proved to increase the sensitivity of the assay of about 20%.

**2. Short Incubation - Manual assay:**

1. Place the required number of Microwells in the microwell holder. Leave the 1st well empty for the operation of blanking.
2. Dispense 200 µL of Negative Control in triplicate, 200 µL Calibrator in duplicate and 200 µL Positive Control in single in proper wells. Do not dilute Controls and Calibrator as they are pre-diluted, ready to use!
3. Add 200 µL of Sample Diluent to all the sample wells; then dispense 10 µL sample in each properly identified well. Mix gently the plate, avoiding overflowing and contaminating adjacent wells, in order to fully disperse the sample into its diluent.

**Important note:** Check that the colour of the Sample Diluent, upon addition of the sample, changes from light green to dark bluish green, monitoring that the sample has been really added.

4. Dispense 50 µL Assay Diluent into all the controls/calibrator and sample wells. Check that the color of samples has turned to dark blue.
5. Incubate the microplate for **45 min at +37°C**.  
Important note: Strips have to be sealed with the adhesive sealing foil, supplied, only when the test is carried out manually. Do not cover strips when using ELISA automatic instruments.
6. Wash the microplate with an automatic washer by delivering and aspirating 350 µL/well of diluted washing solution as reported in section I.3.
7. Pipette 100 µL Enzyme Conjugate into each well, except the 1st blanking well, and cover with the sealer. Check that this red coloured component has been dispensed in all the wells, except A1.

**Important note:** Be careful not to touch the plastic inner surface of the well with the tip filled with the Enzyme Conjugate. Contamination might occur.

8. Incubate the microplate for **45 min at +37°C**.
9. Wash microwells as reported in section I.3.
10. Pipette 100 µL Substrate TMB mixture into each well, the blank well included. Then incubate the microplate at room temperature (18-24°C) for **15 minutes**.



**Important note:** Do not expose to strong direct illumination. High background might be generated.

- Pipette 100 µL Stop Solution into all the wells using the same pipetting sequence as in step 10 to stop the enzymatic reaction. Addition of stop solution will turn the positive control and positive samples from blue to yellow.
- Measure the colour intensity of the solution in each well, as described in section I.5, at 450nm filter (reading) and possibly at 620-630nm (background subtraction), blanking the instrument on A1.

**Important notes:**

- If the second filter is not available, ensure that no finger prints are present on the bottom of the microwell before reading at 450nm. Finger prints could generate false positive results on reading.
- Reading has should ideally be performed immediately after the addition of the Stop Solution but definitely no longer than 20 minutes afterwards. Some self oxidation of the substrate can occur leading to a higher background.
- Shaking at 350 ±150 rpm during incubation has been proved to increase the sensitivity of the assay of about 20%.

**N. ASSAY SCHEME**

Method	Operations (Standard Incubation)	Operations (Short Incubation)
Controls & Calibrator	200 µL	200 µL
Sample Diluent & Sample	200 µL diluent.+ 10 µL sample	200 µL diluent.+ 10 µL sample
Assay Diluent	50 µL	50 µL
<b>1st incubation</b>	<b>60 min (± 3)</b>	<b>45 min (± 2)</b>
Temperature	+37°C	+37°C
Wash step	4-5 cycles	4-5 cycles
Enzyme Conjugate	100 µL	100 µL
<b>2nd incubation</b>	<b>30 min (± 1)</b>	<b>45 min (± 2)</b>
Temperature	+37°C	+37°C
Wash step	4-5 cycles	4-5 cycles
Substrate TMB	100 µL	100 µL
<b>3rd incubation</b>	<b>30 min (± 1)</b>	<b>15 min (± 1)</b>
Temperature	Room temperature (18...24°C)	Room temperature (18...24°C)
Stop Solution	100 µL	100 µL
Reading OD	450/620nm	450/620nm

An example of dispensation scheme is reported below (valid for both incubation time procedures):

**Microplate**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	S2										
B	NC	S3										
C	NC	S4										
D	NC	S5										
E	CAL	S6										
F	CAL	S7										
G	PC	S8										
H	S1	S9										

Legenda: BLK = Blank NC = Negative Control  
CAL = Calibrator PC = Positive Control S = Sample

**O. INTERNAL QUALITY CONTROL**

A check is carried out on the controls and the calibrator any time the kit is used in order to verify whether their OD450/620nm values are as expected and reported in the table below.

Check	Requirements
Blank well	< 0.100 OD 450/620nm value
Negative Control (NC)	< 0.050 mean OD450/620nm after blanking
Calibrator	S/Co >1.1
Positive Control	>1.000 OD450/620nm value

If the results of the test match the requirements stated above, proceed to the next section.

If they do not, do not proceed any further and perform the following checks:

Problems	Check
<b>Blank well</b> > 0.100 OD450nm	<ol style="list-style-type: none"> <li>that the Substrate solution has not become contaminated during the assay</li> </ol>
<b>Negative Control (NC)</b> > 0.050 OD450nm after blanking	<ol style="list-style-type: none"> <li>that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study;</li> <li>that the proper washing solution has been used and the washer has been primed with it before use;</li> <li>that no mistake has been done in the assay procedure (dispensation of positive control instead of the negative one);</li> <li>that no contamination of the negative control or of the wells where the control was dispensed has occurred due to spills of positive samples or of the enzyme conjugate;</li> <li>that micropipettes have not become contaminated with positive samples or with the enzyme conjugate</li> <li>that the washer needles are not blocked or partially obstructed.</li> </ol>
<b>Calibrator</b> S/Co<1.1	<ol style="list-style-type: none"> <li>that the procedure has been correctly performed;</li> <li>that no mistake has occurred during its distribution (ex.: dispensation of negative control instead of calibrator)</li> <li>that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study;</li> <li>that no external contamination of the calibrator has occurred.</li> </ol>
<b>Positive Control</b> <1.000 OD450nm	<ol style="list-style-type: none"> <li>that the procedure has been correctly performed;</li> <li>that no mistake has occurred during the distribution of the control (dispensation of negative control instead of positive control. In this case, the negative control will have an OD450nm value &gt; 0.150,too.</li> <li>that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study;</li> <li>that no external contamination of the positive control has occurred.</li> </ol>

If any of the above problems have occurred, report the problem to the supervisor for further actions.

## P. RESULTS

The tests results are calculated by means of a cut-off value determined with the following formula:

$$\text{Cut-Off (Co)} = \text{NC mean} + 0.350$$

The value found for the test is used for the interpretation of results as described in the next paragraph.

## Q. INTERPRETATION OF RESULTS

Test results are interpreted as ratio of the sample OD450nm and the Cut-Off value (or S/Co) according to the following table:

S/Co	Interpretation
< 0.9	Negative
0.9 - 1.1	Equivocal
> 1.1	Positive

A negative result indicates that the patient has not been infected by HCV or that the blood unit may be transfused. Any patient showing an equivocal result should be tested again on a second sample taken 1-2 weeks later from the patient and examined. The blood unit should not be transfused.

A positive result is indicative of HCV infection and therefore the patient should be treated accordingly or the blood unit should be discarded.

### Important notes:

1. Interpretation of results should be done under the supervision of the responsible of the laboratory to reduce the risk of judgement errors and misinterpretations.
2. Any positive result should be confirmed by an alternative method capable to detect IgG and IgM antibodies (confirmation test) before a diagnosis of viral hepatitis is formulated.
3. As proved in the Performance Evaluation of the product, the assay is able to detect seroconversion to anti HCV core antibodies **earlier** than some other commercial kits. Therefore a positive result, not confirmed with these commercial kits, does not have to be ruled out as a false positive result ! The sample has to be anyway submitted to a confirmation test.
4. As long as the assay is able to detect also IgM antibodies some discrepant results with other commercial products for the detection of anti HCV antibodies - lacking anti hIgM conjugate in the formulation of the enzyme tracer and therefore missing IgM reactivity - may be present. The real positivity of the sample for antibodies to HCV should be then confirmed by examining also IgM reactivity, important for the diagnosis of HCV infection.
5. When test results are transmitted from the laboratory to an informatics centre, attention has to be done to avoid erroneous data transfer.
6. Diagnosis of viral hepatitis infection has to be done and released to the patient only by a qualified medical doctor.

An example of calculation is reported below:

The following data must not be used instead of real figures obtained by the user.

Negative Control: 0.019 – 0.020 – 0.021 OD450nm

Mean Value: 0.020 OD450nm Lower than 0.050 – Accepted

Positive Control: 2.189 OD450nm  
Higher than 1.000 – Accepted

Cut-Off = 0.020+0.350 = 0.370  
Calibrator: 0.550 - 0.530 OD450nm  
Mean value: 0.540 OD450nm S/Co = 1.4  
S/Co higher than 1.1 – Accepted

Sample 1: 0.070 OD450nm  
Sample 2: 1.690 OD450nm  
Sample 1 S/Co < 0.9 = negative  
Sample 2 S/Co > 1.1 = positive

## R. PERFORMANCES

Evaluation of Performances has been conducted in accordance to what reported in the Common Technical Specifications or CTS (art. 5, Chapter 3 of IVD Directive 98/79/EC) and with both incubation procedures (standard and short).

### 1. LIMIT OF DETECTION

The limit of detection of the assay has been calculated using the short incubation assay by means of the British Working Standard for anti-HCV, NIBSC code 06/188-006. The table below reports the mean OD450nm values of this standard when diluted in negative plasma and then examined.

Dilution	Lot#1	Lot#2	Lot#3
Factor	S/Co	S/Co	S/Co
1 X	3,50	4,00	4,30
2 X	2,10	2,60	2,60
4 X	1,3	1,40	1,30
Negative Plasma	0,25	0,20	0,20

In addition the sample coded Accurun 1 - series 3000 - supplied by Boston Biomedica Inc., USA, has been evaluated "in toto" showing the results below:

Accurun 1 series	Lot#1	Lot#2	Lot#3
Factor	S/Co	S/Co	S/Co
1 X	2,90	3,04	3,40

### 2. DIAGNOSTIC SPECIFICITY AND SENSITIVITY

The Performance Evaluation of the device was carried out in a trial conducted on more than total 5000 samples.

#### 2.1 Diagnostic specificity

It is defined as the probability of the assay of scoring negative in the absence of specific analyte. A total of more 5000 unselected donors, including 1st time donors, were examined.

The diagnostic specificity was assessed against a kit US FDA approved.

5043 blood donors were tested providing a specificity of 99.5%. 210 hospitalized patients were tested for HCV Ab; a diagnostic specificity of 99.5% was found. Moreover, diagnostic specificity was assessed by testing 162 potentially interfering specimens (other infectious diseases, E.coli antibody positive, patients affected by

non viral hepatic diseases, dialysis patients, pregnant women, hemolized, lipemic, etc.). A value of specificity of 100% was assessed.

No false reactivity due to the method of specimen preparation has been observed. Both plasma, derived with different standard techniques of preparation (citrate, EDTA and heparin), and sera have been used to determine the value of specificity. Frozen specimens have been tested, as well, to check for interferences due to collection and storage. No interference was observed.

**2.2 Diagnostic Sensitivity**

It defined as the probability of the assay of scoring positive in the presence of specific analyte. The diagnostic sensitivity has been assessed externally on a total number of 348 specimens; a diagnostic sensitivity of 100% was found. Internally more than other 50 positive samples were tested, providing a value of diagnostic sensitivity of again 100%. Positive samples from infections carried out by different genotypes of HCV were tested as well.

Furthermore, most of seroconversion panels available from Boston Biomedica Inc., USA, (PHV) and Zeptomatrix, USA, (HCV) have been studied.

Results are reported below for some of them.

Panel	N° samples	Adaltis <sup>1</sup>	Ortho <sup>1,2</sup>
PHV 901	11	9	9
PHV 904	7	2	4
PHV 905	9	3	4
PHV 906	7	7	7
PHV 907	7	3	2
PHV 908	13	10	8
PHV 909	3	2	2
PHV 910	5	3	3
PHV 911	5	3	3
PHV 912	3	1	1
PHV 913	4	2	2
PHV 914	9	5	5
PHV 915	4	3	0
PHV 916	8	4	3
PHV 917	10	6	6
PHV 918	8	2	0
PHV 919	7	3	3
PHV 920	10	6	6
HCV 10039	5	2	0
HCV 6212	9	6	7
HCV 10165	9	5	4

Note:

- 1. Positive samples detected
- 2. HCV v.3.0

Finally the Product has been tested on the panel EFS Ac HCV, lot n° 06.140817, supplied by the Etablissement Francais Du Sang (EFS), France, with the following results:

**EFS Panel Ac HCV**

sample	Lot#1 S/Co	Lot#2 S/Co	Lot#3 S/Co	Average value
HCV 1	0,53	0,52	0,55	Negative
HCV 2	3,28	5,91	3,04	Positive
HCV 3	2,17	3,18	2,56	Positive
HCV 4	2,26	2,23	2,35	Positive
HCV 5	6,10	7,06	6,90	Positive
HCV 6	1,66	1,77	1,67	Positive

**3. PRECISION**

It has been calculated on five samples, one negative and four positives examined in 4 replicates each in six separate runs. The precision, obtained for both protocols, is equivalent.

Results are reported as follows:

Intra-lot results: ElAgen HCV Ab (v.4) Kit - 1<sup>st</sup> Lot (short incubation assay)

		Precision - %CV		
Sample	S/Co Mean	Within Run	Between Run	Total
Negative	0.03	6.66	10.56	12.48
Positives	1.20	8.52	8.49	12.03
	1.51	7.69	12.22	14.44
	3.57	7.43	11.82	13.97
	11.87	3.42	9.32	9.92

Intra-lot results: ElAgen HCV Ab (v.4) Kit - 1<sup>st</sup> Lot (long incubation assay)

		Precision - %CV		
Sample	S/Co Mean	Within Run	Between Run	Total
Negative	0.04	4.67	12.34	13.19
Positives	1.47	9.62	11.40	14.92
	1.82	8.92	12.77	15.58
	4.31	4.59	12.88	13.67
	13.78	2.42	8.96	9.26

Inter-lot results: ElAgen HCV Ab (v.4) Kit - 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> Lot (short incubation assay)

		Precision - %CV		
Sample	Lot 1	Lot 2	Lot 3	
Negative	8,65	8,29	6,13	
Calibrator	4,98	4,44	5,38	
Positive	4,11	3,11	1,37	

The variability shown in the tables above did not result in sample misclassification.

**S. SUGGESTIONS FOR TROUBLESHOOTING**

Adherence to assay procedure and specifications, as well as a correct use of reagents and proper pipetting, may help to avoid the following kinds of errors

ERROR	POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS
OD very different ( $\pm 50\%$ ) from OD reported on QC	<ul style="list-style-type: none"> <li>- incorrect dispensing volume of reagents (suggestion: check the correspondence between the volume dispensed by the pipette and the one required by the assay; re-calibrate again pipettes)</li> <li>-incorrect temperature or incorrect incubation time (suggestion: more care in the incubator maintenance; note down the beginning of the incubation)</li> <li>-error in washing or in photometer reading (suggestion: check operating or settings of respective instruments)</li> <li>-contamination of Substrate or Conjugate (suggestion: use only disposable and clean plastic containers)</li> </ul>
Low reproducible results	<ul style="list-style-type: none"> <li>-not constant dispensing volume of samples or reagents (suggestion: check the pipettes precision and the correspondence between the volume dispensed by the pipette and the one required by the assay; re-calibrate again pipettes)</li> <li>-error in washing or in reading (suggestion: check operating or settings of respective instruments)</li> <li>-contamination of Substrate (suggestion: use only disposable and clean plastic containers)</li> <li>-pollution or degradation of reagents (suggestion: use appropriate tips, disposable and clean plastic containers for reagents and high quality distilled or equivalent water)</li> </ul>
no colorimetric reaction after addition of substrate	<ul style="list-style-type: none"> <li>-some reagent not pipetted</li> <li>- strong contamination of Conjugate or Substrate</li> <li>-errors in performing the assay procedure (e.g. accidental pipetting of reagents in a wrong sequence or from the wrong vial, etc.)</li> </ul>
too low reaction (too low ODs)	<ul style="list-style-type: none"> <li>-incubation time too short, incubation temperature too low</li> <li>-incorrect conjugate dilution</li> </ul>
too high reaction (too high ODs)	<ul style="list-style-type: none"> <li>-incorrect conjugate dilution</li> <li>-incubation time too long, incubation temperature too high</li> <li>-water quality for wash buffer insufficient (low grade of deionization)</li> <li>-insufficient washing (conjugates not properly removed)</li> </ul>
unexplainable outliers	<ul style="list-style-type: none"> <li>-contamination of pipettes, tips or containers</li> <li>-inconstant and insufficient washing (conjugates not properly removed)</li> </ul>
too high within-run CV%	<ul style="list-style-type: none"> <li>-reagents and/or strips not pre-warmed to Room Temperature prior to use</li> <li>- plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)</li> </ul>
too high between-run CV%	<ul style="list-style-type: none"> <li>-incubation conditions not constant (time, temperature)</li> <li>-controls and samples not dispensed at the same time (with the same intervals) (check pipetting order)</li> <li>-person-related variation</li> </ul>

## T. AUTOMATION

The procedures identified in this Instruction for Use are for manual testing only. When using automated instruments, follow the procedures that are contained in the operator's manual provided by the device manufacturer. Laboratories must follow their approved validation procedures to demonstrate compatibility of this product on automated systems.

## U. LIMITATIONS

Repeatable false positive results, not confirmed by RIBA or similar confirmation techniques, were assessed as less than 0.1% of the normal population.

Frozen samples containing fibrin particles or aggregates after thawing have been observed to generate some false results.

## BIBLIOGRAPHY

1. CDC. Public Health Service inter-agency guidelines for screening donors of blood, plasma, organs, tissues, and semen for evidence of hepatitis B and hepatitis C. *MMWR* 1991;40(No. RR-4):1-17.
2. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C. *Hepatology* 1997;26:62S-5S.
3. McQuillan GM, Alter MJ, Moyer LA, Lambert SB, Margolis HS. A population based serologic study of hepatitis C virus infection in the United States. In Rizzetto M, Purcell RH, Gerin JL, Verme G, eds. *Viral Hepatitis and Liver Disease*, Edizioni Minerva Medica, Turin, 1997, 267-70.
4. Dufour MC. Chronic liver disease and cirrhosis. In Everhart JE, ed. *Digestive diseases in the United States: epidemiology and impact*. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. Washington, DC: US Government Printing Office, 1994; NIH publication no. 94-1447, 615-45.
5. Alter MJ, Hadler SC, Judson FN, et al. Risk factors for acute non-A, non-B hepatitis in the United States and association with hepatitis C virus infection. *JAMA* 1990;264:2231-35.
6. Alter HJ, Holland PV, Purcell RH, et al. Posttransfusion hepatitis after exclusion of commercial and hepatitis-B antigen-positive donors. *Ann Intern Med* 1972;77:691-9.
7. Alter HJ, Purcell RH, Holland PV, Feinstone SM, Morrow AG, Moritsugu Y. Clinical and serological analysis of transfusion-associated hepatitis. *Lancet* 1975;2:838-41.
8. Seeff LB, Wright EC, Zimmerman HJ, McCollum RW, VA Cooperative Studies Group. VA cooperative study of post-transfusion hepatitis and responsible risk factors. *Am J Med Sci* 1975;270:355-62.
9. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med* 1975;292:767-70.
10. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989;244:359-62.
11. Kuo G, Choo QL, Alter HJ, et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 1989;244:362-4.
12. Alter HJ, Purcell RH, Shih JW, et al. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 1989;321:1494-1500.
13. Aach RD, Stevens CE, Hollinger FB, et al. Hepatitis C virus infection in post-transfusion hepatitis. An analysis with first- and second-generation assays. *N Engl J Med* 1991;325:1325-9.
14. Alter MJ, Margolis HS, Krawczynski K, Judson, FN, Mares A, Alexander WJ, et al. The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. *N Engl J Med* 1992;327:1899-1905.
15. Alter, MJ. Epidemiology of hepatitis C in the west. *Semin Liver Dis* 1995;15:5-14.
16. Donahue JG, Nelson KE, Muñoz A, et al. Antibody to hepatitis C virus among cardiac surgery patients, homosexual men, and intravenous drug users in Baltimore, Maryland. *Am J Epidemiol* 1991;134:1206-11.
17. Zeldis JB, Jain S, Kuramoto IK, et al. Seroepidemiology of viral infections among intravenous drug users in northern California. *West J Med* 1992;156:30-5.
18. Fingerhood MI, Jasinski DR, Sullivan JT. Prevalence of hepatitis C in a chemically dependent population. *Arch Intern Med* 1993;153:2025-30.
19. Garfein RS, Vlahov D, Galai N, Doherty, MC, Nelson, KE. Viral infections in short-term injection drug users: the prevalence of the hepatitis C, hepatitis B, human immunodeficiency, and human Tlymphotropic viruses. *Am J Pub Health* 1996;86:655-61.
20. Brettler DB, Alter HJ, Deinstag JL, Forsberg AD, Levine PH. Prevalence of hepatitis C virus antibody in a cohort of hemophilia patients. *Blood* 1990;76:254-6.
21. Troisi CL, Hollinger FB, Hoots WK, et al. A multicenter study of viral hepatitis in a United States hemophilic population. *Blood* 1993;81:412-8.
22. Kumar A, Kulkarni R, Murray DL, et al. Serologic markers of viral hepatitis A, B, C, and D in patients with hemophilia. *J Med Virology* 1993;41:205-9.
23. Tokars JI, Miller ER, Alter MJ, Arduino MJ. National surveillance of dialysis associated diseases in the United States, 1995. *ASAIO Journal* 1998;44:98-107.
24. Osmond DH, Charlebois E, Sheppard HW, et al. Comparison of risk factors for hepatitis C and hepatitis B virus infection in homosexual men. *J Infect Dis* 1993;167:66-71.
25. Weinstock HS, Bolan G, Reingold AL, Polish LB: Hepatitis C virus infection among patients attending a clinic for sexually transmitted diseases. *JAMA* 1993;269:392-4.
26. Thomas DL, Cannon RO, Shapiro CN, Hook EW III, Alter MJ. Hepatitis C, hepatitis B, and human immunodeficiency virus infections among non-intravenous drug-using patients attending clinics for sexually transmitted diseases. *J Infect Dis* 1994;169:990-5.
27. Buchbinder SP, Katz MH, Hessel NA, Liu J, O'Malley PM, Alter, MJ. Hepatitis C virus infection in sexually active homosexual men. *J Infect* 1994;29:263-9.
28. Thomas DL, Zenilman JM, Alter HJ, et al. Sexual transmission of hepatitis C virus among patients attending sexually transmitted diseases clinics in Baltimore—an analysis of 309 sex partnerships. *J Infect Dis* 1995;171:768-75.
29. Thomas DL, Factor SH, Kelen GD, Washington AS, Taylor E Jr, Quinn TC. Viral hepatitis in health care personnel at The Johns Hopkins Hospital. *Arch Intern Med* 1993;153:1705-12.
30. Cooper BW, Krusell A, Tilton RC, Goodwin R, Levitz RE. Seroprevalence of antibodies to hepatitis C virus in high-risk hospital personnel. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1992;13:82-5.
31. Abdel-Hamid, M., M. El-Day, S. El-Kafrawy, N. Mikhail, G.T. Strickland, and A.D. Fix. 2002. Comparison of second- and third-generation enzyme immunoassays for detecting antibodies to hepatitis C virus. *J. Clin. Microbiol.* 40:1656-1659.
32. Dusheiko, G., H. Schlimovitz-Weiss, D. Brown, F. McOmish, P.-L. Yap, S. Sherlock, N. McIntyre, and P. Simmonds. 1994. Hepatitis C virus genotypes: an investigation of type-specific differences in geographic origin and disease. *Hepatology* 19:13-18.
33. Gretch, D. Diagnostic tests for hepatitis C. The article can be found at: <http://www.hepnet.com/nih/gretch.html>. It was written as part of a National Institute of Health Conference on Hepatitis C, held from March 24-26, 1997 in Bethesda Maryland
34. Mondelli, M.U., A. Cerino, F. Bono, A. Cividini, A. Maccabruni, M. Aricò, A. Malfitano, G. Barbarini, V. Piazza, L. Minoli, and E. Silini. 1994. Hepatitis C virus (HCV) core serotype in chronic HCV infection. *J. Clin. Microbiol.* 32:2523-2527.
35. Ohno, T., M. Mizokami, R.-R. Wu, M.G. Saleh, K.-I. Ohba, E. Orito, M. Mukaide, R. Williams, and J.Y.N. Lau. 1997. New hepatitis C virus (HCV) genotyping system that allows for the identification of HCV genotype 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4, 5a, and 6a. *J. Clin. Microbiol.* 35:201-207.
36. Takada, N., S. Takase, N. Enomoto, A. Takada, and T. Date. 1992. Clinical backgrounds of the patients having different types of hepatitis C virus genome. *J. Hepatol.* 14:35-40.
37. Yoshioka, K., S. Kakumu, T. Wakita, T. Ishikawa, Y. Itoh, M. Takayanagi, Y. Higashi, M. Shibata, and T. Morishima. 1992. Detection of hepatitis C virus by polymerase chain reaction and response to interferon- $\alpha$  therapy: relationships to genotypes of hepatitis C virus. *Hepatology* 16:293-299.

---

# EIAgen

## HCV Ab (v.4) Kit

---

REF 071067

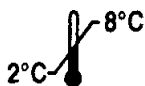
$\Sigma$  96

REF 071064

$\Sigma$  192

REF 071068

$\Sigma$  480



IVD

CE 0459

Lire attentivement cette notice avant d'utiliser le dosage et suivre les instructions.  
La fiabilité des résultats du dosage ne peut pas être garantie si ces instructions ne sont pas strictement respectées.



Fabriqué par:  
**Adaltis S.r.l**  
Via Durini, 27  
20122 Milano (Italy)  
Tel. +39-0774-5791 - Fax +39-0774-353085  
[www.adaltis.net](http://www.adaltis.net)

fr

**SYMBOLES UTILISÉS SUR LES ÉTIQUETTES**

<p align="center">Français <b>FR</b></p>	<b>IVD</b>	<b>REF</b>	<b>LOT</b>				
	Trousse Médicale Diagnostique in Vitro	Code de Catalogue	Numéro de Lot	Lire les Instructions avant l'Utilisation	Limites de Température	Date d'Expiration	Nombre de Tests
				<b>MICROPLATE</b>	<b>CONTROL+</b>	<b>CONTROL-</b>	<b>CAL</b>
	Fabriqué par...	Ne pas Exposer à la Lumière	Risques Biologiques	Date de Fabrication	Contrôle Positif	Contrôle Négatif	Calibrateur
	<b>CONJ</b>	<b>DIL SPE</b>	<b>SUBS TMB</b>	<b>SOLN STOP</b>	<b>WASH BUF 20X</b>	<b>DIL AS</b>	<b>RCNS x mL</b>
	Conjugué	Diluant pour Échantillon	Substrat TMB	Solution d'Arrêt (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.3M)	Solution de Lavage Concentré 20x	Diluant de Dosage	A Reconstituer avec x mL

## A. UTILISATION

Quatrième génération de dosage immuno-enzymatique (ELISA) pour la détermination d'anticorps dirigés contre le virus de l'hépatite C dans le plasma humain (EDTA, héparine et citrate) et des sérums. Le kit peut être utilisé pour le criblage d'unités de sang de patients infectés par le HCV.

Pour diagnostic in vitro uniquement.

## B. INTRODUCTION

L'Organisation mondiale de la Santé (OMS) définit l'hépatite C comme suit:

«L'hépatite C est une infection virale du foie qui avait été désigné comme transmis par voie parentérale" non A, non de l'hépatite B "jusqu'à ce que l'identification de l'agent causal en 1989. La découverte et la caractérisation du virus de l'hépatite C (HCV) ont conduit à la compréhension de son rôle primordial dans la poste hépatite transfusionnelle et de sa tendance à provoquer une infection persistante.

Le HCV est la principale cause de l'hépatite aiguë et une maladie du foie chronique, y compris la cirrhose et le cancer du foie. Globalement, on estime 170 millions de personnes sont chroniquement infectées par le HCV et 3 à 4 millions de personnes sont infectées chaque année. Le HCV se transmet principalement par contact direct avec du sang humain. Les principales causes de l'infection par le HCV dans le monde sont la transfusion de sang contaminé, et la réutilisation de seringues et d'aiguilles qui n'ont pas été stérilisés adéquatement. Aucun vaccin n'est actuellement disponible pour prévenir l'hépatite C et le traitement de l'hépatite chronique C est trop coûteux pour la plupart des personnes dans les pays en développement à se permettre. Ainsi, d'un point de vue global, le plus grand impact sur la charge de morbidité de l'hépatite C sera probablement atteint en concentrant les efforts sur la réduction du risque de transmission du HCV d'expositions nosocomiales (par exemple, les transfusions sanguines, les pratiques d'injection à risque) et les comportements à haut risque (par exemple drogues injectables utiliser).

L'hépatite C (HCV) est un des virus (A, B, C, D et E), qui représentent ensemble la grande majorité des cas d'hépatite virale. Il s'agit d'un virus à ARN enveloppé de la famille des Flaviviridae, qui semble avoir un spectre d'hôte étroit. Les humains et les chimpanzés sont les seules espèces connues sensibles à l'infection, avec les deux espèces développer une maladie similaire. Une caractéristique importante de ce virus est la mutabilité relative de son génome, qui à son tour est probablement liée à la forte propension (80%) d'induire une infection chronique. Le HCV se ramène à plusieurs génotypes distincts qui peuvent être importants dans la détermination de la gravité de la maladie et de la réponse au traitement.

La période d'incubation de l'infection par le HCV, avant l'apparition des symptômes cliniques varie de 15 à 150 jours. Dans les infections aiguës, les symptômes les plus courants sont la fatigue et la jaunisse; Cependant, la

majorité des cas (entre 60% et 70%), même celles qui se développent une infection chronique, sont un symptôme. Environ 80% des patients nouvellement infectés progresser de développer une infection chronique. Cirrhose se développe chez environ 10% à 20% des personnes atteintes d'une infection chronique et le cancer du foie se développe dans 1% à 5% des personnes atteintes d'une infection chronique sur une période de 20 à 30 ans. La plupart des patients souffrant de cancer du foie qui n'ont pas l'infection par le virus de l'hépatite B ont des preuves de l'infection par le HCV. Les mécanismes par lesquels l'infection à HCV conduit à un cancer du foie sont encore mal connues. L'hépatite C aggrave également la sévérité de la maladie hépatique sous-jacente quand il coexiste avec d'autres conditions hépatiques. En particulier, une maladie du foie progresse plus rapidement chez les personnes atteintes de la maladie alcoolique du foie et infection par le HCV. Le HCV se transmet principalement par contact direct avec du sang humain. La transmission par des transfusions sanguines qui ne sont pas dépistées pour l'infection par le HCV, grâce à la réutilisation d'aiguilles mal stérilisées, de seringues ou d'autre matériel médical, ou par le partage de seringues chez les usagers de drogues, est bien documenté. La transmission sexuelle et périnatale peut également se produire, bien que moins fréquemment. D'autres modes de transmission tels que les pratiques sociales, culturelles et comportementales en utilisant des procédures percutanées (par exemple de l'oreille et piercing, circoncision, tatouage) peuvent se produire si l'équipement mal stérilisé est utilisé. HCV ne se transmet pas par les éternuements, les accolades, la toux, de la nourriture ou de l'eau, le partage des ustensiles de cuisine, ou un contact occasionnel.

Dans les pays développés et en développement, les groupes à haut risque comprennent consommateurs de drogues injectables, les receveurs de sang, les hémophiles, les patients de dialyse et les personnes ayant des partenaires sexuels multiples qui ont des rapports sexuels non protégés. Dans les pays développés, on estime que 90% des personnes atteintes d'une infection chronique par le HCV sont les utilisateurs de drogues injectables, anciens et actuels et ceux ayant des antécédents de transfusion de sang non testé ou de produits sanguins. Dans de nombreux pays en développement, où le sang et les produits sanguins sont encore utilisés, les principaux moyens de transmission sont du matériel d'injection non stérile et la transfusion de sang. En outre, les personnes qui pratiquent la scarification et la circoncision traditionnelles sont à risque si elles utilisent ou ré-utiliser des outils non stérilisés.

L'OMS estime que 170 millions de personnes, soit 3% de la population mondiale, sont infectées par le HCV et sont à risque de développer une cirrhose du foie et/ou un cancer du foie. La prévalence de l'infection par le HCV dans certains pays d'Afrique, de la Méditerranée orientale, de l'Asie du Sud-Est et du Pacifique occidental (lorsque les données de prévalence sont disponibles) est élevé par rapport à certains pays d'Amérique du Nord et en Europe.

Les tests de diagnostic pour le HCV sont utilisés pour prévenir l'infection par le dépistage de sang du donneur



et de plasma, pour établir le diagnostic clinique et de prendre de meilleures décisions concernant la gestion médicale d'un patient. Les tests diagnostiques disponibles dans le commerce aujourd'hui sont basés sur la méthode immuno-enzymatique (EIA) pour la détection d'anticorps spécifiques du HCV. EIE peuvent détecter plus de 95% des patients chroniquement infectés mais peuvent détecter que 50% à 70% des infections aiguës. Un test EIA recombinant ( RIBA ) qui identifie des anticorps qui réagissent avec les antigènes du HCV est souvent utilisé comme un test supplémentaire pour la confirmation d'un résultat positif EIA. Test du HCV circulant par amplification des tests ARN (par exemple polymérase chain reaction ou PCR, ramifié test d'ADN) est également utilisé pour la confirmation des résultats sérologiques ainsi que pour évaluer l'efficacité du traitement antiviral. Un résultat positif indique la présence d'une infection active et un risque de propagation de l'infection et/ou le développement de la maladie chronique du foie .

Les médicaments antiviraux tels que l'interféron seul ou en association avec la ribavirine , peuvent être utilisés pour le traitement de personnes souffrant d'hépatite C chronique, mais le coût du traitement est très élevé. Le traitement avec l'interféron seul est efficace dans environ 10% à 20% des patients. L'interféron associé à la ribavirine est efficace dans environ 30% à 50% des patients . La ribavirine ne semble pas être efficace lorsqu'il est utilisé seul .

Il n'existe aucun vaccin contre le HCV. La recherche est en cours, mais la forte mutabilité du génome du HCV complique le développement de vaccins. Le manque de connaissances de toute réponse immunitaire protectrice après une infection par le HCV constitue également un obstacle recherche sur les vaccins . On ne sait pas si le système immunitaire est capable d'éliminer le virus .

Certaines études, cependant, ont montré la présence d'anticorps neutralisants du virus chez les patients infectés par le HCV. En l'absence d'un vaccin , toutes les précautions pour prévenir l'infection doivent être prises, y compris (a) dépistage et les tests de sang et d'organes donateurs; (b) L'inactivation des virus de plasma produits dérivés; (c) la mise en œuvre et la maintenance des pratiques de contrôle des infections dans les établissements de soins de santé, y compris la stérilisation du matériel médical et dentaire; (d) la promotion du changement de comportement parmi les travailleurs du secteur public et des soins de santé généraux pour réduire la surutilisation des injections et à utiliser des pratiques d'injection sécuritaires; et (e) des risques conseil de réduction pour les personnes drogue à haut risque et les pratiques sexuelles".

Le génome code pour des composants de structure, une protéine de nucléocapside et deux glycoprotéines d'enveloppe, et des composants fonctionnels impliqués dans le traitement de la réplication du virus et la protéine. La région de la nucléocapside codant semble être le plus conservateur parmi les isolats obtenus partout dans le monde .

### C. PRINCIPE DU TEST

Microplaques sont recouvertes d'antigènes spécifiques du HCV provenant de "noyau" et "ns" régions codant pour des déterminants antigéniques conservateurs et immunodominantes (base peptide recombinant NS3, NS4 et NS5 peptides).

La phase solide est d'abord traité avec l'échantillon dilué et Ab sont capturées HCV, s'il est présent, par les antigènes. Après élimination par lavage de tous les autres composants de l'échantillon, dans les deuxième anticorps anti-HCV lié d'incubation, IgG et IgM, ainsi, sont détectés par l'addition de Higg & M anticorps anti spécifiques polyclonaux, marqués à la peroxydase (HRP).

L'enzyme a capturé sur la phase solide, qui agit sur le mélange de substrat TMB, génère un signal optique qui est proportionnelle à la quantité d'anticorps anti-HCV présents dans l'échantillon. Une valeur seuil de laisser densités optiques interprétées dans d'anticorps HCV résultats négatifs et positifs.

### D. CONTENU DE LA TROUSSE

Le kit contient des réactifs pour 96 tests (code 071067), 192 tests (code 071064), ou 480 essais (code 071068).

<b>Microplaque</b>	1
<b>Contrôle Négatif</b>	1x4 mL/flacon
<b>Contrôle Positif</b>	1x2 mL/flacon
<b>Calibrateur</b>	2 flacons
<b>Solution de Lavage Concentré 20x Conjugué</b>	1x50 mL/flacon
<b>Diluant pour échantillon</b>	1x16 mL/flacon
<b>Substrat TMB</b>	1x50 mL/flacon
<b>Solution d'Arrêt</b>	1x16 mL/flacon
<b>Diluant de Dosage</b>	1x15 mL/flacon
<b>Feuilles adhésives pour la fermeture hermétique des microplaques</b>	1x8 mL/flacon
	2
<b>Nombre de tests</b>	96
<b>Code</b>	071067

<b>Microplaque</b>	2
<b>Contrôle Négatif</b>	2x4 mL/flacons
<b>Contrôle Positif</b>	1x4 mL/flacon
<b>Calibrateur</b>	3 flacons
<b>Solution de Lavage Concentré 20x Conjugué</b>	2x50 mL/flacons
<b>Diluant pour échantillon</b>	2x16 mL/flacons
<b>Substrat TMB</b>	2x50 mL/flacons
<b>Solution d'Arrêt</b>	2x16 mL/flacons
<b>Diluant de Dosage</b>	2x15 mL/flacons
<b>Feuilles adhésives pour la fermeture hermétique des microplaques</b>	2x8 mL/flacons
	4
<b>Nombre de tests</b>	192
<b>Code</b>	071064

<b>Microplaque</b>	5
<b>Contrôle Négatif</b>	1x20 mL/flacon
<b>Contrôle Positif</b>	1x10 mL/flacon
<b>Calibrateur</b>	7 flacons
<b>Solution de Lavage Concentré 20x</b>	5x50 mL/flacons
<b>Conjugué</b>	2x40 mL/flacons
<b>Diluant pour échantillon</b>	5x50 mL/flacons
<b>Substrat TMB</b>	2x40 mL/flacons
<b>Solution d'Arrêt</b>	2x40 mL/flacons
<b>Diluant de Dosage</b>	1x40 mL/flacon
<b>Feuilles adhésives pour la fermeture hermétique des microplaques</b>	10
<b>Nombre de tests</b>	480
<b>Code</b>	071068

### 1. Microplaque:

12 barrettes de 8 puits revêtus avec Core peptide, NS3 recombinant, NS4 et NS5 peptides. Les plaques sont scellées dans un sachet en aluminium et déshydratant. Apportez la microplaque à température ambiante (18...24°C) avant d'ouvrir le sac. Les barrettes non utilisées doivent être retournées dans la poche et la poche doit être scellé et conservé revenir à 2...8°C, en présence de l'agent déshydratant.

### 2. Contrôle Négatif

Prêt à utiliser le contrôle. Il contient 10 mM de tampon Na-citrate pH 6,0 ± 0,1, 2% de caséine en tant que base de protéines et 0,1% de Kathon CG en tant que conservateur. Le contrôle négatif est de couleur vert olive codé.

### 3. Contrôle Positif

Prêt à utiliser le contrôle. Il contient les protéines du sérum de chèvre à 1%, des anticorps humains anti-HCV positifs, 10 mM Na-citrate buffer pH 6,0 ± 0,1, 0,5% de Tween 20, 0,09% Na-azide et 0,1% de Kathon CG en tant que conservateurs. Le contrôle positif est de couleur vert foncé codé.

**Remarque importante:** L'absence d'agents pathogènes viables dans le contrôle positif ne peut pas être pleinement assurée, et donc, le réactif doit être manipulé comme potentiellement dangereux, conformément aux bonnes pratiques de laboratoire.

### 4. Calibrateur

Calibrateur lyophilisé. Pour être dissoute avec le volume de l'eau de qualité EIA rapporté sur l'étiquette. Il contient les protéines du sérum bovin foetal, anticorps humains anti-HCV dont le contenu est calibré sur le code NIBSC étalon de travail 06/188-006, 10 mM Na-citrate pH du tampon de 6,0 ± 0,1, 0,3 mg/mL de sulfate de gentamicine et 0,1% de Kathon CG que des conservateurs.

**Remarque importante:** L'absence d'agents pathogènes viables dans le calibrateur ne peut pas être pleinement assurée, et donc, le réactif doit être manipulé comme potentiellement dangereux, conformément aux bonnes pratiques de laboratoire.

**Remarque:** Le volume nécessaire pour dissoudre le contenu de la fiole peut varier d'un lot à l'autre. S'il vous plaît utiliser le droit volume déclaré sur l'étiquette.

### 5. Solution de Lavage Concentré 20x

20x solution concentrée. Une fois diluée, la solution de lavage (tampon de lavage dilué) contient 10 mM de phosphate de pH du tampon 7,0 ± 0,2, 0,05% de Tween 20 et 0,05% de Kathon CG.

Après dilution, la solution de lavage est stable pendant 1 semaine à 2...8°C.

### 6. Conjugué

Prêt à l'emploi et rouge couleur codée réactif. Il contient la peroxydase de raifort anticorps polyclonaux de chèvre conjugués à IgG et IgM humain, 5% de BSA, 10 mM de tampon citrate pH 6,4 ± 0,1, 0,1% de Proclin et 0,05% de Tween 20 comme agent de conservation.

### 7. Substrat TMB

Composant prêt à l'emploi. Il contient 50 mM de tampon citrate-phosphate pH 3.5-3.8, 4% de diméthylsulfoxyde, 0,03% de tétra-méthyl-benzidine ou TMB et 0,02% de peroxyde d'hydrogène ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Mélanger doucement avant utilisation.

**Remarque:** Pour être conservé à l'abri de la lumière aussi sensible à un fort éclairage.

### 8. Diluant de Dosage

Composant prêt à l'emploi. Il contient du sérum de chèvre, 10 mM de tris solution tamponnée à pH 8,0 ± 0,1 contenant 0,1% de Kathon CG et 0,09% d'azide de Na pour le pré-traitement des échantillons et les témoins dans la plaque, le blocage de l'interférence.

### 9. Solution d'Arrêt

Composant prêt à l'emploi.

Il contient une solution de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,3 M. Mélanger doucement avant utilisation.

**La fiche signalétique est disponible sur demande du personnel de laboratoire.**

### 10. Diluant pour échantillon

Composant prêt à l'emploi et la couleur vert foncé codés. Il contient 1% de caséine, 10 mM de tampon Na-citrate pH 6,0 ± 0,1 et 0,1% de Kathon CG en tant que conservateur.

Pour être utilisée pour diluer l'échantillon.

**Remarque:** Le diluant change de couleur du vert olive au vert bleuâtre foncé en présence de l'échantillon.

### E. MATERIEL NECESSAIRE NON FOURNI

1. Micropipettes calibrées (200 µL et 10 µL) et embouts jetables en plastique.
2. Eau de qualité EIA (bidistillée ou déminéralisée, traitée au charbon actif pour éliminer les produits chimiques oxydants utilisés en tant que désinfectants).
3. Minuterie réglable jusqu'à 60 minutes au moins.
4. Papier absorbant.
5. Incubateur thermostatique calibré pour microplaques ELISA (sec ou humide) réglé sur +37°C.
6. Lecteur de microplaques ELISA avec filtre à 450 nm (lecture) et, si possible, avec filtre à 620-630 nm (soustraction des blancs).
7. Station de lavage calibrée pour microplaques ELISA.
8. Vortex ou instrument de mélange similaire.

## F. AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

1. Le kit doit être utilisé uniquement par du personnel technique qualifié et correctement formé, sous la supervision d'un médecin responsable du laboratoire.  
Cette notice doit être lue attentivement avant l'utilisation du produit.
2. Lorsque le kit est utilisé pour le dépistage d'unités de sang et de composants sanguins, il doit être utilisé dans un laboratoire certifié et qualifié par l'autorité nationale dans ce domaine (Ministère de la Santé ou une entité similaire) pour mener à bien ce type d'analyse.
3. Tout le personnel participant à la réalisation du test doivent porter des vêtements de protection, des gants de laboratoire sans talc et des verres. L'utilisation d'objets tranchants (aiguilles) ou coupe (lames) de dispositifs doit être évitée. Tous le personnel impliqué doit être formé aux procédures de biosécurité, comme recommandé par le Center for Disease Control, Atlanta, États-Unis et signalé à l'Institut national de la publication de Santé: "prévention des risques biotechnologiques en laboratoires microbiologiques et biomédicaux", éd. 1984.
4. Tout le personnel impliqué dans la manipulation des échantillons doivent être vaccinés contre le VHB et le VHA, pour lesquelles des vaccins sont disponibles, sûrs et efficaces.
5. L'environnement de laboratoire doit être contrôlée afin d'éviter les contaminants tels que la poussière ou des agents microbiens air - né, lors de l'ouverture des flacons de la trousse et des microplaques et lors du test. Protéger le substrat (TMB) de la lumière forte et éviter les vibrations de la surface de la table où le test est effectué.
6. Dès réception, conserver le kit à 2...8°C dans un réfrigérateur à température contrôlée ou une chambre froide.
7. Ne pas échanger les composants entre différents lots de kits. Il est recommandé que les composants entre les deux kits d'un même lot ne doivent pas être interchangés.
8. Vérifiez que les réactifs sont claires et ne contiennent pas de particules ou agrégats lourds visibles. Sinon, aviser le responsable du laboratoire d'engager les procédures nécessaires pour kit de remplacement.
9. Éviter la contamination croisée entre les échantillons de sérum/plasma en utilisant des embouts jetables et les changer après chaque échantillon.
10. Éviter la contamination croisée entre les réactifs en utilisant des embouts jetables et les changer entre l'utilisation de chacun.
11. Ne pas utiliser le kit après la date de péremption indiquée sur l'emballage externe et (flacons) étiquettes internes.
12. Traiter tous les échantillons comme potentiellement infectieux. Tous les échantillons de sérum humain doivent être manipulés au niveau de biosécurité 2, comme recommandé par le Center for Disease Control, Atlanta, États-Unis en conformité avec ce que rapportés dans les Instituts de la publication de Santé: "prévention des risques biotechnologiques en

laboratoires microbiologiques et biomédicaux", éd. 1984.

13. L'utilisation de matière plastique-céramique jetable est recommandé dans la préparation des composants liquides ou en transférant les composants en des postes de travail informatisés, afin d'éviter toute contamination croisée.
14. Les déchets produits lors de l'utilisation de la trousse doit être mis au rebut en conformité avec les directives et les lois concernant les déchets de laboratoire de substances chimiques et biologiques nationales. En particulier, les déchets liquides générés par le procédé de lavage, de résidus de contrôles et des échantillons doit être traitée comme s'ils étaient potentiellement infectieux et inactivé avant déchets. Procédures suggérées inactivation sont le traitement avec une concentration finale de 10% d'eau de javel pendant 16-18 heures ou inactivation thermique par autoclave à 121°C pendant 20 min.
15. Les déversements accidentels provenant d'échantillons et les opérations doivent être adsorbé avec des mouchoirs en papier imbibées d'eau de Javel, puis avec de l'eau. Les tissus doivent ensuite être jetés dans des conteneurs appropriés désignés pour les déchets de laboratoire/de l'hôpital.
16. La Solution d'Arrêt contient de l'acide sulfurique 0,3 M. Éviter le contact avec la peau et les yeux. En cas de contact, rincer immédiatement et abondamment avec de l'eau.
17. Disposer de solutions de réactifs contenant de l'azoture de sodium comme agent de conservation selon les réglementations locales, provinciales et nationales. Pour disposer de réactifs contenant de l'azoture, rincer à l'aide de grandes quantités d'eau. Éliminer avec prudence que l'azoture de sodium peut former des composés explosifs au contact prolongé avec le plomb ou le cuivre tuyauterie.
18. Ne pas fumer, manger, boire ou utiliser des produits cosmétiques dans les zones où des échantillons ou des réactifs du kit sont manipulés.
19. Autres déchets générés par l'utilisation du kit (exemple: les embouts utilisés pour les échantillons et les contrôles, utilisés microplaques) doivent être traités comme étant potentiellement infectieux et éliminés conformément aux directives et lois concernant les déchets de laboratoires nationaux.
20. Ne pas pipeter à la bouche.

## G. ÉCHANTILLONS: PRÉPARATION ET MISES EN GARDE

1. Le sang est prélevé de manière aseptique par ponction veineuse et le plasma ou le sérum est préparé en utilisant des techniques standard de préparation des échantillons pour analyse en laboratoire clinique. Aucune influence n'a été observée dans la préparation de l'échantillon avec le citrate, l'EDTA et de l'héparine.
2. Éviter tout ajout de conservateurs aux échantillons; en particulier de l'azide de sodium comme produit chimique affecterait l'activité enzymatique du conjugué, générant des résultats faussement négatifs.
3. Les échantillons doivent être clairement identifiés par des codes ou des noms afin d'éviter une mauvaise

interprétation des résultats . Lorsque le kit est utilisé pour le dépistage d'unités de sang , l'étiquetage de code à barres et la lecture électronique est fortement recommandé.

4. Hémolysé (rouge) et visiblement hyperlipémique («laiteux») les échantillons doivent être jetés car ils pourraient générer des résultats erronés. Les échantillons contenant des résidus de fibrine ou particules lourdes ou de filaments microbiens et les organismes doivent être jetés car ils pourraient donner lieu à de faux résultats .
5. Sera et le plasma peuvent être conservés à +2...8°C pendant jusqu'à cinq jours après la collecte. Pour les périodes de stockage plus longues, les échantillons peuvent être conservés congelés à -20°C pendant plusieurs mois. Tous les échantillons congelés ne doivent pas être congelés/décongelés plus d'une fois car cela peut générer des particules qui pourraient affecter le résultat du test.
6. Si des particules sont présentes, centrifuger à 2.000 tours par minute pendant 20 min ou filtre à l'aide de filtres de 0,2-0.8µ pour nettoyer l'échantillon à tester.

## H. PRÉPARATION DES RÉACTIFS ET MISES EN GARDE

Une étude menée sur un kit ouvert n'a pas signalé la perte d'activité correspondante, jusqu'à 1 re-utilisation de l'appareil et jusqu'à 6 mois.

### 1. Microplaque:

Laisser la microplaque pour atteindre la température ambiante (environ 1 heure) avant d'ouvrir le sachet. Vérifiez que le déshydratant n'a pas tourné au vert foncé, indiquant un défaut de fabrication. Dans ce cas, appelez le service à la clientèle de Adaltis.

Les barrettes non utilisées doivent être placées à l'intérieur du sachet en aluminium, avec le déshydratant fourni, bien compressé et stocké à +2...8°C. Après la première ouverture, bandes restantes sont stables jusqu'à l'indicateur d'humidité à l'intérieur du sachet déshydratant passe du jaune au vert.

### 2. Contrôle Négatif:

Prêt à l'emploi. Mélangez bien le vortex avant utilisation.

### 3. Contrôle Positif:

Prêt à l'emploi. Mélangez bien le vortex avant utilisation. Manipuler ce composant comme potentiellement infectieux.

### 4. Calibrateur:

Dissoudre soigneusement le contenu du flacon lyophilisé avec le volume d'eau de qualité EIA signalé sur l'étiquette. Mélangez bien le vortex avant utilisation. Manipuler ce composant comme potentiellement infectieux.

Remarque: Lorsque dissous le calibrateur n'est pas stable. Magasin à -20°C.

### 5. Solution de Lavage Concentré 20x (flacon de 50 mL):

L'ensemble du contenu de la solution concentrée 20x doit être dilué avec de l'EIE de qualité de l'eau jusqu'à 1000 mL (le volume est déclarée sur l'étiquette) et mélangé doucement fin-sur-end avant l'utilisation.

Comme certains cristaux de sel peuvent être présents dans le flacon, prendre soin de dissoudre tout le contenu lors de la préparation de la solution. Lors de la préparation d'éviter la formation de mousse comme la présence de bulles pourrait avoir un impact sur l'efficacité des cycles de lavage.

**Remarque: Une fois diluée, la solution de lavage est stable pendant 1 semaine à +2...8°C.**

### 6. Conjugué:

Prêt à l'emploi. Mélangez bien le vortex avant utilisation. Veillez à ne pas contaminer le liquide avec produits chimiques oxydants, de la poussière de l'air entraîné ou microbes. Si ce composant doit être transféré utilisation que des récipients jetables en plastique, éventuellement stériles.

### 7. Substrat TMB:

Prêt à l'emploi. Mélangez bien le vortex avant utilisation. Éviter la contamination du liquide de produits chimiques oxydants, de la poussière de l'air entraîné ou microbes. Ne pas exposer à une forte illumination, agents oxydants et les surfaces métalliques. Si ce composant doit être transféré uniquement l'utilisation de plastique, et si possible, contenant à usage unique, stérile.

### 8. Diluant de Dosage:

Prêt à l'emploi. Mélangez bien le vortex avant utilisation.

### 9. Solution d'Arrêt:

Prêt à l'emploi. Mélangez bien le vortex avant utilisation.

### 10. Diluant pour échantillon:

Prêt à l'emploi. Mélangez bien le vortex avant utilisation.

## I. INSTRUMENTS ET ACCESSOIRES UTILISÉS AVEC LA TROUSSE

1. Micropipettes doivent être calibrés de livrer le volume correct requis par l'essai et doit être soumis à une décontamination régulière (alcool ménager, solution à 10% d'eau de javel, les désinfectants de qualité hospitalière) de ces pièces qui pourraient accidentellement entrer en contact avec l'échantillon ou les composants de la trousse. Ils doivent également être régulièrement entretenus afin de montrer une précision de 1% et une exactitude de  $\pm 2\%$ . Décontamination des déversements ou des résidus de composants du kit devrait également être effectuée régulièrement
2. L'incubateur ELISA doit être réglé à +37°C (tolérance de  $\pm 0,5^\circ\text{C}$ ) et vérifié régulièrement pour assurer la bonne température est maintenue. Les deux incubateurs à sec et des bains d'eau sont appropriés pour les incubations, à condition que l'instrument est validé pour l'incubation des tests ELISA.
3. La rondelle ELISA est extrêmement important pour les performances globales de l'essai. La rondelle doit être soigneusement validé et correctement optimisé. Habituellement 4-5 cycles de lavage (+ dispensation d'aspiration de la solution de lavage 350  $\mu\text{L}/\text{well}$  = 1 cycle) sont suffisantes pour faire en sorte que l'essai fonctionne comme prévu. Un temps de trempage de 20-30 secondes entre les cycles est proposé. Afin de régler correctement leur nombre, il est recommandé d'exécuter un test avec les contrôles de la trousse/

calibrateur et échantillons de référence négatifs et positifs bien caractérisés, et vérifier qu'elles correspondent aux valeurs indiquées ci-dessous dans la section O "Contrôle de Qualité Interne". Étalonnage régulier des volumes livrés et entretien (décontamination et le nettoyage des aiguilles) de la rondelle doit être effectuée selon les instructions du fabricant.

4. Des temps d'incubation ont une tolérance de  $\pm 5\%$ .
  - ✓ courte incubation méthode (pour la 1<sup>ère</sup> / 2<sup>ème</sup> incubation tolérance entre 43 min à 47 min; 3 pour la tolérance d'incubation entre 14 et 16 min).
  - ✓ Méthode incubation standard (pour le 1<sup>er</sup> tolérance d'incubation entre 57 min à 63 min; pour 2<sup>e</sup> et 3<sup>e</sup> tolérance d'incubation entre 29 et 31 min).
5. Le lecteur de microplaques ELISA doit être équipé d'un filtre de lecture de 450 nm et de préférence avec un second filtre (620-630nm) à des fins de suppression. Ses performances standard doivent être (a) la bande passante  $\leq 10$  nm; (b) la gamme d'absorbance de 0 à  $\geq 2,0$ ; (c) la linéarité de  $\geq 2,0$ ; répétabilité  $\geq 1\%$ . Suppression est effectuée sur le bien identifiés dans la section «Procédure de test". Le système optique du lecteur doit être étalonné périodiquement pour assurer que la densité optique est mesurée correcte. Il doit être entretenu régulièrement conformément aux instructions du fabricant.
6. Lors de l'utilisation d'une station ELISA automatisé de travail, toutes les étapes critiques (dispense, l'incubation, laver, la lecture, la secousse, le traitement des données) doivent être soigneusement réglé, calibré, contrôlé et entretenu régulièrement afin de correspondre aux valeurs indiquées dans les sections O "Contrôle de Qualité Interne". Le protocole de dosage doit être installé dans le système d'exploitation de l'unité et validée que pour la machine à laver et le lecteur. En outre, la partie de traitement des liquides de la station (dispensation et lavage) doit être validé et correctement configuré. Une attention particulière doit être accordée à éviter report par les aiguilles utilisées pour distribuer des échantillons et pour le lavage. Cela doit être étudié et contrôlé pour minimiser la possibilité de contamination des puits adjacents en raison des échantillons fortement réactifs, conduisant à des résultats faussement positifs. L'utilisation de postes de travail automatisés ELISA est recommandé pour le dépistage du sang et lorsque le nombre d'échantillons à tester dépasse 20-30 unités par course.

## L. CONTRÔLES ET PROCÉDURES PRÉALABLES AU TEST

1. Vérifiez la date d'expiration de la trousse imprimée sur l'étiquette extérieure de la boîte du kit. Ne pas utiliser si expiré.
2. Vérifiez que les composants liquides ne sont pas contaminés par l'oeil nu particules visibles ou des agrégats. Vérifiez que le substrat TMB est incolore ou bleu pâle par l'aspiration d'un petit volume de celui-ci avec une pipette en plastique transparent stérile. Vérifier l'absence de rupture s'est produite dans le transport et aucun débordement de liquide est

présent à l'intérieur de la boîte. Vérifier que le sachet en aluminium, contenant la microplaque, n'est pas crevé ou endommagé.

3. Diluer tout le contenu du tampon de lavage concentré 20x comme décrit ci-dessus.
4. Dissoudre le calibre tel que décrit ci-dessus.
5. Permettre à tous les autres composants pour atteindre la température ambiante (environ 1 heure), puis mélanger comme décrit.
6. Régler l'incubateur ELISA à  $+37^{\circ}\text{C}$  et préparer la rondelle ELISA en amorçant avec la solution de lavage diluée, d'après les instructions du fabricant. Définir le bon nombre de cycles de lavage que l'on trouve dans la section I.3
7. Vérifiez que le lecteur ELISA a été mis sur au moins 20 minutes avant de lire.
8. Si vous utilisez un poste de travail automatisé, allumez-le, vérifiez les paramètres et assurez-vous d'utiliser le protocole de dosage exact.
9. Vérifiez que les micropipettes sont définis au volume requis.
10. Vérifiez que tous les autres équipements sont disponibles et prêts à utiliser.
11. En cas de problèmes, de ne pas poursuivre avec le test et informer le superviseur.

## M. PROCÉDURE DE TEST

L'essai doit être effectué en fonction de ce que rapporté ci-dessous, en prenant soin de maintenir le même temps d'incubation de tous les échantillons de test.

La procédure de dosage peut être effectué avec deux fois les procédures d'incubation. Choisissez celui qui est requis par votre règlement:

1. Incubation Standard (1<sup>ère</sup> incubation 60 minutes, 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> incubation 30 minutes)
2. Incubation Courte (1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> incubation 45 minutes, 3<sup>ème</sup> incubation 15 minutes)

### 1. Incubation Standard - Dosage manuel:

1. Placer le nombre requis de micropuits dans le support de cupule. Laissez le 1<sup>er</sup> puits vide pour l'opération de suppression.
2. Distribuer 200  $\mu\text{L}$  de Contrôle Négatif, en trois exemplaires, 200  $\mu\text{L}$  Calibrateur en double et 200  $\mu\text{L}$  Contrôle Positif en unique dans les puits appropriés. Ne pas diluer les contrôles et l'étalon car ils sont pré-dilués, prêt à l'emploi!
3. Ajouter 200  $\mu\text{L}$  de Diluant pour Échantillon dans tous les puits d'échantillon; puis distribuer 10  $\mu\text{L}$  d'échantillon dans chaque correctement bien identifiés. Mélanger doucement la plaque, en évitant de contaminer et débordant puits adjacents, afin de disperser complètement l'échantillon dans son diluant.

**Remarque importante:** Assurez-vous que la couleur du diluant de l'échantillon, lors de l'addition de l'échantillon, passe du vert clair au vert bleuâtre foncé, le suivi que l'échantillon a été vraiment ajouté.

4. Distribuer 50  $\mu\text{L}$  de Diluant de Dosage dans tous les contrôles/étalon et puits d'échantillon. Vérifiez que la couleur des échantillons a tourné au bleu foncé.
5. Incuber la microplaque pendant **60 min à  $37^{\circ}\text{C}$** .

Note importante: Les bandes doivent être scellés avec la feuille d'étanchéité adhésif, fourni, que lorsque le test est effectué manuellement. Ne couvrez pas les bandes lors de l'utilisation des instruments automatiques ELISA.

6. Laver la microplaque avec une station de lavage automatique en distribuant et aspirant 350 µL/puits de solution de lavage diluée comme décrit précédemment (section I.3).
7. Pipeter 100 µL de conjugué enzymatique dans chaque puits, sauf les premier et second puits réservés à la soustraction des blancs et couvrir avec la feuille adhésive. S'assurer que ce réactif de couleur rouge a été distribué dans tous les puits, sauf A1.

**Remarque importante:** Veillez à ne pas toucher la surface intérieure du plastique bien avec la pointe rempli avec le conjugué enzymatique. La contamination peut se produire.

8. Incuber la microplaque pendant **30 min à 37°C**.
9. Laver les puits comme indiqué à la section I.3.
10. Introduire à la pipette 100 µL mélange de Substrat TMB dans chaque puits, le puits du blanc inclus. Puis incuber la microplaque à température ambiante (18-24°C) pendant **30 minutes**.

**Remarque importante:** Ne pas exposer à une forte illumination directe. Haut de fond peut être générée.

11. Pipeter 100 µL de Solution d'Arrêt dans tous les puits à l'aide de la même séquence de pipetage comme à l'étape 10 pour arrêter la réaction enzymatique. Addition d'une solution d'arrêt deviendra le contrôle positif et les échantillons positifs du bleu au jaune.
12. Mesurer l'intensité de la couleur de la solution dans chaque puits, comme décrit dans la section I.5, au filtre de 450nm (lecture) et peut-être à 620-630nm (soustraction de fond), suppression de l'instrument sur A1.

#### **Remarques importantes:**

1. Si le deuxième filtre n'est pas disponible, de s'assurer qu'aucun des empreintes digitales sont présents sur le fond de la cupule avant lecture à 450 nm. Les empreintes digitales pourraient générer des résultats faussement positifs sur la lecture.
2. La lecture est devrait idéalement être effectué immédiatement après l'ajout de la solution d'arrêt, mais certainement pas plus de 20 minutes après. Certains auto oxydation du substrat peut se produire conduisant à un fond supérieur.
3. Agitation à  $350 \pm 150$  tours par minute pendant l'incubation a été prouvé pour augmenter la sensibilité de l'essai d'environ 20%.

#### **2. Incubation Courte- Dosage manuel:**

1. Placer le nombre requis de micropuits dans le support de cupule. Laissez le 1er puits vide pour l'opération de suppression.
2. Distribuer 200 µL de Contrôle Négatif, en trois exemplaires, 200 µL Calibrateur en double et 200 µL de Contrôle Positif en unique dans les puits

appropriés. Ne pas diluer les contrôles et l'étalon car ils sont pré-dilués, prêt à l'emploi!

3. Ajouter 200 µL de Diluant pour Echantillon dans tous les puits d'échantillon; puis distribuer 10 µL d'échantillon dans chaque correctement bien identifiés. Mélanger doucement la plaque, en évitant de contaminer et débordant puits adjacents, afin de disperser complètement l'échantillon dans son diluant.

**Remarque importante:** Assurez-vous que la couleur du diluant de l'échantillon, lors de l'addition de l'échantillon, passe du vert clair au vert bleuâtre foncé, le suivi que l'échantillon a été vraiment ajouté.

4. Distribuer 50 µL Diluant de Dosage dans tous les contrôles/étalons et puits d'échantillon. Vérifiez que la couleur des échantillons a tourné au bleu foncé.
5. Incuber la microplaque pendant **45 min à 37°C**. Remarque importante: Les bandes doivent être scellés avec la feuille d'étanchéité adhésif, fourni, que lorsque le test est effectué manuellement. Ne couvrez pas les bandes lors de l'utilisation des instruments automatiques ELISA.
6. Laver la microplaque avec une machine à laver automatique en fournissant et en aspirant 350 µL/puits de solution de lavage diluée comme indiqué à la section I.3.
7. Introduire à la pipette 100 µL de Conjugué Enzymatique dans chaque puits, sauf le 1er découpage bien, et couvrir avec le scellant. Vérifiez que cette composante de couleur rouge a été distribuée dans tous les puits, sauf A1.

**Remarque importante:** Veillez à ne pas toucher la surface intérieure du plastique bien avec la pointe rempli avec le conjugué enzymatique. La contamination peut se produire.

8. Incuber la microplaque pendant **45 min à +37°C**.
9. Laver micropuits comme indiqué dans la section I.3.
10. Pipeter 100 µL mélange de Substrat TMB dans chaque puits, le puits blanc inclus. Puis incuber la microplaque à température ambiante (18-24°C) pendant **15 minutes**.

**Remarque importante:** Ne pas exposer à une forte illumination directe. Haut de fond peut être générée.

11. Pipeter 100 µL de Solution d'Arrêt dans tous les puits à l'aide de la même séquence de pipetage comme à l'étape 10 pour arrêter la réaction enzymatique. Addition d'une solution d'arrêt deviendra le contrôle positif et les échantillons positifs du bleu au jaune.
12. Mesurer l'intensité de la couleur de la solution dans chaque puits, comme décrit dans la section I.5, au filtre de 450nm (lecture) et peut-être à 620-630nm (soustraction de fond), suppression de l'instrument sur A1.

#### **Remarques importantes:**

1. Si le deuxième filtre n'est pas disponible, de s'assurer qu'aucun des empreintes digitales sont présents sur le fond de la cupule avant lecture à 450

nm. Les empreintes digitales pourraient générer des résultats faussement positifs sur la lecture.

- La lecture est devrait idéalement être effectuée immédiatement après l'ajout de la solution d'arrêt, mais certainement pas plus de 20 minutes après. Certains auto oxydation du substrat peut se produire conduisant à un fond supérieur.
- Agitation à  $350 \pm 150$  tours par minute pendant l'incubation a été prouvé pour augmenter la sensibilité de l'essai d'environ 20%.

## N. SCHÉMA DU TEST

Méthode	Opérations (Incubation Standard)	Opérations (Incubation Courte)
Étalons et Calibrateur	200 µL	200 µL
Diluant de l'Échantillon et Échantillon	200 µL diluant + 10 µL échantillon	200 µL diluant + 10 µL échantillon
Diluant de Dosage	50 µL	50 µL
<b>1<sup>ère</sup> incubation</b>	<b>60 min (± 3)</b>	<b>45 min (± 2)</b>
Température	+37°C	+37°C
Étape de lavage	4-5 cycles	4-5 cycles
Conjugué Enzymatique	100 µL	100 µL
<b>2<sup>ème</sup> incubation</b>	<b>30 min (± 1)</b>	<b>45 min (± 2)</b>
Température	+37°C	+37°C
Étape de lavage	4-5 cycles	4-5 cycles
Substrat TMB	100 µL	100 µL
<b>3<sup>ème</sup> incubation</b>	<b>30 min (± 1)</b>	<b>15 min (± 1)</b>
Température	Température ambiante (18...24°C)	Température ambiante (18...24°C)
Solution d'Arrêt	100 µL	100 µL
Lecture DO	450/620nm	450/620nm

Un exemple de système de dispense est indiqué ci-dessous (valable pour les deux procédures de temps d'incubation):

### Microplaque

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	S2										
B	NC	S3										
C	NC	S4										
D	NC	S5										
E	CAL	S6										
F	CAL	S7										
G	PC	S8										
H	S1	S9										

Légende: BLK = Blanc NC = Contrôle Négatif  
CAL = Calibrateur PC = Contrôle Positif S = Échantillon

## O. CONTRÔLE DE QUALITÉ INTERNE

Un contrôle est effectué sur les contrôles et le calibrateur une fois que le kit est utilisé afin de vérifier si leurs valeurs sont OD450/620nm comme prévu et reportés dans le tableau ci-dessous.

Vérifier	Condition exigée
Puits blanc	Valeur de la DO à 450 nm/620 nm < 0,100
Contrôle Négatif (NC)	<0,050 signifie OD450/620nm après suppression
Calibrateur	S/Co >1.1
Contrôle Positif	Valeur de la DO à 450 nm/620 nm >1.000

Si les résultats de l'essai correspondent aux exigences énoncées ci-dessus, passez à la section suivante.

S'ils ne le font pas, ne pas aller plus loin et effectuer les contrôles suivants:

Problème	Vérifier
<b>Puits blanc</b> DO à 450 nm > 0,100	1. que la solution de substrat n'a pas été contaminé au cours de l'essai
<b>Contrôle Négatif (NC)</b> DO à 450 nm après suppression > 0.050	1. que la procédure de lavage et les paramètres de lave sont validés comme dans l'étude de pré-qualification; 2. que la solution de lavage appropriée a été utilisée et la rondelle a été amorcée avec elle avant l'utilisation; 3. qu'aucune erreur n'a été fait dans la procédure de test (de dispense de contrôle positif au lieu du négatif); 4. qu'aucune contamination du contrôle négatif ou des puits où le contrôle a été dispensé s'est produite en raison de déversements d'échantillons positifs ou du conjugué d'enzyme; 5. micropipettes qui n'ont pas été contaminés avec des échantillons positifs ou avec le conjugué d'enzyme 6. que les aiguilles de lave-glace ne sont pas bloqués ou partiellement obstruées.
<b>Calibrateur</b> S/Co<1.1	1. que la procédure a été effectuée correctement; 2. qu'aucune erreur s'est produite lors de la distribution (ex.: dispense de contrôle négatif à la place de l'étalon) 3. que la procédure de lavage et les paramètres de lave sont validés comme dans l'étude de pré-qualification; 4. qu'aucune contamination externe du calibrateur s'est produite.
<b>Contrôle Positif</b> DO à 450 nm <1.000	1. que la procédure a été effectuée correctement; 2. qu'aucune erreur s'est produite lors de la distribution de la commande (dispense de contrôle négatif à la place du contrôle positif. Dans ce cas, le contrôle négatif aura une valeur de OD450nm > 0,150, aussi. 3. que la procédure de lavage et les paramètres de lave sont validés comme dans l'étude de pré-qualification; 4. qu'aucune contamination externe du contrôle positif a eu lieu.

Si l'un des problèmes ci-dessus ont eu lieu, signaler le problème au superviseur de nouvelles actions.

## P. RÉSULTATS

Les résultats des tests sont calculées au moyen d'une valeur seuil déterminée selon la formule suivante:

$$\text{Cut-Off (Co)} = \text{NC signifie} + 0.350$$

La valeur trouvée pour le test est utilisé pour l'interprétation des résultats de la manière décrite dans le paragraphe suivant.

## Q. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les résultats des tests sont interprétés comme le rapport de l'échantillon OD450nm et la valeur Cut-Off (ou S/Co) selon le tableau suivant:

S/Co	Interpretation
< 0.9	Négatif
0.9 - 1.1	Équivoque
> 1.1	Positif

Un résultat négatif indique que le patient n'a pas été infecté par le HCV ou que l'unité de sang peut être transfusé. Tout patient présentant un résultat équivoque devrait être testé à nouveau sur un deuxième échantillon prélevé 1-2 semaines plus tard du patient et examiné. L'unité de sang ne doit pas être transfusé.

Un résultat positif indique une infection par le HCV et donc le patient doit être traité en conséquence ou l'unité de sang doit être jeté.

### Remarques importantes:

1. *L'interprétation des résultats doit se faire sous la supervision du responsable du laboratoire pour réduire le risque d'erreurs de jugement et de mauvaises interprétations.*
2. *Tout résultat positif doit être confirmé par une méthode alternative capable de détecter anticorps IgG et IgM (test de confirmation) avant que le diagnostic de l'hépatite virale est formulée.*
3. *Comme l'a montré dans l'évaluation de la performance du produit, le dosage est capable de détecter la séroconversion anticorps anti-HCV de base plus tôt que d'autres kits commerciaux. Par conséquent, un résultat positif, pas confirmé ces kits commerciaux, ne doit pas être écarté comme un faux résultat positif! L'échantillon doit être de toute façon soumis à un test de confirmation.*
4. *Tant que le test est capable de détecter des anticorps IgM également des résultats discordants avec les autres produits du commerce pour la détection des anticorps anti-HCV - dépourvu d'anti conjugué HIGM dans la formulation du traceur enzymatique et donc manquant de réactivité IgM - peuvent être présents. La vraie positivité de l'échantillon pour les anticorps anti-HCV doit être ensuite confirmée par l'examen également la réactivité IgM, important pour le diagnostic de l'infection par le HCV.*
5. *Lorsque les résultats des tests sont transmis par le laboratoire à un centre informatique, une attention doit être fait pour éviter le transfert de données erronées.*
6. *Diagnostic de l'infection virale de l'hépatite doit être fait et publié pour le patient que par un médecin qualifié.*

Un exemple de calcul est rapporté ci-dessous:

*Les données suivantes ne doivent pas être utilisés à la place des chiffres réels obtenus par l'utilisateur.*

*Contrôle Négatif: 0.019 - 0,020 à 0,021 OD450nm*

*Valeur Moyenne: 0,020 à 0,050 OD450nm Basse - Accepté*

*Contrôle positif: 2.189 OD450nm*

*Supérieur à 1.000 - Accepté*

*Cut-Off = 0,020 0,350 = 0,370*

*Calibrateur: 0,550 à 0,530 OD450nm*

*Valeur Moyenne: 0.540 OD450nm S/Co = 1.4*

*S / Co supérieures à 1,1 - Accepté*

*Échantillon 1: 0,070 OD450nm*

*Échantillon 2: 1.690 OD450nm*

*Échantillon 1 S / Co <0,9 = négatif*

*Échantillon 2 S / Co > 1.1 = positif*

## R. PERFORMANCES

Évaluation de la performance a été réalisée conformément à ce que rapportés dans les spécifications techniques communes ou CTS (art. 5, chapitre 3 de la directive IVD 98/79/CE) et les deux procédures d'incubation (standard et courts).

### 1. LIMITE DE DÉTECTION

La limite de détection du test a été calculé en utilisant le test d'incubation est courte par moyen de la norme de travail britannique pour le code anti-HCV, NIBSC 06/188-006. Le tableau ci-dessous indique les valeurs moyennes OD450nm la présente norme lorsque dilué dans le plasma négatif, puis examinés.

Dilution	Lot#1	Lot#2	Lot#3
Facteur	S/Co	S/Co	S/Co
1 X	3,50	4,00	4,30
2 X	2,10	2,60	2,60
4 X	1,3	1,40	1,30
Plasma Négative	0,25	0,20	0,20

En outre, l'échantillon codé Accurun 1 - série 3000 - fourni par Boston Biomedica Inc., Etats-Unis, a été évaluée "in toto" montrant les résultats ci-dessous:

Accurun 1 série	Lot#1	Lot#2	Lot#3
Facteur	S/Co	S/Co	S/Co
1 X	2,90	3,04	3,40

### 2. SPÉCIFICITÉ ET SENSIBILITÉ DIAGNOSTIQUE

L'évaluation de la performance de l'appareil a été réalisée dans un essai mené sur plus de 5000 échantillons au total.

#### 2.1 Spécificité Diagnostique

Il est défini comme la probabilité d'obtenir d'un résultat négatif en l'absence d'un analyte spécifique. Un total de plus de 5000 donateurs non sélectionnés, y compris les donateurs 1er temps, ont été examinés.

La spécificité diagnostique a été évaluée contre un kit US approuvé par la FDA.

5043 donneurs de sang ont été testés fournir une spécificité de 99,5%. 210 patients hospitalisés ont été testés pour le HCV Ab; une spécificité diagnostique de 99,5% a été constatée. En outre, la spécificité du diagnostic a été évaluée en testant 162 échantillons potentiellement interférents (autres maladies infectieuses, anticorps E. coli positif, les patients atteints de maladies non virales hépatiques, les patients



dialysés, les femmes enceintes, hemolized, lipémiques, etc.) Une valeur de spécificité de 100% a été évaluée. Aucune fausse réactivité due à la méthode de préparation des échantillons a été observée. Les deux plasma, dérivé avec des techniques de préparation (citrate, l'EDTA et de l'héparine), et des sérums standards différents ont été utilisés pour déterminer la valeur de la spécificité. Les échantillons congelés ont été testés, ainsi, de vérifier les interférences dues à la collecte et au stockage. Aucune interférence n'a été observée.

## 2.2 Sensibilité Diagnostique

Il a défini comme la probabilité d'obtenir d'un résultat positif en présence d'un analyte spécifique. La sensibilité diagnostique a été évaluée à l'extérieur sur un nombre total de 348 échantillons; une sensibilité diagnostique de 100% a été constatée. En interne, plus de 50 autres échantillons positifs ont été testés, en fournissant une valeur de sensibilité diagnostique de nouveau 100%. Les échantillons positifs des infections menées par différents génotypes du HCV ont été testés ainsi.

En outre, la plupart des panels de séroconversion disponibles à partir de Boston Biomedica Inc., Etats-Unis, (PHV) et Zeptometrix, Etats-Unis, (HCV) ont été étudiés.

Les résultats sont rapportés ci-dessous pour quelques-uns d'entre eux.

Panneau	N° Échantillon	Adaltis <sup>1</sup>	Ortho <sup>1,2</sup>
PHV 901	11	9	9
PHV 904	7	2	4
PHV 905	9	3	4
PHV 906	7	7	7
PHV 907	7	3	2
PHV 908	13	10	8
PHV 909	3	2	2
PHV 910	5	3	3
PHV 911	5	3	3
PHV 912	3	1	1
PHV 913	4	2	2
PHV 914	9	5	5
PHV 915	4	3	0
PHV 916	8	4	3
PHV 917	10	6	6
PHV 918	8	2	0
PHV 919	7	3	3
PHV 920	10	6	6
HCV 10039	5	2	0
HCV 6212	9	6	7
HCV 10165	9	5	4

Remarque:

1. Les échantillons positifs détectés
2. HCV v.3.0

Enfin, le produit a été testé sur le panneau EFS Ac HCV, beaucoup n° 06.140817, fourni par l'Etablissement Français du Sang (EFS), la France, avec les résultats suivants:

## EFS Panel Ac HCV

Echantillon	Lot#1 S/Co	Lot#2 S/Co	Lot#3 S/Co	Valeur Moyenne
HCV 1	0,53	0,52	0,55	Negative
HCV 2	3,28	5,91	3,04	Positive
HCV 3	2,17	3,18	2,56	Positive
HCV 4	2,26	2,23	2,35	Positive
HCV 5	6,10	7,06	6,90	Positive
HCV 6	1,66	1,77	1,67	Positive

## 3. PRECISION

Il a été calculé sur cinq échantillons, un négatif et quatre positifs examinés dans 4 répétitions dans chacune des six séries distinctes. La précision obtenue pour les deux protocoles, est équivalent.

Les résultats sont présentés comme suit:

*Résultats intra-lot: EIAgen HCV Ab (v.4) Kit – 1<sup>ère</sup> Lot (test d'incubation court)*

Échantillon	S/Co Moyenne	Precision - %CV		
		Intra Essai	Inter Essai	Total
Négatif	0.03	6.66	10.56	12.48
Positifs	1.20	8.52	8.49	12.03
	1.51	7.69	12.22	14.44
	3.57	7.43	11.82	13.97
	11.87	3.42	9.32	9.92

*Résultats intra-lot: EIAgen HCV Ab (v.4) Kit - 1<sup>er</sup> lot (test d'incubation longue)*

Échantillon	S/Co Moyenne	Precision - %CV		
		Intra Essai	Inter Essai	Total
Négatif	0.04	4.67	12.34	13.19
Positifs	1.47	9.62	11.40	14.92
	1.82	8.92	12.77	15.58
	4.31	4.59	12.88	13.67
	13.78	2.42	8.96	9.26

*Résultats inter-lot: EIAgen HCV Ab (v.4) Kit - 1<sup>ère</sup>, 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> Lot (test d'incubation courte)*

Échantillon	Precision - %CV		
	Lot 1	Lot 2	Lot 3
Négatif	8,65	8,29	6,13
Calibrateur	4,98	4,44	5,38
Positif	4,11	3,11	1,37

La variabilité indiquée dans les tableaux ci-dessus n'a pas abouti à une classification erronée échantillon.

## S. SUGGESTIONS POUR REMEDIER

Le respect de la procédure de test et les spécifications, ainsi que d'une bonne utilisation de réactifs et de pipetage correct, peut aider à éviter les types d'erreurs suivants:

ERREUR	CAUSES POSSIBLES / SUGGESTIONS
OD très différent ( $\pm 50\%$ ) de la DO a rapporté QC	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Le volume incorrect de distribution de réactifs (suggestion: vérifier la correspondance entre le volume distribué par la pipette et celui requis par l'essai; re-calibrer à nouveau pipettes)</li> <li>- Température incorrecte ou mauvaise heure d'incubation (suggestion: plus de soin dans le maintien de l'incubateur; noter le début de l'incubation)</li> <li>- Erreur dans le lavage ou photométrie (suggestion: vérifier les paramètres de fonctionnement ou instruments respectifs)</li> <li>- Contamination de substrat ou conjugué (suggestion: utiliser uniquement des contenants de plastique jetables et propres)</li> </ul>
Faibles résultats reproductibles	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pas de volume constant de distribution d'échantillons ou de réactifs (suggestion: vérifier la précision des pipettes et la correspondance entre le volume distribué par la pipette et celui requis par l'essai; re-calibrer à nouveau pipettes)</li> <li>- Erreur dans le lavage ou en lecture (suggestion: vérifier les paramètres de fonctionnement ou instruments respectifs)</li> <li>- Contamination de substrat (suggestion: utiliser uniquement des contenants de plastique jetables et propres)</li> <li>- La pollution ou la dégradation des réactifs (suggestion: utiliser des conseils appropriés, jetables et des contenants de plastique propres pour réactifs et de haute qualité l'eau distillée ou équivalent)</li> </ul>
aucune réaction colorimétrique après addition du substrat	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Certains réactif pas pipette</li> <li>- Une forte contamination du conjugué et du substrat</li> <li>- Erreurs dans l'exécution de la procédure d'essai (par exemple de pipetage accidentelle de réactifs dans une séquence de mal ou de la mauvaise flacon, etc)</li> </ul>
trop faible réaction (trop faible DO)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Temps d'incubation trop court, la température d'incubation trop faible</li> <li>- Incorrect conjugué dilution</li> </ul>
trop grande réaction (trop élevés DO) - incorrect conjugué dilution	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Temps d'incubation trop long, température d'incubation trop élevée</li> <li>- Qualité de l'eau pour le tampon de lavage insuffisant (bas grade de désionisation)</li> <li>- Lavage insuffisant (conjugués pas correctement supprimé)</li> </ul>
aberrantes inexplicables	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Contamination des pipettes, des conseils ou des conteneurs</li> <li>- Laver inconstant et insuffisante (conjugués pas correctement supprimé)</li> </ul>

ERREUR	CAUSES POSSIBLES / SUGGESTIONS
trop élevé intra-série CV%	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Réactifs et/ou des bandes pas préchauffée à la température ambiante avant de les utiliser</li> <li>- Plaque rondelle n'est pas laver correctement (suggestion: tête de nettoyage de la laveuse)</li> </ul>
trop grande entre les séries CV%	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Conditions d'incubation pas constant (temps, température)</li> <li>- Des contrôles et des échantillons non distribués en même temps (avec les mêmes intervalles) (vérifier afin de pipetage)</li> <li>- Variation liées à la personne</li> </ul>

## T. AUTOMATISATION

Les procédures définies dans la présente instruction d'utilisation sont pour les tests manuels seulement. Lors de l'utilisation d'instruments automatisés, suivez les procédures qui figurent dans le manuel de l'opérateur fourni par le fabricant de l'appareil. Les laboratoires doivent suivre les procédures de validation agréés de démontrer la compatibilité de ce produit sur des systèmes automatisés.

## U. LIMITATIONS

Résultats faux positifs répétables, non confirmés par RIBA ou techniques de confirmation similaires, ont été évalués comme moins de 0,1% de la population normale.

Les échantillons congelés contenant des particules ou agrégats de fibrine après décongélation ont été observées pour produire des résultats erronés.

## REFERENCES

1. CDC. Public Health Service inter-agency guidelines for screening donors of blood, plasma, organs, tissues, and semen for evidence of hepatitis B and hepatitis C. *MMWR* 1991;40(No. RR-4):1-17.
2. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C. *Hepatology* 1997;26:62S-5S.
3. McQuillan GM, Alter MJ, Moyer LA, Lambert SB, Margolis HS. A population based serologic study of hepatitis C virus infection in the United States. In Rizzetto M, Purcell RH, Gerin JL, Verme G, eds. *Viral Hepatitis and Liver Disease*, Edizioni Minerva Medica, Turin, 1997, 267-70.
4. Dufour MC. Chronic liver disease and cirrhosis. In Everhart JE, ed. *Digestive diseases in the United States: epidemiology and impact*. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. Washington, DC: US Government Printing Office, 1994; NIH publication no. 94-1447, 615-45.
5. Alter MJ, Hadler SC, Judson FN, et al. Risk factors for acute non-A, non-B hepatitis in the United States and association with hepatitis C virus infection. *JAMA* 1990;264:2231-35.
6. Alter HJ, Holland PV, Purcell RH, et al. Posttransfusion hepatitis after exclusion of commercial and hepatitis-B antigen-positive donors. *Ann Intern Med* 1972;77:691-9.
7. Alter HJ, Purcell RH, Holland PV, Feinstone SM, Morrow AG, Moritsugu Y. Clinical and serological analysis of transfusion-associated hepatitis. *Lancet* 1975;2:838-41.
8. Seeff LB, Wright EC, Zimmerman HJ, McCollum RW, VA Cooperative Studies Group. VA cooperative study of post-transfusion hepatitis and responsible risk factors. *Am J Med Sci* 1975;270:355-62.
9. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med* 1975;292:767-70.
10. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989;244:359-62.
11. Kuo G, Choo QL, Alter HJ, et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 1989;244:362-4.
12. Alter HJ, Purcell RH, Shih JW, et al. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 1989;321:1494-1500.
13. Aach RD, Stevens CE, Hollinger FB, et al. Hepatitis C virus infection in post-transfusion hepatitis. An analysis with first- and second-generation assays. *N Engl J Med* 1991;325:1325-9.
14. Alter MJ, Margolis HS, Krawczynski K, Judson FN, Mares A, Alexander WJ, et al. The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. *N Engl J Med* 1992;327:1899-1905.
15. Alter, MJ. Epidemiology of hepatitis C in the west. *Semin Liver Dis* 1995;15:5-14.
16. Donahue JG, Nelson KE, Muñoz A, et al. Antibody to hepatitis C virus among cardiac surgery patients, homosexual men, and intravenous drug users in Baltimore, Maryland. *Am J Epidemiol* 1991;134:1206-11.
17. Zeldis JB, Jain S, Kuramoto IK, et al. Seroepidemiology of viral infections among intravenous drug users in northern California. *West J Med* 1992;156:30-5.
18. Fingerhood MI, Jasinski DR, Sullivan JT. Prevalence of hepatitis C in a chemically dependent population. *Arch Intern Med* 1993;153:2025-30.
19. Garfein RS, Vlahov D, Galai N, Doherty, MC, Nelson, KE. Viral infections in short-term injection drug users: the prevalence of the hepatitis C, hepatitis B, human immunodeficiency, and human Tlymphotropic viruses. *Am J Pub Health* 1996;86:655-61.
20. Brettler DB, Alter HJ, Deinstag JL, Forsberg AD, Levine PH. Prevalence of hepatitis C virus antibody in a cohort of hemophilia patients. *Blood* 1990;76:254-6.
21. Troisi CL, Hollinger FB, Hoots WK, et al. A multicenter study of viral hepatitis in a United States hemophilic population. *Blood* 1993;81:412-8.
22. Kumar A, Kulkarni R, Murray DL, et al. Serologic markers of viral hepatitis A, B, C, and D in patients with hemophilia. *J Med Virology* 1993;41:205-9.
23. Tokars JI, Miller ER, Alter MJ, Arduino MJ. National surveillance of dialysis associated diseases in the United States, 1995. *ASAIO Journal* 1998;44:98-107.
24. Osmond DH, Charlebois E, Sheppard HW, et al. Comparison of risk factors for hepatitis C and hepatitis B virus infection in homosexual men. *J Infect Dis* 1993;167:66-71.
25. Weinstock HS, Bolan G, Reingold AL, Polish LB: Hepatitis C virus infection among patients attending a clinic for sexually transmitted diseases. *JAMA* 1993;269:392-4.
26. Thomas DL, Cannon RO, Shapiro CN, Hook EW III, Alter MJ. Hepatitis C, hepatitis B, and human immunodeficiency virus infections among non-intravenous drug-using patients attending clinics for sexually transmitted diseases. *J Infect Dis* 1994;169:990-5.
27. Buchbinder SP, Katz MH, Hessel NA, Liu J, O'Malley PM, Alter, MJ. Hepatitis C virus infection in sexually active homosexual men. *J Infect* 1994;29:263-9.
28. Thomas DL, Zenilman JM, Alter HJ, et al. Sexual transmission of hepatitis C virus among patients attending sexually transmitted diseases clinics in Baltimore—an analysis of 309 sex partnerships. *J Infect Dis* 1995;171:768-75.
29. Thomas DL, Factor SH, Kelen GD, Washington AS, Taylor E Jr, Quinn TC. Viral hepatitis in health care personnel at The Johns Hopkins Hospital. *Arch Intern Med* 1993;153:1705-12.
30. Cooper BW, Krusell A, Tilton RC, Goodwin R, Levitz RE. Seroprevalence of antibodies to hepatitis C virus in high-risk hospital personnel. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1992;13:82-5.
31. Abdel-Hamid, M., M. El-Day, S. El-Kafrawy, N. Mikhail, G.T. Strickland, and A.D. Fix. 2002. Comparison of second- and third-generation enzyme immunoassays for detecting antibodies to hepatitis C virus. *J. Clin. Microbiol.* 40:1656-1659.
32. Dusheiko, G., H. Schlimovitz-Weiss, D. Brown, F. McOmish, P.-L. Yap, S. Sherlock, N. McIntyre, and P. Simmonds. 1994. Hepatitis C virus genotypes: an investigation of type-specific differences in geographic origin and disease. *Hepatology* 19:13-18.
33. Gretch, D. Diagnostic tests for hepatitis C. The article can be found at: <http://www.hepnet.com/nih/gretch.html>. It was written as part of a National Institute of Health Conference on Hepatitis C, held from March 24-26, 1997 in Bethesda Maryland
34. Mondelli, M.U., A. Cerino, F. Bono, A. Cividini, A. Maccabruni, M. Aricò, A. Malfitano, G. Barbarini, V. Piazza, L. Minoli, and E. Silini. 1994. Hepatitis C virus (HCV) core serotype in chronic HCV infection. *J. Clin. Microbiol.* 32:2523-2527.
35. Ohno, T., M. Mizokami, R.-R. Wu, M.G. Saleh, K.-I. Ohba, E. Orito, M. Mukaide, R. Williams, and J.Y.N. Lau. 1997. New hepatitis C virus (HCV) genotyping system that allows for the identification of HCV genotype 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4, 5a, and 6a. *J. Clin. Microbiol.* 35:201-207.
36. Takada, N., S. Takase, N. Enomoto, A. Takada, and T. Date. 1992. Clinical backgrounds of the patients having different types of hepatitis C virus genome. *J. Hepatol.* 14:35-40.
37. Yoshioka, K., S. Kakumu, T. Wakita, T. Ishikawa, Y. Itoh, M. Takayanagi, Y. Higashi, M. Shibata, and T. Morishima. 1992. Detection of hepatitis C virus by polymerase chain reaction and response to interferon- $\alpha$  therapy: relationships to genotypes of hepatitis C virus. *Hepatology* 16:293-299.

# EIAgen

## HCV Ab (v.4) Kit

REF 071067

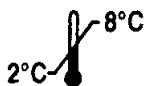
$\Sigma$  96

REF 071064

$\Sigma$  192

REF 071068

$\Sigma$  480



IVD

CE 0459

Leggere attentamente questo foglietto illustrativo prima di effettuare il dosaggio ed attenersi scrupolosamente alle istruzioni che vi sono riportate.  
L'affidabilità dei risultati è garantita soltanto se le istruzioni vengono seguite attentamente.



**Fabbricante:**  
**Adaltis S.r.l**  
Via Durini, 27  
20122 Milano (Italy)  
Tel. +39-0774-5791 - Fax +39-0774-353085  
[www.adaltis.net](http://www.adaltis.net)

it

**SIMBOLI UTILIZZATI NELLE ETICHETTE**

<p align="center"><b>Italiano</b></p> 							
	Dispositivo Medico Diagnostico in Vitro	Numero di Catalogo	Numero di Lotto	Attenzione, leggere le Istruzioni per l'uso	Limiti di Temperatura	Utilizzare Entro	Numero di Test
							
	Fabbricante	Proteggere dalla Luce Solare	Data di Fabbricazione	Micropiastra	Controllo Positivo	Controllo Negativo	Calibratore
							
	Coniugato	Diluyente Campioni	Substrato TMB	Soluzione Bloccante (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.3M)	Tampone di Lavaggio Concentrata 20x	Diluyente del Saggio	Ricostituire con x mL

## A. FINALITA' D'USO

Dosaggio Immunoenzimatico (ELISA) di quarta generazione per la determinazione degli anticorpi anti Virus dell'Epatite C in plasmi (EDTA, Eparina e Citrato) e sieri umani. Il kit può essere usato per la ricerca degli anticorpi nelle unità di sangue di pazienti affetti da HCV. Solo per uso diagnostico in vitro.

## B. INTRODUZIONE

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) definisce l'infezione da Epatite C come segue:

“L'Epatite C è un'infezione virale del fegato che è stata attribuita a epatiti “non A, non B” parenteralmente trasmesse fino all'identificazione dell'agente causante nel 1989. La scoperta e la caratterizzazione del virus dell'epatite C (HCV) porta alla comprensione del suo primario ruolo nelle epatiti post-trasfusione e la sua tendenza ad indurre infezioni persistenti”.

L'HCV è trasmesso principalmente per contatto diretto con sangue umano. Le maggiori cause di HCV nel mondo sono l'uso di unità di sangue non controllato per le trasfusioni e il riutilizzo di aghi e siringhe non adeguatamente sterilizzati.

Nessuno vaccino è al momento disponibile per prevenire l'epatite C e il trattamento delle epatiti C croniche troppo costoso perché i popoli dei paesi in via di sviluppo possano permetterselo. Allora, da una prospettiva globale, il più grande impatto sui malati di epatite C sarà ottenuto focalizzando gli sforzi sulla riduzione dei rischi della trasmissione di HCV da esposizioni nosocomiali (trasfusioni di sangue, iniezioni non sicure) e comportamenti ad alto rischio (iniezione di droghe).

Il virus dell'epatite C (HCV) è uno dei virus (A, B, C, D, e E), che sono responsabili della maggioranza dei casi di epatite virale. E' un virus RNA avvolto della famiglia Flaviviridae che mostra di avere uno stretto spettro d'ospite. Gli umani e gli scimpazee sono le sole specie suscettibili all'infezione ed entrambi sviluppano le stesse malattie. Una caratteristica importante del virus è la relativa mutabilità del genoma, che è probabilmente legata all'alta tendenza (80%) nell'indurre infezioni croniche. L'HCV è riunito in diversi genotipi distinti che possono essere importanti nella determinazione della gravità della malattia e la risposta al trattamento.

Il periodo di incubazione dell'infezione da HCV primadell'inizio dei sintomi clinici va da 15 a 150 giorni. Nelle infezioni acute i sintomi più comuni sono affaticamento e itterizia; comunque la maggior parte dei casi (tra il 60% e il 70%), anche quelli che sviluppano l'infezione cronica, sono asintomatici. Circa l'80% dei nuovi pazienti infettati sviluppa un'infezione cronica. Cirrosi si sviluppano all'incirca dal 10% al 20% che hanno un'infezione cronica, mentre cancro al fegato si manifesta tra l'1% e il 5% delle persone che hanno un'infezione cronica per un periodo da 20 a 30 anni. La maggior parte di pazienti che soffrono di cancro al fegato che non presentano infezione da epatite B mostrano infezione da HCV. Il meccanismo per cui l'infezione da HCV porta al cancro al fegato non è ancora ben chiaro.

L'epatite C accresce la gravità delle malattie del fegato quando coesiste con altre condizioni epatiche. In particolare, le malattie del fegato progrediscono più rapidamente in persone con malattie epatiche provocate da abuso di alcol e con infezione da HCV. L' HCV è trasmessa principalmente per contatto diretto con sangue infetto. La trasmissione attraverso trasfusioni di sangue non esaminato per l'HCV, il riutilizzo di aghi, siringhe e altre attrezzature mediche non adeguatamente sterilizzate, o attraverso lo scambio di aghi tra drogati, è molto ben documentata. La trasmissione per via sessuale o perinatale può anche avvenire ma meno frequentemente. Altri modi di trasmissione legati a pratiche comportamentali, sociali, culturali (body piercing, circoncisioni e tatuaggi) possono avvenire se vengono utilizzati strumenti non adeguatamente sterilizzati. L' HCV non è trasmesso attraverso starnuti, abbracci, tosse, cibo o acqua, condividendo posate o bicchieri o per contatto casuale. Sia nei paesi sviluppati che quelli in via di sviluppo, gruppi ad alto rischio includono gli utilizzatori di droghe iniettabili, i riceventi di sangue non esaminato, emofilici, dializzati e persone con numerosi partners sessuali che praticano rapporti non protetti. Nei paesi sviluppati, si stima che il 90% delle persone con infezione da HCV cronica siano principalmente utilizzatori di droghe iniettabili e quelli con una storia di trasfusioni di sangue non esaminato o emoderivati. Nella maggior parte dei paesi in via di sviluppo, dove sangue e emoderivati non esaminati sono ancora usati, il principale mezzo di trasmissione dell'infezione sono strumenti per le iniezioni non sterilizzati e trasfusioni di sangue non controllato. Inoltre le persone che praticano riti sacrificali e circoncisioni sono a rischio se usano o riusano ferri non sterilizzati.

L'OMS stima che circa 170 milioni di persone, il 3% della popolazione mondiale sono infettate da HCV e sono a rischio di sviluppare cirrosi e/o cancro al fegato. La prevalenza dell'infezione HCV in Africa, Medio Oriente, Sud Est asiatico e Pacifico occidentale è alta se comparata con Nord America ed Europa.

I test diagnostici per HCV sono usati per prevenire l'infezione attraverso lo screening dei donatori di sangue e plasma, per stabilire la diagnosi clinica e prendere meglio decisioni riguardo la cura di un paziente. I tests diagnostici oggi disponibili sono basati su dosaggi immunoenzimatici (EIA) per la rilevazione di specifici anticorpi HCV. Il sistema EIA può rilevare più del 95% di pazienti cronicamente infetti ma solo dal 50% al 70% delle infezioni acute. Un saggio immunoblot ricombinante (RIBA) che identifica gli anticorpi che reagiscono con antigeni individuali HCV è spesso usato come un test supplementare per la conferma di un risultato EIA positivo. Test per HCV basati sull'amplificazione dell' RNA (es. PCR, saggio a DNA legato) è anche stato usato per la conferma del risultato serologico sia per l'assegnazione di un'efficace terapia antivirale. Un risultato positivo indica la presenza di infezione attiva e la possibilità di diffusione dell'infezione e/o lo sviluppo di malattie croniche del fegato.

Farmaci antivirali come l'interferone assunto da solo o in combinazione con ribavirina, può essere usata per il trattamento di persone con epatite C cronica, ma il costo

del trattamento è molto alto. Il trattamento con interferone da solo è efficace in circa il 10%-20% dei pazienti. L'interferone combinato con ribavirina è efficace nel 30%-50% dei pazienti. La ribavirina non sembra essere efficace quando usata da sola.

Non c'è nessun vaccino efficace contro l'HCV. La ricerca procede ma l'alta mutabilità del genoma dell'HCV complica lo sviluppo di un vaccino. La mancanza di conoscenze di qualche risposta immuno-protettiva seguente l'infezione da HCV impedisce anche la ricerca del vaccino. Nemmeno si sa se il sistema immunitario è in grado di eliminare il virus.

Qualche studio comunque ha mostrato la presenza di anticorpi neutralizzanti il virus nei pazienti affetti da HCV. In assenza di un vaccino, devono essere prese tutte le precauzioni per prevenire l'infezione incluse (a) screening e test di sangue e organi; (b) disattivazione del virus in plasmi e prodotti derivati; (c) accrescimento e mantenimento delle pratiche di controllo dell'infezione nei protocolli d'attenzione sanitaria, come l'appropriata sterilizzazione di strumenti medici e dentali; (d) la promozione di cambiamenti nei comportamenti tra la gente comune e gli operatori sanitari per ridurre l'uso eccessivo di iniezioni e la pratica di iniezioni sicure; (e) la riduzione del rischio per persone che fanno uso di droga e pratiche sessuali ad alto rischio".

Il genoma codifica per i componenti strutturali, una proteina nucleocapsidica e glicoproteine dell'envelope, e i costituenti funzionali coinvolti nella replicazione del virus e nel processamento delle sue proteine. La regione codificante nucleocapsidica sembra essere la più conservativa tra gli isolati ottenuti nel mondo.

### C. PRINCIPIO DEL TEST

Le micropiastre sono coattate con antigeni HCV-specifici derivanti dalle regioni "core" e "ns" codificanti per i conservativi e i determinanti antigenici immunodominanti (Core peptide, ricombinante NS3, NS4 e NS5 peptidi).

La fase solida è prima trattata con il campione diluito e gli anticorpi HCV sono catturati, se presenti, dagli antigeni. Dopo aver lavato via tutti gli altri componenti del campione, nella seconda incubazione legati gli anticorpi HCV, le IgG e le IgM sono rilevate dall'aggiunta di specifici anticorpi policlonali anti IgG&M, etichettati con perossidasi (HRP).

L'enzima catturato sulla fase solida, reagendo con la miscela substrato TMB, genera un segnale ottico che è proporzionale alla quantità di anticorpi anti HCV presenti nel campione. Un valore di cut-off permette di interpretare le densità ottiche in risultati positivi e negativi in anticorpi HCV.

### D. COMPONENTI

Il kit contiene reagenti per 96 tests (codice 071067), 192 tests (codice 071064), o 480 tests (codice 071068).

<b>Micropiastra</b>	1
<b>Controllo Negativo</b>	1x4 mL/flacone
<b>Controllo Positivo</b>	1x2 mL/flacone
<b>Calibratore</b>	2 flaconi
<b>Soluzione di Lavaggio conc. 20x</b>	1x50 mL/flacone
<b>Coniugato</b>	1x16 mL/flacone
<b>Diluyente dei Campioni</b>	1x50 mL/flacone
<b>Substrato TMB</b>	1x16 mL/flacone
<b>Soluzione Bloccante</b>	1x15 mL/flacone
<b>Diluyente del Saggio</b>	1x8 mL/flacone
<b>Foglio copripiastra</b>	2
<b>Numero dei tests</b>	96
<b>Codice</b>	071067

<b>Micropiastra</b>	2
<b>Controllo Negativo</b>	2x4 mL/flaconi
<b>Controllo Positivo</b>	1x4 mL/flacone
<b>Calibratore</b>	3 flaconi
<b>Soluzione di Lavaggio conc. 20x</b>	2x50 mL/flaconi
<b>Coniugato</b>	2x16 mL/flaconi
<b>Diluyente dei Campioni</b>	2x50 mL/flaconi
<b>Substrato TMB</b>	2x16 mL/flaconi
<b>Soluzione Bloccante</b>	2x15 mL/flaconi
<b>Diluyente del Saggio</b>	2x8 mL/flaconi
<b>Foglio copripiastra</b>	4
<b>Numero dei tests</b>	192
<b>Codice</b>	071064

<b>Micropiastra</b>	5
<b>Controllo Negativo</b>	1x20 mL/flacone
<b>Controllo Positivo</b>	1x10 mL/flacone
<b>Calibratore</b>	7 flaconi
<b>Soluzione di Lavaggio conc. 20x</b>	5x50 mL/flaconi
<b>Coniugato</b>	2x40 mL/flaconi
<b>Diluyente dei Campioni</b>	5x50 mL/flaconi
<b>Substrato TMB</b>	2x40 mL/flaconi
<b>Soluzione Bloccante</b>	2x40 mL/flaconi
<b>Diluyente del Saggio</b>	1x40 mL/flacone
<b>Foglio copripiastra</b>	10
<b>Numero dei tests</b>	480
<b>Codice</b>	071068

#### 1. Micropiastra

12 strips di 8 microcelle coattate con Core peptide, ricombinante NS3, NS4 e NS5 peptidi. Le piastre sono sigillate in una busta di alluminio con essicante.

Portare la micropiastra a temperatura ambiente (18...24°C) prima di aprire la busta. Risigillare le strips non utilizzate nella busta con l'essicante e conservare a 2...8°C.

#### 2. Controllo Negativo

Controllo pronto all'uso. Contiene tampone Na-citrato 10 mM a pH 6.0 ± 0.1, 2% di caseina e 0.1% Kathon CG come conservante. Il controllo negativo è codificato di colore verde oliva.

#### 3. Controllo Positivo

Controllo pronto all'uso. Contiene l'1% di proteine da siero di capra, anticorpi umani positivi all'HCV, tampone Na-citrato 10 mM a pH 6.0±0.1, 0.5% Tween 20, 0.09% Na-azide e 0.1% Kathon CG come conservanti. Il controllo positivo è codificato di colore verde scuro.

**Nota Importante:** L'assenza di agenti patogeni vitali nel Controllo Positivo non può essere pienamente garantita,

e quindi, il reagente deve essere trattato come potenzialmente infetto, in conformità con le buone pratiche di laboratorio.

#### 4. Calibratore

Calibratore liofilo. Deve essere disciolto con il volume di acqua grado EIA riportato sull'etichetta. Contiene proteine da siero bovino fetale, anticorpi all'HCV umani il cui contenuto è calibrato su NIBSC Working Standard codice 06/188-006, 10mM di tampone Na-citrato a pH  $6.0 \pm 0.1$ , 0.3 mg/mL di gentamicina solfato e 0.1% di Kathon CG come conservanti.

**Nota Importante:** L'assenza di agenti patogeni vitali nel Calibratore non può essere pienamente garantita, e quindi, il reagente deve essere trattato come potenzialmente infetto, in conformità con le buone pratiche di laboratorio.

**Note:** il volume necessario per sciogliere il contenuto della fiala può variare da lotto a lotto. Si prega di usare il corretto volume riportato sull'etichetta.

#### 5. Soluzione di Lavaggio Concentrata 20x

Soluzione concentrata 20X. Una volta diluita, la soluzione di lavaggio (tampone di lavaggio diluito) contiene tampone fosfato 10 mM a pH  $7.0 \pm 0.2$ , 0.05% Tween 20 e 0.05% Kathon CG.

Una volta diluita la soluzione di lavaggio rimane stabile per 1 settimana a 2...8°C.

#### 6. Coniugato

Reagente pronto all'uso e codificato di colore rosso. Contiene perossidasi di rafano coniugata a anticorpi policlonali di capra ad IgG e IgM umane, 5% BSA, tampone Citrato 10 mM a pH  $6.4 \pm 0.1$ , 0.1% Proclin e 0.05% Tween 20 come conservanti.

#### 7. Substrato TMB

Componente pronto all'uso. Contiene tampone citrato-fosfato 50 mM a pH 3.5-3.8, dimetil-solfossido al 4%, 0.03% di tetrametilbenzidina (TMB) e 0.02% di perossido d'idrogeno ( $H_2O_2$ ). Miscelare gentilmente prima dell'uso.

**Nota:** Deve essere conservato protetto dalla luce in quanto sensibile alla forte illuminazione.

#### 8. Diluente del Saggio

Componente pronto all'uso. Contiene siero di capra, soluzione tamponata di Tris 10mM a pH  $8.0 \pm 0.1$  contenente 0.1% di Kathon CG e 0.09% Na-azide per il pretrattamento dei campioni e dei controlli in piastra, bloccando le interferenze.

#### 9. Soluzione Bloccante

Componente pronto all'uso.

Contiene una soluzione 0.3 M di  $H_2SO_4$ . Miscelare gentilmente prima dell'uso.

**La MSDS è disponibile su richiesta dell'utilizzatore professionale**

#### 10. Diluente Campione

Componente pronto all'uso e codificato di colore verde scuro. Contiene 1% di caseina, tampone Na-citrato 10 mM a pH  $6.0 \pm 0.1$  e 0.1% Kathon CG come conservante.

Usare per diluire il campione.

**Nota: Il diluente cambia colore da verde oliva a verde scuro-blu in presenza del campione.**

#### E. MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

1. Micropipette calibrate (200  $\mu$ L e 10  $\mu$ L) e puntali usa e getta.
2. Acqua di grado EIA (bidistillata o deionizzata, trattata con carbone attivo per rimuovere gli ossidanti chimici usati come disinfettanti).
3. Timer con intervallo di tempo di 60 min o più.
4. fogli di carta assorbente.
5. Incubatore termostatico calibrato per micropiastre ELISA in grado di fornire una temperatura di +37°C.
6. Lettore calibrato di microcelle ELISA con lettura a 450nm possibilmente con filtri a 620-630nm per la determinazione del bianco.
7. Lavatore calibrato di micropiastre ELISA.
8. Vortex o similari strumenti per miscelare.

#### F. AVVERTENZE E PRECAUZIONI

1. Il kit deve essere usato solo da personale tecnico specializzato e correttamente addestrato, sotto la supervisione del medico responsabile del laboratorio. Leggere attentamente questo foglietto illustrativo prima di effettuare il dosaggio ed attenersi scrupolosamente alle istruzioni che vi sono riportate.
2. Quando il kit è usato per lo screening di unità di sangue e componenti del sangue, deve essere usato in un laboratorio certificato e qualificato dall'autorità nazionale in quel campo (Ministero della Sanità o simili) per eseguire questo tipo di analisi.
3. Tutto il personale coinvolto nell'esecuzione del saggio deve indossare abiti protettivi da laboratorio, guanti in lattice senza talco e occhiali. L'uso di ogni dispositivi appuntito (aghi) o tagliente (lame) dovrebbe essere evitato. Tutto il personale coinvolto dovrebbe essere addestrato sulle procedure di sicurezza personale, come raccomandato dal Centro per il Controllo delle Malattie di Atlanta, US. e riportato nella pubblicazione dell'Istituto Nazionale di Sanità: "Sicurezza personale nei Laboratori Microbiologici e Biomedici", ed. 1984.
4. Tutto il personale coinvolto nel maneggiare i campioni dovrebbe essere vaccinato per HBV e HAV, per cui i vaccini sono disponibili sicuri ed efficaci.
5. L'ambiente di laboratorio dovrebbe essere controllato così da evitare contaminazioni da polvere e agenti microbiologici nell'aria, quando si aprono le fiale e la micropiastra del kit e quando viene eseguito il test. Proteggere il cromogeno/substrato TMB dalla luce forte ed evitare vibrazioni del banco di lavoro una volta iniziato il test.
6. Dal ricevimento, conservare il kit a 2...8°C in un frigorifero o camera fredda a temperatura controllata.
7. Non scambiare i componenti tra differenti lotti del kit. E' raccomandato non scambiare i componenti di due kit dello stesso lotto.
8. Controllare che i reagenti siano limpidi e non contengano grosse particelle o aggregati. Se ciò accade allertare il supervisore del laboratorio per iniziare le necessarie procedure per la sostituzione del kit.



9. Evitare contaminazioni incrociate tra campioni di sieri/plasmi usando puntali monouso e cambiandoli dopo ogni campione.
10. Evitare contaminazioni incrociate tra i reagenti del kit usando puntali monouso e cambiandoli per l'uso di ogni componente.
11. Non usare il kit dopo la data di scadenza impressa sulla confezione esterna e sull'etichetta di ogni singola fiala all'interno.
12. Trattare tutti i campioni come potenzialmente infetti. Tutti i sieri umani dovrebbero essere maneggiati secondo il Livello 2 di BioSicurezza, come raccomandato dal Centro per il Controllo delle Malattie, Atlanta, US. insieme con quanto riportato nella pubblicazione dell'Istituto di Sanità: "BioSicurezza nei laboratori Microbiologici e Biomedicali", ed. 1984.
13. L'uso di contenitori di plastica monouso è raccomandato per la preparazione dei componenti liquidi o per i componenti trasferiti nelle postazioni automatizzate, questo per evitare contaminazioni incrociate.
14. I prodotti di scarto durante l'uso del kit devono essere scaricati secondo le direttive nazionali e le leggi riguardanti i rifiuti di sostanze chimiche e biologiche di laboratorio. In particolare, gli scarichi liquidi generati dalla procedura di lavaggio, da avanzi dei controlli e dai campioni devono essere trattati come materiali potenzialmente infetti e inattivati prima di essere eliminati. Si suggerisce di inattivare per trattamento con una soluzione di ipoclorito di sodio al 10% per 16-18 ore o disattivazione a caldo in autoclave a 121°C per 20 minuti.
15. Rovesciamenti accidentali dei campioni durante le operazioni devono essere assorbiti con fogli di carta imbevuti di ipoclorito di sodio e poi sciacquati con acqua. I fogli di carta vanno poi gettati nell'apposito contenitore dei rifiuti per materiali biologici.
16. La Soluzione bloccante contiene acido solforico allo 0.3 M. Evitare il contatto con pelle e occhi. In caso di contatto sciacquare subito e abbondantemente con acqua.
17. Le soluzioni reagenti che contengono sodio azide o thimerosal quali conservanti, devono essere trattate seguendo le disposizioni e le leggi al riguardo che vigenti nello Stato in cui si opera. L'eliminazione di soluzioni contenenti sodio azide prevede l'uso di acqua corrente in grande quantità. Porre attenzione al fatto che la sodio azide può formare composti esplosivi a contatto prolungato con piombo e rame.
18. Non fumare, non mangiare o applicare cosmetici nelle aree dove campioni e reagenti vengono maneggiati.
19. Altri materiali di scarto generati dall'uso del kit (ad esempio: i puntali usati per controlli e campioni, micropiastre usate) dovrebbero essere maneggiate come potenzialmente infetti e riposti in accordo alle direttive nazionali e alle leggi concernenti lo smaltimento dei rifiuti di laboratorio.
20. Non pipettare con la bocca.

## **G. CAMPIONI: PREPARAZIONE E RACCOMANDAZIONI**

1. Il sangue è estratto asepticamente per prelievo in vena e i plasmi o sieri sono preparati usando le tecniche standard di preparazione dei campioni per analisi cliniche di laboratorio. Nessuna influenza è stata osservata nella preparazione del campione con citrato, EDTA o eparina.
2. Evitare ogni aggiunta di conservanti ai campioni; specialmente sodio azide che può influenzare l'attività enzimatica del coniugato, generando risultati di falsi negativi.
3. I campioni devono essere chiaramente identificati con codici o nomi per evitare confusione nell'interpretazione dei risultati. Quando il kit è usato per lo screening di unità di sangue è fortemente raccomandato di etichettare con codici a barre e leggere elettronicamente.
4. Campioni emolizzati (rossi) e visibilmente iperlipemici (lattiginosi) devono essere scartati perché potrebbero generare risultati falsi. I campioni contenenti residui di fibrina o grosse particelle o filamenti e corpi microbiologici dovrebbero essere scartati perché potrebbero dare origine a risultati falsi.
5. Sieri e plasmi possono essere conservati a +2...8°C fino a cinque giorni dopo il prelievo. Per conservazioni più lunghe, i campioni possono essere congelati a -20°C per diversi mesi. Qualsiasi campione congelato non può essere congelato e scongelato più di una volta perché questo genera particelle che possono influenzare il risultato del test.
6. Se sono presenti delle particelle centrifugare a 2.000 rpm per 20 minuti o filtrare con filtri a 0.2-0.8µm per pulire il campione da testare.

## **H. PREPARAZIONE DEI COMPONENTI E AVVERTENZE**

Studi condotti su un kit aperto non hanno mostrato alcuna rilevante perdita di attività fino a 1 riutilizzo dello stesso materiale in 6 mesi.

### **1. Micropiastre:**

Permettere che la micropiastre raggiunga la temperatura ambiente (almeno 1h) prima di aprire la busta. Controllare che l'essiccante non sia diventato verde scuro, indicando un difetto di conservazione. In questo caso chiamare il servizio clienti Adaltis.

Le strips non utilizzate devono essere riposte nell'apposita busta, in presenza del l'essiccante fornito, sigillate fermamente e conservate a 2...8°C. Dopo la prima apertura le strips residue sono stabili fino a quando l'indicatore di umidità presente all'interno della busta dell'essiccante vira da giallo a verde.

### **2. Controllo Negativo:**

Pronto all'uso. Miscelare su vortex prima dell'uso.

### **3. Controllo Positivo:**

Pronto all'uso. Miscelare su vortex prima dell'uso. Trattare questo componente come potenzialmente infetto.

#### 4. Calibratore:

Sciogliere attentamente il contenuto liofilo della fiala con il volume di acqua di grado EIA riportato sulla sua etichetta. Miscelare su vortex prima dell'uso.

Trattare questo componente come potenzialmente infetto.

**Nota:** Una volta sciolto il calibratore non è stabile. Conservare in aliquote a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 5. Soluzione di Lavaggio concentrata 20x:

(flacone da 50 mL):

L'intero contenuto della soluzione concentrata 20x deve essere diluita con acqua bidistillata fino a 1000 mL (il volume è riportato sull'etichetta) e miscelata gentilmente prima dell'uso. Dal momento che la soluzione può presentare formazioni cristalline, porre attenzione a dissolvere tutto il contenuto. Nella preparazione evitare di generare schiuma perché la presenza di bolle può diminuire l'efficacia del lavaggio.

**Nota:** Una volta diluita, la soluzione di lavaggio è stabile per 1 settimana a  $+2..8^{\circ}\text{C}$ .

#### 6. Coniugato:

Pronto all'uso. Miscelare su vortex prima dell'uso. Prestare attenzione per non contaminare il liquido con ossidanti chimici, polveri o microbi presenti nell'aria. Se questo componente deve essere trasferito usare solo contenitori di plastica possibilmente sterili.

#### 7. Substrato TMB:

Pronto all'uso. Miscelare su vortex prima dell'uso. Prestare attenzione per non contaminare il liquido con ossidanti chimici, polveri o microbi presenti nell'aria. Non esporre a forte illuminazione, agenti ossidanti e superfici metalliche. Se questo componente deve essere trasferito usare solo contenitori di plastica possibilmente sterili.

#### 8. Diluente del Saggio:

Pronto all'uso. Miscelare su vortex prima dell'uso.

#### 9. Soluzione Bloccante:

Pronto all'uso. Miscelare su vortex prima dell'uso.

#### 10. Diluente del Campione:

Pronto all'uso. Miscelare su vortex prima dell'uso.

### I. STRUMENTAZIONE USATA IN COMBINAZIONE CON IL KIT

1. Le micropipette devono essere calibrate per rilasciare il corretto volume richiesto dal saggio e devono essere sottoposte a regolare decontaminazione (alcool denaturato, candeggina al 10%, soluzione disinfettante ospedaliera) di quelle parti che potrebbero accidentalmente entrare in contatto con il campione. Esse dovrebbero essere tenute controllate per mostrare una precisione dell'1% e una correttezza di  $\pm 2\%$ . La decontaminazione di schizzi o residui di componenti del kit dovrebbe essere eseguita regolarmente.
2. L'incubatore ELISA dovrebbe essere tarato a  $37^{\circ}\text{C}$  (tolleranza di  $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ) e regolarmente controllato per assicurare il mantenimento della temperatura corretta. Entrambi incubatori a secco e bagni ad acqua sono utilizzabili per le incubazioni se gli

strumenti sono convalidati per l'incubazione di tests ELISA.

3. Il lavatore ELISA è estremamente importante per la totale riuscita del saggio. Il lavatore deve essere convalidato con attenzione e correttamente ottimizzato. Di solito sono sufficienti 4-5 cicli di lavaggio (aspirazione + dispensazione di 350  $\mu\text{L}$  di soluzione di lavaggio = 1 ciclo) per assicurare che il saggio dia il risultato atteso. E' suggerito un intervallo di soaking di 20-30 secondi tra i cicli. Per stabilire correttamente il loro numero, si raccomanda di eseguire un test di prova con i controlli del kit e campioni di riferimento ben caratterizzati come positivi o negativi, e controllare la corrispondenza ai valori riportati sotto nella sezione O "Controllo di qualità interno". La regolare calibrazione del volume erogato e la manutenzione del lavatore (decontaminazione e pulizia degli aghi) deve essere compiuta secondo le indicazioni del produttore.
4. I tempi di incubazione hanno una tolleranza di  $\pm 5\%$ .
  - ✓ Metodo di Incubazione Breve (per la 1<sup>a</sup>/2<sup>a</sup> incubazione la tolleranza è compresa tra 43 min. e 47 min.; per la 3<sup>a</sup> incubazione la tolleranza è compresa tra 14 e 16 min.)
  - ✓ Metodo di Incubazione Standard (per la 1<sup>a</sup> incubazione la tolleranza è compresa tra 57 min. e 63 min.; per la 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> incubazione la tolleranza è compresa tra 29 e 31 min.)
5. Il lettore di micropiastre ELISA deve essere dotato di un filtro di lettura di 450nm e idealmente di un secondo filtro (620-630nm) per le operazioni del bianco. Le sue prestazioni standard dovrebbero essere (a) ampiezza di banda  $\leq 10\text{nm}$ ; (b) intervallo di assorbimento da 0 a  $\geq 2.0$ ; (c) linearità  $\geq 2.0$ ; (d) ripetibilità  $\geq 1\%$ . Il bianco è determinato secondo le istruzioni contenute nella sezione "Procedura del Saggio". Il sistema ottico del lettore deve essere calibrato regolarmente per assicurare la corretta misurazione della densità ottica. La manutenzione dovrebbe essere fatta regolarmente secondo le istruzioni del produttore.
6. Quando si usa una stazione di lavoro automatizzata per kit ELISA, tutti i passi critici (dispensazione, incubazione, lavaggio, lettura, manipolazione dei dati) devono essere attentamente controllati, calibrati, e regolarmente sistemati per conservare la corrispondenza con i valori riportati nelle sezioni O "Controllo di qualità interno". Il protocollo del saggio deve essere installato nel sistema operativo dell'unità e convalidato come per il lavatore e il lettore. In più, la parte della stazione che manipola i componenti liquidi (dispensazione e lavaggio) deve essere convalidata e correttamente impostata. Particolare attenzione va mostrata nell'evitare il trascinarsi da parte degli aghi usati per la dispensazione e il lavaggio. Questo deve essere studiato e controllato per minimizzare la possibilità di contaminazione dalle celle adiacenti. L'uso di stazioni di lavoro automatizzate ELISA è raccomandata per lo screening di sangue quando il numero dei campioni da testare è maggiore di 20-30 per corsa della macchina.

## L. CONTROLLI E OPERAZIONI PRE SAGGIO

1. Controllare la data di scadenza del kit, stampata sull'etichetta esterna della scatola. Non usare il kit se è scaduto.
2. Controllare che i componenti liquidi non siano contaminati da particelle o aggregati visibili a occhio nudo. Controllare che il Substrato TMB sia incolore o blu pallido aspirando un piccolo volume dello stesso con una pipetta di plastica sterile trasparente. Controllare che nessuna rottura della confezione sia avvenuta nel trasporto e nessuna fuoriuscita di liquido sia presente all'interno della scatola. Controllare che la busta di alluminio, contenente la micropiastra, non sia bucata o danneggiata.
3. Diluire tutto il contenuto della Soluzione di Lavaggio concentrata 20x come descritto sopra.
4. Sciogliere il calibratore come descritto sopra.
5. Permettere a tutti i componenti del kit di raggiungere la temperatura ambiente (circa 1h) e poi miscelare come descritto.
6. Impostare l'incubatore ELISA a +37°C e preparare il lavatore ELISA avvinandolo con la soluzione di lavaggio diluita, secondo le istruzioni del produttore. Impostare il corretto numero di cicli di lavaggio come riportato nella sezione I.3.
7. Controllare che il lettore ELISA sia acceso da almeno 20 minuti prima della lettura.
8. Se si utilizza una stazione di lavoro automatizzata, accenderla, controllare le impostazioni e assicurarsi di usare il protocollo corretto.
9. Controllare che le micropipette siano impostate al volume richiesto.
10. Controllare che tutti gli strumenti siano disponibili e pronti all'uso.
11. In caso di problemi non procedere oltre con il test e informare il supervisore.

## M. PROCEDURA DEL SAGGIO

Il saggio deve essere eseguito in accordo a quanto riportato di seguito, prestando attenzione a mantenere la stessa incubazione per tutti i campioni da testare.

Il saggio può essere eseguito tramite due procedure di incubazione. Scegliere quella più idonea alla vostra regolamentazione:

1. Incubazione Standard (1<sup>a</sup> incubazione 60 minuti, 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> incubazione 30 minuti)
2. Incubazione Breve (1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> incubazione 45 minuti, 3<sup>a</sup> incubazione 15 minuti)

### 1. Incubazione Standard - Saggio Manuale:

1. Inserire il corretto numero di micropozzetti nell'apposito sostegno. Lasciare la prima cella vuota per le operazioni del bianco.
2. Dispensare 200 µL di Controllo Negativo in triplo, 200 µL di Calibratore in doppio e 200 µL di Controllo Positivo in singolo nelle celle appropriate. Non diluire Controlli e Calibratore in quanto già prediluiti e pronti all'uso!
3. Aggiungere 200 µL di Diluente Campioni a tutte le celle dei campioni; poi dispensare 10 µL di campione in ogni cella propriamente identificata. Agitare gentilmente la piastra, evitando straripamenti e contaminazioni delle celle adiacenti, per disciogliere completamente il campione nel suo diluente.

**Nota importante:** Controlla che il colore del Diluente del Campione, dopo l'aggiunta del campione, viri da verde chiaro a verde-blu scuro, indicando che il campione è stato aggiunto.

4. Dispensare 50 µL di Diluente del Saggio in tutte le celle dei controlli/calibratore e dei campioni. Controllare che il colore dei campioni viri a blu scuro.
5. Incubare la micropiastra per **60 min a +37°C**.  
Nota Importante: Le strips devono essere coperte con l'apposito foglio adesivo fornito, solo quando il test è eseguito manualmente. Non coprire la strips quando si usa uno strumento ELISA automatizzato.
6. Lavare la micropiastra con un lavatore automatico rilasciando e aspirando 350 µL/cella di soluzione di lavaggio diluita come riportato nella sezione I.3.
7. Pipettare 100 µL di Coniugato Enzimatico in tutte le celle tranne quella del bianco, e coprire con il foglio adesivo. Controllare che questo componente di colore rosso sia stato dispensato in tutta le celle, eccetto A1.

**Nota Importante:** Attenzione a non urtare la superficie della plastica interna della cella con il puntale pieno di Coniugato. Possono avvenire contaminazioni.

8. Incubare la micropiastra per **30 min a +37°C**.
9. Lavare le celle come riportato nella sezione I.3.
10. Pipettare 100 µL di miscela Substrato TMB in ogni cella e anche in quella del bianco. Incubare la micropiastra a **temperatura ambiente (18-24°C) per 30 minuti**.

**Nota Importante:** Non esporre a forte illuminazione diretta. Può determinare fondi alti.

11. Pipettare 100 µL di Soluzione Bloccante in ciascun pozzetto usando la stessa sequenza di pipettamento descritta nel punto 10 per fermare la reazione enzimatica. L'aggiunta di Soluzione Bloccante farà virare il controllo positivo e i campioni positivi da blu a giallo.
12. Misurare l'intensità di colore della soluzione in ogni cella, come descritto nella sezione 1.5, con un filtro di lettura a 450 nm e possibilmente con un filtro a 620-630nm per le operazioni del bianco in posizione A1 della micropiastra.

### Note importanti:

1. Se il secondo filtro non è disponibile assicurarsi che non siano presenti impronte digitali sul fondo della micropiastra prima della lettura a 450nm. Tali impronte potrebbero generare falsi positivi.
2. La lettura deve essere eseguita subito dopo l'aggiunta della Soluzione Bloccante e comunque mai più di 20 minuti dopo tale aggiunta. Può avvenire una leggera auto-ossidazione del substrato e portare ad un risultato di fondo alto.
3. L'agitazione a 350 ± 150 rpm durante l'incubazione ha dimostrato che la sensibilità del dosaggio aumenta circa del 20%.

## 2. Incubazione Breve - Saggio Manuale:

1. Inserire il corretto numero di micropozzetti nell'apposito sostegno. Lasciare la prima cella vuota per le operazioni del bianco.
2. Dispensare 200 µL di Controllo Negativo in triplo, 200 µL di Calibratore in doppio e 200 µL di Controllo Positivo in singolo nelle celle appropriate. Non diluire Controlli e Calibratore in quanto già prediluiti e pronti all'uso!
3. Aggiungere 200 µL di Diluente Campioni a tutte le celle dei campioni; poi dispensare 10 µL di campione in ogni cella propriamente identificata. Agitare gentilmente la piastra, evitando straripamenti e contaminazioni delle celle adiacenti, per disciogliere completamente il campione nel suo diluente.

**Nota importante:** Controlla che il colore del Diluente del Campione, dopo l'aggiunta del campione, viri da verde chiaro a verde-blu scuro, indicando che il campione è stato aggiunto.

4. Dispensare 50 µL di Diluente del Saggio in tutte le celle dei controlli/calibratore e dei campioni. Controlla che il colore dei campioni viri a blu scuro.
5. Incubare la micropiastra per **45 min a +37°C**.  
Nota Importante: Le strips devono essere coperte con l'apposito foglio adesivo fornito, solo quando il test è eseguito manualmente. Non coprire la strips quando si usa uno strumento ELISA automatizzato.
6. Lavare la micropiastra con un lavatore automatico rilasciando e aspirando 350 µL/cella di soluzione di lavaggio diluita come riportato nella sezione I.3.
7. Pipettare 100 µL di Coniugato Enzimatico in tutte le celle tranne quella del bianco, e coprire con il foglio adesivo. Controllare che questo componente di colore rosso sia stato dispensato in tutta le celle, eccetto A1.

**Nota importante:** Attenzione a non urtare la superficie della plastica interna della cella con il puntale pieno di coniugato. Possono avvenire contaminazioni.

8. Incubare la micropiastra per **45 min a +37°C**.
9. Lavare le celle come riportato nella sezione I.3.
10. Pipettare 100 µL di miscela Substrato TMB in ogni cella e anche in quella del bianco. Incubare la micro piastra a temperatura ambiente (18-24°C) per **15 minuti**.

**Important note:** Do not expose to strong direct illumination. High background might be generated.

11. Pipettare 100 µL di Soluzione Bloccante in ciascun pozzetto usando la stessa sequenza di pipettamento descritta nel punto 10 per fermare la reazione enzimatica. L'aggiunta di Soluzione Bloccante farà virare il controllo positivi e i campioni positivi da blu a giallo.
12. Misurare l'intensità di colore della soluzione in ogni cella, come descritto nella sezione 1.5, con un filtro di lettura a 450 nm e possibilmente con un filtro a 620-630nm per le operazioni del bianco in posizione A1 della micropiastra.

## Note importanti:

1. Se il secondo filtro non è disponibile assicurarsi che non siano presenti impronte digitali sul fondo della micropiastra prima della lettura a 450nm. Tali impronte potrebbero generare falsi positivi.
2. La lettura deve essere eseguita subito dopo l'aggiunta della Soluzione Bloccante e comunque mai più di 20 minuti dopo tale aggiunta. Può avvenire leggera auto-ossidazione del substrato e portare ad un risultato di fondo alto.
3. L'agitazione a 350 ± 150 rpm durante l'incubazione ha dimostrato che la sensibilità del dosaggio aumenta circa del 20%.

## N. SCHEMA DEL SAGGIO

Metodo	Operazioni (Incubazione Standard)	Operazioni (Incubazione Breve)
Controlli & Calibratore	200 µL	200 µL
Diluente Campioni e Campione	200 µL diluente+ 10 µL campione	200 µL diluente+ 10 µL campione
Diluente del Saggio	50 µL	50 µL
<b>1a incubazione</b>	<b>60 min (± 3)</b>	<b>45 min (± 2)</b>
Temperatura	+37°C	+37°C
Lavaggio	4-5 cicli	4-5 cicli
Coniugato Enzimatico	100 µL	100 µL
<b>2a incubazione</b>	<b>30 min (± 1)</b>	<b>45 min (± 2)</b>
Temperatura	+37°C	+37°C
Lavaggio	4-5 cicli	4-5 cicli
Substrato TMB	100 µL	100 µL
<b>3a incubazione</b>	<b>30 min (± 1)</b>	<b>15 min (± 1)</b>
Temperatura	Temperatura ambiente (18...24°C)	Temperatura ambiente (18...24°C)
Soluzione Bloccante	100 µL	100 µL
Letture OD	450/620nm	450/620nm

Un esempio di schema di dispensazione è riportato sotto (valido per entrambe le procedure di incubazione):

### Micropiastra

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	S2										
B	NC	S3										
C	NC	S4										
D	NC	S5										
E	CAL	S6										
F	CAL	S7										
G	PC	S8										
H	S1	S9										

Legenda: BLK = Bianco NC = Controllo Negativo  
CAL = Calibratore PC = Controllo Positivo S = Campione

## O. CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO

Un controllo di validazione è eseguito sui controlli e il calibratore ogni volta che il kit viene usato per verificare che le prestazioni del saggio siano conformi sia ai valori di OD450/620nm sia ai valori attesi e riportati nella seguente tabella:

Controllo	Requisiti
Bianco	< 0.100 OD 450/620nm valore
Controllo Negativo (NC)	< 0.050 valore medio OD450/620nm dopo sottrazione del bianco
Calibratore	S/Co >1.1
Controllo Positivo	>1.000 OD450/620nm valore

Se i risultati del test corrispondono ai requisiti stabiliti sopra, procedere alla prossima sezione.

Se non corrispondono, non procedere ulteriormente e eseguire i seguenti controlli:

Problemi	Controllo
<b>Bianco</b> > 0.100 OD450nm	1. che la soluzione Substrato non si sia contaminata durante il saggio
<b>Controllo Negativo (NC)</b> > 0.050 OD450nm dopo sottrazione del bianco	1. che la procedura di lavaggio e le impostazioni del lavatore siano validate secondo gli studi di pre-qualificazione; 2. che sia stata usata la corretta soluzione di lavaggio e che il lavatore sia stato avvinato prima dell'uso; 3. che nessun errore sia stato commesso nella procedura del saggio (dispensazione del controllo positivo invece del negativo); 4. che non sia avvenuta nessuna contaminazione del controllo negativo o delle sue celle a causa di schizzi dei campioni positivi o del coniugato enzimatico; 5. che le micropipette non siano contaminate con campioni positivi o coniugato enzimatico; 6. che gli aghi del lavatore non siano bloccati o parzialmente ostruiti.
<b>Calibratore</b> S/Co < 1.1	1. che le procedure siano state correttamente eseguite; 2. che nessun errore sia avvenuto durante la sua distribuzione (es. dispensazione del controllo negativo al posto del calibratore); 3. che la procedura di lavaggio e le impostazioni del lavatore siano validate secondo gli studi di pre-qualificazione; 4. che non sia avvenuta nessuna contaminazione esterna del calibratore.
<b>Controllo Positivo</b> <1.000 OD450nm	1. che le procedure siano state eseguite correttamente; 2. che nessun errore sia stato commesso nella distribuzione del controllo (dispensazione del controllo negativo al posto del positivo). In questo caso il controllo negativo mostrerà un OD450nm > 0.150 3. che la procedura di lavaggio e le impostazioni del lavatore siano validate secondo gli studi di pre-qualificazione; 4. che non sia avvenuta nessuna contaminazione esterna del controllo positivo

Se si è verificato qualcuno dei problemi riportati sopra, informare il supervisore per ulteriori azioni.

## P. RISULTATI

I risultati del test sono calcolati sulla media di un valore di cut-off determinato con la seguente formula:

$$\text{Cut-Off (Co)} = \text{NC medio} + 0.350$$

Il valore trovato per il test è usato per l'interpretazione dei risultati come descritto nel paragrafo successivo.

## Q. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

I risultati del test sono interpretati come il rapporto tra l'OD450nm del campione e il valore del Cut-Off (o S/Co) in accordo con la seguente tabella:

S/Co	Interpretazione
< 0.9	Negativo
0.9 - 1.1	Equivoco
> 1.1	Positivo

Un risultato negativo indica che il paziente non è stato infettato da HCV o che l'unità di sangue può essere trasfusa.

Quei pazienti che mostrano un risultato equivoco dovrebbero essere testati nuovamente su un campione prelevato 1-2 settimane dopo. L'unità di sangue non dovrebbe essere trasfusa.

Un risultato positivo indica la presenza dell'infezione da HCV, quindi il paziente dovrebbe essere trattato di conseguenza e l'unità di sangue dovrebbe essere scartata.

### Note importanti:

1. *L'interpretazione dei risultati dovrebbe essere fatta sotto la supervisione del responsabile del laboratorio per ridurre il rischio di errori di giudizio.*
2. *Ogni risultato positivo dovrebbe essere confermato da un metodo alternativo in grado di rilevare gli anticorpi IgG e IgM (test di conferma) prima di formulare una diagnosi di epatite virale.*
3. *Come dimostrato nella valutazione delle prestazioni del prodotto, l'analisi è in grado di rilevare la sierconversione per anticorpi anti-HCV core prima di alcuni altri kit commerciali. Quindi un risultato positivo, non confermato, con questi kit commerciali, non deve essere escluso, come un risultato falso positivo! Il campione deve essere comunque sottoposto ad un test di conferma.*
4. *Dal momento che il saggio è in grado di determinare anche anticorpi di classe IgM, potrebbero essere rilevate discrepanze con altri prodotti commerciali per la determinazione di anticorpi anti HCV mancanti di coniugato anti IgM. La reale positività del campione per gli anticorpi HCV dovrebbe essere poi confermata esaminando anche la reattività IgM, importante per la diagnosi dell'infezione HCV.*
5. *Quando i risultati sono trasmessi dal laboratorio ad un centro informatico, prestare attenzione per non trasferire dati errati.*
6. *La diagnosi di epatite virale deve essere fatta e riferita al paziente solo da personale medico qualificato.*

Un esempio di calcolo è riportato di seguito:  
*I seguenti dati non devono essere usati al posto dei dati reali ottenuti dall'utilizzatore.*  
 Controllo Negativo: 0.019 – 0.020 – 0.021 OD450nm  
 Valore Medio: 0.020 OD450nm Minore di 0.050 – Accettato

Controllo Positivo: 2.189 OD450nm  
 Più alto di 1.000 – Accettato

Cut-Off = 0.020+0.350 = 0.370  
 Calibratorer: 0.550 - 0.530 OD450nm  
 Valore Medio: 0.540 OD450nm S/Co = 1.4  
 S/Co più alto di 1.1 – Accettato

Campione 1: 0.070 OD450nm  
 Campione 2: 1.690 OD450nm  
 Campione 1 S/Co < 0.9 = negativo  
 Campione 2 S/Co > 1.1 = positivo

## R. PRESTAZIONI

La Valutazione delle Prestazioni è stata condotta in accordo a quanto riportato in Common Technical Specifications o CTS (art. 5, Capitolo 3 di IVD Direttiva 98/79/EC) e ad entrambe le procedure di incubazione (standard e breve).

### 1. LIMITE DI RILEVAZIONE

Il limite di rilevazione del saggio è stato calcolato usando la procedura di incubazione breve per mezzo del British Working Standard per anti-HCV, NIBSC codice 06/188-006. La seguente tabella riporta i valori medi di OD450nm di questo standard diluito in plasma negativo e poi esaminato.

Diluizione	Lot#1	Lot#2	Lot#3
Fattore	S/Co	S/Co	S/Co
1 X	3,50	4,00	4,30
2 X	2,10	2,60	2,60
4 X	1,3	1,40	1,30
Plasma Negativo	0,25	0,20	0,20

Inoltre il campione codificato Accurun 1 - series 3000 – fornito da Boston Biomedica Inc., USA, è stato valutato "in toto" mostrando i seguenti risultati:

Accurun 1 series	Lot#1	Lot#2	Lot#3
Fattore	S/Co	S/Co	S/Co
1 X	2,90	3,04	3,40

### 2. SPECIFICITA' E SENSIBILITA' DIAGNOSTICHE

La Valutazione delle Prestazioni del dispositivo è stata condotta in un trial esterno condotto su più di 5000 campioni.

#### 2.1 Specificità Diagnostica

E' definita come la probabilità del saggio di segnare negativo in assenza di un analita specifico. Sono stati esaminati un totale di più di 5000 donatori a caso, inclusi donatori per la prima volta. La specificità diagnostica era accertata contro un kit approvato US FDA.

5043 donatori sono stati testati fornendo una specificità del 99.5%.

210 pazienti ospedalizzati sono stati testati per HCV; è stata trovata una specificità diagnostica del 99.5%. Inoltre, la specificità diagnostica era accertata testando 162 campioni potenzialmente interferenti (altre malattie infettive, anticorpi positivi E.coli, pazienti affetti da malattie epatiche non virali, pazienti in dialisi, donne incinta, emolizzati, lipemici, etc.). E' stato accertato un valore di specificità del 100%.

Non è stata osservata nessuna falsa reattività dovuta al metodo di preparazione dei campioni. Sia plasmici, derivati con differenti tecniche standard di preparazione (citrato, EDTA e eparina), e sieri sono stati usati per determinare i valori di specificità. Sono stati testati campioni congelati, per verificare interferenze dovute alla raccolta e conservazione. Nessuna interferenza è stata osservata.

#### 2.2 Sensibilità Diagnostica

E' definita come la probabilità del saggio di segnare positivo in assenza di un analita specifico. La sensibilità diagnostica è stata accertata esternamente su un numero totale di 348 campioni; una sensibilità diagnostica del 100% è stata trovata. Internamente sono stati testati più di 50 campioni positivi, fornendo ancora un valore di sensibilità diagnostica del 100%.

Sono stati testati campioni positivi da infezioni provocate da genotipi differenti di HCV.

Inoltre è stata studiata la maggior parte dei pannelli di sieroconversione forniti da Boston Biomedica Inc., USA, (PHV) e Zeptomatrix, USA, (HCV).

I risultati per alcuni di loro sono riportati di seguito.

Pannello	N° campioni	Adaltis <sup>1</sup>	Ortho <sup>1, 2</sup>
PHV 901	11	9	9
PHV 904	7	2	4
PHV 905	9	3	4
PHV 906	7	7	7
PHV 907	7	3	2
PHV 908	13	10	8
PHV 909	3	2	2
PHV 910	5	3	3
PHV 911	5	3	3
PHV 912	3	1	1
PHV 913	4	2	2
PHV 914	9	5	5
PHV 915	4	3	0
PHV 916	8	4	3
PHV 917	10	6	6
PHV 918	8	2	0
PHV 919	7	3	3
PHV 920	10	6	6
HCV 10039	5	2	0
HCV 6212	9	6	7
HCV 10165	9	5	4

Nota:

1. Campioni Positivi
2. HCV v.3.0

Infine il prodotto è stato testato sul pannello EFS Ac HCV, lot n° 06.140817, fornito dall'Etablissement Francais Du Sang (EFS), Francia, con i seguenti risultati:

**Pannello EFS Ac HCV**

Campione	Lot#1 S/Co	Lot#2 S/Co	Lot#3 S/Co	Risultati aspettati
HCV 1	0,53	0,52	0,55	<b>Negativo</b>
HCV 2	3,28	5,91	3,04	<b>Positivo</b>
HCV 3	2,17	3,18	2,56	<b>Positivo</b>
HCV 4	2,26	2,23	2,35	<b>Positivo</b>
HCV 5	6,10	7,06	6,90	<b>Positivo</b>
HCV 6	1,66	1,77	1,67	<b>Positivo</b>

**3. PRECISIONE**

E' stata calcolata su cinque campioni, uno negativo e quattro positivi, esaminati in 4 ripetizioni in sei run separate.

I risultati sono riportati di seguito:

Risultati intra-lotto: EIAgen HCV Ab (v.4) Kit - 1° Lotto (procedura incubazione breve)

Precisione - %CV				
Campione	S/Co Media	Inter Saggio	Intra Saggio	Totale
Negativo	0.03	6.66	10.56	12.48
Positivi	1.20	8.52	8.49	12.03
	1.51	7.69	12.22	14.44
	3.57	7.43	11.82	13.97
	11.87	3.42	9.32	9.92

Risultati intra-lotto: EIAgen HCV Ab (v.4) Kit - 1° Lotto (procedura incubazione lunga)

Precisione - %CV				
Campione	S/Co Media	Inter Saggio	Intra- Saggio	Totale
Negativo	0.04	4.67	12.34	13.19
Positivi	1.47	9.62	11.40	14.92
	1.82	8.92	12.77	15.58
	4.31	4.59	12.88	13.67
	13.78	2.42	8.96	9.26

Risultati inter-lotto: EIAgen HCV Ab (v.4) Kit - 1°, 2° e 3° Lotto (procedura incubazione breve)

Precisione - %CV			
Campione	Lotto 1	Lotto 2	Lotto 3
Negativo	8,65	8,29	6,13
Calibratore	4,98	4,44	5,38
Positivo	4,11	3,11	1,37

La variabilità mostrata nelle tabelle non è risultata nella misclassificazione dei campioni.

**S. SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI**

L'aderenza alla procedura e alle specifiche, così come il corretto uso dei reagenti e l'opportuna dispensazione, possono evitare i seguenti tipi di errore:

ERRORE	POSSIBILI CAUSE / SUGGERIMENTI
OD molto diverse (± 50%) da quelle riportate nel QC	-errato volume di dispensazione dei reagenti (suggerimento: controllare la corrispondenza fra il volume impostato nelle pipette e quello richiesto dal saggio, tararle nuovamente) -errata temperatura o errato tempo di incubazione (suggerimento: manutenzione più scrupolosa dell'incubatore, annotare l'inizio dell'incubazione) -errore nell'esecuzione dei lavaggi e della lettura fotometrica (suggerimento: controllare il funzionamento o le impostazioni dei rispettivi strumenti) -contaminazione del Substrato o del Coniugato (suggerimento: usare solo contenitori di plastica monouso puliti)
Risultati poco riproducibili	-volume di dispensazione dei reagenti e dei campioni non costante (suggerimento: controllare la precisione delle pipette e la corrispondenza tra il volume dispensato e quello richiesto dal saggio; tararle nuovamente) -errore nell'esecuzione dei lavaggi o della lettura (suggerimento: controllare il funzionamento o le impostazioni dei rispettivi strumenti) -contaminazione del Substrato (suggerimento: usare solo contenitori di plastica monouso puliti) -inquinamento o degradazione dei reagenti (suggerimento: utilizzare puntali appropriati, contenitori di plastica monouso puliti e acqua distillata o equivalente)
Nessuna reazione colorimetrica dopo l'aggiunta del Substrato	-alcuni reagenti non sono stati dispensati -forte contaminazione del Coniugato o del Substrato -errata esecuzione della procedura del saggio (es. dispensazione accidentale dei reagenti in una sequenza sbagliata o dal contenitore sbagliato, ecc.)
Reazione troppo blanda (OD troppo basse)	-tempo di incubazione troppo breve, temperatura di incubazione troppo bassa -errata diluizione del coniugato
Reazione troppo intensa (OD troppo alte)	-errata diluizione del coniugato -tempo di incubazione troppo lungo, temperature di incubazione troppo alta -qualità scadente dell'acqua usata per la soluzione di lavaggio (basso grado di deionizzazione) -lavaggio non sufficiente (coniugati non propriamente rimossi)
Inspiegabili risultati	-contaminazione delle pipette, dei puntali o dei contenitori -lavaggio incostante e insufficiente (coniugati non propriamente rimossi)
CV% intersaggio elevato	-reagenti e/o non portate a temperature ambiente prima dell'uso - il lavatore per micropiastre non lava correttamente (suggerimento: pulire la testa del lavatore)
CV% intrasaggio elevato	-condizioni di incubazione non costanti (tempo, temperatura) -controlli e campioni non dispensati allo stesso tempo (con stessi intervalli) (controllare la sequenza di dispensazione) -variabilità intrinseca degli operatori

## **T. AUTOMAZIONE**

La procedura descritta in questa istruzione per l'uso è solo per il test in manuale. Quando si utilizzano degli analizzatori automatici, bisogna seguire le istruzioni che sono descritte nei manuali d'uso del dispositivo stesso. Ogni laboratorio deve seguire i propri processi di validazione interna dimostrando la compatibilità con i sistemi automatici.

## **U. LIMITAZIONI**

Ripetibili risultati falsi positivi, non confermati dal RIBA di conferma o tecniche simili, sono stati valutati come inferiori allo 0,1% della popolazione normale.

I campioni congelati contenenti particelle di fibrina o aggregati dopo scongelamento hanno mostrato di generare falsi positivi.



## BIBLIOGRAFIA

1. CDC. Public Health Service inter-agency guidelines for screening donors of blood, plasma, organs, tissues, and semen for evidence of hepatitis B and hepatitis C. *MMWR* 1991;40(No. RR-4):1-17.
2. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C. *Hepatology* 1997;26:62S-5S.
3. McQuillan GM, Alter MJ, Moyer LA, Lambert SB, Margolis HS. A population based serologic study of hepatitis C virus infection in the United States. In Rizzetto M, Purcell RH, Gerin JL, Verme G, eds. *Viral Hepatitis and Liver Disease*, Edizioni Minerva Medica, Turin, 1997, 267-70.
4. Dufour MC. Chronic liver disease and cirrhosis. In Everhart JE, ed. *Digestive diseases in the United States: epidemiology and impact*. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. Washington, DC: US Government Printing Office, 1994; NIH publication no. 94-1447, 615-45.
5. Alter MJ, Hadler SC, Judson FN, et al. Risk factors for acute non-A, non-B hepatitis in the United States and association with hepatitis C virus infection. *JAMA* 1990;264:2231-35.
6. Alter HJ, Holland PV, Purcell RH, et al. Posttransfusion hepatitis after exclusion of commercial and hepatitis-B antigen-positive donors. *Ann Intern Med* 1972;77:691-9.
7. Alter HJ, Purcell RH, Holland PV, Feinstone SM, Morrow AG, Moritsugu Y. Clinical and serological analysis of transfusion-associated hepatitis. *Lancet* 1975;2:838-41.
8. Seeff LB, Wright EC, Zimmerman HJ, McCollum RW, VA Cooperative Studies Group. VA cooperative study of post-transfusion hepatitis and responsible risk factors. *Am J Med Sci* 1975;270:355-62.
9. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med* 1975;292:767-70.
10. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989;244:359-62.
11. Kuo G, Choo QL, Alter HJ, et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 1989;244:362-4.
12. Alter HJ, Purcell RH, Shih JW, et al. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 1989;321:1494-1500.
13. Aach RD, Stevens CE, Hollinger FB, et al. Hepatitis C virus infection in post-transfusion hepatitis. An analysis with first- and second-generation assays. *N Engl J Med* 1991;325:1325-9.
14. Alter MJ, Margolis HS, Krawczynski K, Judson FN, Mares A, Alexander WJ, et al. The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. *N Engl J Med* 1992;327:1899-1905.
15. Alter, MJ. Epidemiology of hepatitis C in the west. *Semin Liver Dis* 1995;15:5-14.
16. Donahue JG, Nelson KE, Muñoz A, et al. Antibody to hepatitis C virus among cardiac surgery patients, homosexual men, and intravenous drug users in Baltimore, Maryland. *Am J Epidemiol* 1991;134:1206-11.
17. Zeldis JB, Jain S, Kuramoto IK, et al. Seroepidemiology of viral infections among intravenous drug users in northern California. *West J Med* 1992;156:30-5.
18. Fingerhoo MI, Jasinski DR, Sullivan JT. Prevalence of hepatitis C in a chemically dependent population. *Arch Intern Med* 1993;153:2025-30.
19. Garfein RS, Vlahov D, Galai N, Doherty, MC, Nelson, KE. Viral infections in short-term injection drug users: the prevalence of the hepatitis C, hepatitis B, human immunodeficiency, and human Tlymphotropic viruses. *Am J Pub Health* 1996;86:655-61.
20. Brettler DB, Alter HJ, Deinstag JL, Forsberg AD, Levine PH. Prevalence of hepatitis C virus antibody in a cohort of hemophilia patients. *Blood* 1990;76:254-6.
21. Troisi CL, Hollinger FB, Hoots WK, et al. A multicenter study of viral hepatitis in a United States hemophilic population. *Blood* 1993;81:412-8.
22. Kumar A, Kulkarni R, Murray DL, et al. Serologic markers of viral hepatitis A, B, C, and D in patients with hemophilia. *J Med Virology* 1993;41:205-9.
23. Tokars JI, Miller ER, Alter MJ, Arduino MJ. National surveillance of dialysis associated diseases in the United States, 1995. *ASAIO Journal* 1998;44:98-107.
24. Osmond DH, Charlebois E, Sheppard HW, et al. Comparison of risk factors for hepatitis C and hepatitis B virus infection in homosexual men. *J Infect Dis* 1993;167:66-71.
25. Weinstock HS, Bolan G, Reingold AL, Polish LB: Hepatitis C virus infection among patients attending a clinic for sexually transmitted diseases. *JAMA* 1993;269:392-4.
26. Thomas DL, Cannon RO, Shapiro CN, Hook EW III, Alter MJ. Hepatitis C, hepatitis B, and human immunodeficiency virus infections among non-intravenous drug-using patients attending clinics for sexually transmitted diseases. *J Infect Dis* 1994;169:990-5.
27. Buchbinder SP, Katz MH, Hessel NA, Liu J, O'Malley PM, Alter, MJ. Hepatitis C virus infection in sexually active homosexual men. *J Infect* 1994;29:263-9.
28. Thomas DL, Zenilman JM, Alter HJ, et al. Sexual transmission of hepatitis C virus among patients attending sexually transmitted diseases clinics in Baltimore--an analysis of 309 sex partnerships. *J Infect Dis* 1995;171:768-75.
29. Thomas DL, Factor SH, Kelen GD, Washington AS, Taylor E Jr, Quinn TC. Viral hepatitis in health care personnel at The Johns Hopkins Hospital. *Arch Intern Med* 1993;153:1705-12.
30. Cooper BW, Krusell A, Tilton RC, Goodwin R, Levitz RE. Seroprevalence of antibodies to hepatitis C virus in high-risk hospital personnel. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1992;13:82-5.
31. Abdel-Hamid, M., M. El-Day, S. El-Kafrawy, N. Mikhail, G.T. Strickland, and A.D. Fix. 2002. Comparison of second- and third-generation enzyme immunoassays for detecting antibodies to hepatitis C virus. *J. Clin. Microbiol.* 40:1656-1659.
32. Dusheiko, G., H. Schlimovitz-Weiss, D. Brown, F. McOmish, P.-L. Yap, S. Sherlock, N. McIntyre, and P. Simmonds. 1994. Hepatitis C virus genotypes: an investigation of type-specific differences in geographic origin and disease. *Hepatology* 19:13-18.
33. Gretch, D. Diagnostic tests for hepatitis C. The article can be found at: <http://www.hepnet.com/nih/gretch.html>. It was written as part of a National Institute of Health Conference on Hepatitis C, held from March 24-26, 1997 in Bethesda Maryland
34. Mondelli, M.U., A. Cerino, F. Bono, A. Cividini, A. Maccabruni, M. Aricò, A. Malfitano, G. Barbarini, V. Piazza, L. Minoli, and E. Silini. 1994. Hepatitis C virus (HCV) core serotype in chronic HCV infection. *J. Clin. Microbiol.* 32:2523-2527.
35. Ohno, T., M. Mizokami, R.-R. Wu, M.G. Saleh, K.-I. Ohba, E. Orito, M. Mukaide, R. Williams, and J.Y.N. Lau. 1997. New hepatitis C virus (HCV) genotyping system that allows for the identification of HCV genotype 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4, 5a, and 6a. *J. Clin. Microbiol.* 35:201-207.
36. Takada, N., S. Takase, N. Enomoto, A. Takada, and T. Date. 1992. Clinical backgrounds of the patients having different types of hepatitis C virus genome. *J. Hepatol.* 14:35-40.
37. Yoshioka, K., S. Kakumu, T. Wakita, T. Ishikawa, Y. Itoh, M. Takayanagi, Y. Higashi, M. Shibata, and T. Morishima. 1992. Detection of hepatitis C virus by polymerase chain reaction and response to interferon- $\alpha$  therapy: relationships to genotypes of hepatitis C virus. *Hepatology* 16:293-299.