




EIAgen

Detect HIV 4 Total Screening Kit

REF 081311  96

REF 081312  192

REF 081315  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 insert.



Manufacturer:
Adaltis S.r.l
Via Durini, 27
20122 Milano (Italy)
Tel. +39-0774-5791 - Fax +39-0774-353085
www.adaltis.net

en

SYMBOLS USED ON LABELS

English EN							
	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	Biological Risk	Date of Manufacture	Microplate	Sample Diluent	Negative Control
	Positive Control HIV-1		Positive Control HIV-2		Positive Control HIV p-24		Conjugate # 1
	Conjugate # 2 Concentrate 100x	Conjugate # 2 Diluent	Substrate TMB	Stop Solution	Wash Buffer Concentrate 25x		

A. INTENDED USE

The EIAGEN Detect HIV 4 Total Screening Kit is a 4th generation solid phase Enzyme-Linked Immunosorbent assay using a mixture of antigens and antibodies for the *in vitro* diagnostic screening in human serum or plasma (EDTA, Heparin and Citrate) of antibodies to HIV-1, HIV-2 and HIV-1 p24 antigen.

This kit is a combined Ag/Ab assay and is not to be used for the detection of HIV-1 p24 antigen alone. This kit is for *in vitro* diagnostic use by a health-care professional and will not be sold to the general public.

B. INTRODUCTION

Acquired immune deficiency syndrome (AIDS) is a set of symptoms resulting from the incapacitation of the human immune system caused by the Human Immunodeficiency Virus (HIV). HIV infection may progress to a symptomatic phase that is characterized by opportunistic infections and that may cause death.

The etiological agent of AIDS, HIV, targets specific types of T cells causing Lymphopenia and affecting T cell mediated immunity. HIV is a member of a retrovirus family with two sub-families: HIV-1 and HIV-2. HIV-1 is more virulent and transmittable than HIV-2. HIV-1 is the cause of HIV infections globally, whereas HIV-2 is found predominantly in the countries of West Africa. As serological cross-reaction between HIV-1 and HIV-2 is highly variable and dependent on the tested sample, antigens for the specific detection of both HIV-1 and HIV-2 are included in the assay.

HIV is transmitted through sexual contact with infected persons, sharing needles and syringes with infected people and transfusion of contaminated blood. Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (such as the EIAGEN Detect HIV 4 Total Screening ELISA 4th gen) are recommended for screening human blood and plasma for the presence of anti-HIV antibodies and HIV-1 p24 antigen. The presence of anti-HIV-1 and/or anti-HIV-2 in the blood indicates potential infection with HIV-1 and/or HIV-2 and consequently this blood should not be used for transfusion or for manufacture of injectable products.

C. PRINCIPLE OF THE TEST

Antigens representing epitopes of HIV-1 gp41 and HIV-2 gp36 are coated onto microplate wells together with monoclonal antibodies against HIV-1 p24. Serum or plasma sample is added to the well and if antibodies specific for HIV-1 and/or HIV-2 (IgG, IgM or IgA) are present in the sample, stable complexes will be formed with the HIV antigens attached to the well. HIV-1 p24 antigen, if present will bind simultaneously to the antibodies in the well and to the detector antibodies present in the Sample Diluent. Non-reactive antibodies are removed by washing. Stable antigen-antibody complexes are identified through the successive addition of biotinylated antigens and horseradish peroxidase (HRP) conjugated streptavidin. These antibody-antigen complexes are quantified through the catalytic activity of horseradish peroxidase. Peroxidase substrate solution is added and is converted to a blue-coloured product. A positive sample generates a dark blue colour while faint blue colour or colourless wells indicate a negative sample. Upon adding stopping solution, the colour of the

solution will change from blue to yellow. Optical Density (OD) is measured with a spectrophotometer (ELISA reader) at 450nm with reference wavelength at 600-650nm and is in proportion to the amount of anti-HIV1/2-antibodies and HIV-1 p24 present in the sample.

D. COMPONENTS

The kit contains reagents for 96 tests (code 081311), or 192 tests (code 081312) or 480 tests (code 081315).

Microplate	1
Negative Control	1x2 mL/vial
Positive Control HIV-1	1x2 mL/vial
Positive Control HIV-2	1x2 mL/vial
Positive Control HIV p-24	1x2 mL/vial
Conjugate # 1	1x25 mL/vial
Conjugate # 2 Concentrate 100x	1x0.25 mL/vial
Conjugate # 2 Diluent	1x25 mL/vial
Sample Diluent	1x12.5 mL/vial
Substrate TMB	1x40 mL/vial
Stop Solution	1x15 mL/vial
Wash Buffer Concentrate 25x	1x50 mL/vial
Plate sealing foils	2
Number of tests	96
Code	081311

Microplate	2
Negative Control	1x2 mL/vial
Positive Control HIV-1	1x2 mL/vial
Positive Control HIV-2	1x2 mL/vial
Positive Control HIV p-24	1x2 mL/vial
Conjugate # 1	2x25 mL/vial
Conjugate # 2 Concentrate 100x	2x0.25 mL/vial
Conjugate # 2 Diluent	2x25 mL/vial
Sample Diluent	2x12.5 mL/vial
Substrate TMB	2x40 mL/vial
Stop Solution	1x40 mL/vial
Wash Buffer Concentrate 25x	2x50 mL/vial
Plate sealing foils	4
Number of tests	192
Code	081312

Microplate	5
Negative Control	1x4 mL/vial
Positive Control HIV-1	1x4 mL/vial
Positive Control HIV-2	1x4 mL/vial
Positive Control HIV p-24	1x4 mL/vial
Conjugate # 1	5x25 mL/vial
Conjugate # 2 Concentrate 100x	5x0.25 mL/vial
Conjugate # 2 Diluent	5x25 mL/vial
Sample Diluent	5x12.5 mL/vial
Substrate TMB	3x40 mL/vial
Stop Solution	2x40 mL/vial
Wash Buffer Concentrate 25x	5x50 mL/vial
Plate sealing foils	10
Number of tests	480
Code	081315

1. Microplate:

12 strips of 8 breakable wells coated with HIV specific gp36 and gp41 peptides and gp41 protein with Monoclonal Antibodies specific to the HIV-1 p24 Ag. Plates are sealed into an 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 human serum negative for HIV antibodies and for p24 antigen, and 0.05% Proclin 300 as preservative.

3. Positive Control HIV-1

Ready to use control. It contains human serum positive to Anti-HIV 1 and 0.05% Proclin 300 as preservative.

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

4. Positive Control HIV-2

Ready to use control. It contains human serum positive to Anti-HIV 2 and 0.05% Proclin 300 as preservative.

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

5. Positive Control HIV p-24

Ready to use control. It contains recombinant HIV-1 p24 and 0.05% Proclin 300 as preservative.

6. Conjugate # 1

Ready to use and blue colour coded reagent. It contains a mixture biotinylated antigens in phosphate buffer and 0.05% Proclin 300 as preservative.

7. Conjugate # 2 Concentrate 100x

100x solution concentrate. It contains Horseradish Peroxidase conjugated with streptavidin in specific stabilizer buffer with preservative.

Reagent to be diluted with the Conjugate # 2 Diluent.

Important Note: *Any unused portion of this diluted Conjugate # 2 Solution may be stored at +2...8°C for no more than 6 days.*

8. Conjugate # 2 Diluent

Ready to use and orange colour coded reagent.

Reagent is used for the dilution of the Conjugate # 2 Concentrate 100x. It contains phosphate buffer and 0.05% Proclin 300 as preservative.

9. Sample Diluent

Ready to use and red colour coded reagent.

It contains active components and 1.0% v/v aggregated mouse serum proteins, 0.1% w/v aggregated human IgG and 0.05% Proclin 300 as preservative.

10. Substrate TMB

Ready-to-use component. It contains 0.26 mg/mL of 3,3',5,5' Tetramethylbenzidin (TMB) and 0.01% w/v of Hydrogen peroxide (H₂O₂), in citrate buffer.

Mix gently before use.

Note:

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

11. Stop Solution

Ready-to-use component.

It contains 0,3 M H₂SO₄ solution.

Mix gently before use.

The MSDS is available upon request of laboratory personnel.

12. Wash Buffer Concentrate 25x

25x concentrated solution.

It contains 0.2% Proclin 300 as preservative. Once diluted, the wash solution (wash buffer diluted) contains phosphate buffer saline and Proclin 300 and Tween 20 as preservatives.

Once diluted, the wash solution is stable for 6 days at +2...8°C.

E. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

1. Calibrated Micropipettes of 200 µL, 50 µL and 10 µL and disposable plastic tips.
2. EIA grade water (double distilled 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 (dry or wet) set at +37°C (± 0.5°C tolerance).
6. Calibrated ELISA microwell reader with 450nm (reading) and if possible with 600-650nm (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. The kit 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 (TMB & H₂O₂) 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 external (carton box/secondary 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 washing solution or in transferring components into other containers of automated workstations, in order to avoid 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. 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 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. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas in which specimens or kit reagents are handled
18. 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.
19. Do not pipette by mouth.

G. SPECIMEN: PREPARATION AND RECOMMENDATIONS

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 labelling and 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.
7. Do not use heat inactivated samples as they could give origin to false reactivity.
8. Storage of diluted samples is not recommended and can adversely affect test performance.
9. Mix the samples before the use.

H. PREPARATION OF COMPONENTS AND WARNINGS

A study conducted on an opened kit has not pointed out any relevant loss of activity up to 2 months.

Allow the kit reagents to reach room temperature (+18...24°C) at least 30 minutes before use.

Take only the volume necessary for the testing. Return the unused portion at +2...8°C.

1. Microplate

Allow the microplate to reach room temperature (about 1 hr) before opening the container.

Unused strips have to be placed back into the aluminum pouch firmly zipped and stored at +2...8°C.

When opened the first time, residual strips are stable up to two months or 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 Controls

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

4. Conjugate # 1

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.

5. Conjugate # 2 Concentrate 100x

The 100x concentrate reagent has to be diluted in Conjugate Diluent # 2.

Example: Add 250 µL of concentrated Conjugate # 2 to 24,75 mL of Conjugate # 2 Diluent.

Once diluted mix well end-over-end before use.

Once diluted, 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.

6. Conjugate # 2 Diluent

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Reagent is used for the dilution of the Conjugate # 2

7. Sample Diluent

Ready to use reagent. Mix well on vortex before use.

8. Substrate TMB

Ready-to-use component.

Mix well on vortex before use.

Be careful not to contaminate 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, possible sterile disposable container.

9. Stop Solution

Ready to use. Mix well on vortex before use.

10. Wash Buffer Concentrate 25x

The 25x concentrated solution has to be diluted with EIA grade water and mixed gently end-over-end before use.

Example: Add 50 mL of 25x wash solution to 1200 mL of deionised water.

As some salt crystals may be present into the vial, take care to dissolve all the content during the preparation of the solution.

In the preparation avoid foaming as the presence of bubbles could give origin to a bad washing efficiency.

Once diluted, the wash solution is stable for 6 days at +2...8°C.

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. They should also be regularly maintained. Decontamination of spills or residues of kit components should also be carried out regularly. They should also be regularly maintained in order to show a precision of 1% and a trueness of $\pm 2\%$.
2. The ELISA incubator has to be set at +37°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 using the kit controls and reference panels, before using the kit for routine laboratory tests.

5-3-5 washing cycles (aspiration + dispensation of 400 µL/well of washing solution = 1 cycle) are sufficient to ensure that the assay performs as expected. In order to set correctly their number, it is recommended to run an assay with the kit controls

and well characterized negative and positive reference samples, and check to match the values reported below in the section "Internal Quality control". Regular calibration of the volumes delivered by, 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 $\pm 5\%$ (or for 1st incubation tolerance between 57 min to 63 min, for 2nd, 3rd and 4th incubation tolerance between 29 min to 31 min).
5. The ELISA microplate reader has to be equipped with a reading filter of 450nm and ideally with a second filter (600-650nm) for blanking purposes. Its standard performances should be (a) bandwidth $\leq 10\text{nm}$; (b) absorbance range from 0 to ≥ 2.0 ; (c) linearity to ≥ 2.0 ; repeatability $\geq 1\%$. Blanking is carried out on the well identified in the 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.

L. PRE ASSAY CONTROLS AND OPERATIONS

1. Check the expiration date of the kit printed on the external label. Do not use the device if expired.
2. Check that the liquid components are not contaminated by visible particles or aggregates. Check that the Substrate is colourless or pale blue by aspirating a small volume of it with a sterile plastic pipette. Check that no breakage occurred in transportation and no spillage of liquid is present inside the box. Check that the aluminium pouch, containing the microplate, is not punctured or damaged.
3. Dilute the Conjugate # 2 as described above.
4. Dilute all the content of the 25x concentrated wash buffer as described above.
5. Allow all the other components to reach room temperature (about 1 hr) and then mix gently on vortex all liquid reagents as described.
6. Set the ELISA incubator at $+37^\circ\text{C} \pm 0.1^\circ\text{C}$ 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 the validation of the instrument for its use with the kit.
7. Check that the ELISA reader is turned on or ensure it will be turned on at least 20 minutes before reading.
8. If using an automated work station, turn 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 (Manual)

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.

- Place the required number of microwells in the microwell holder. Leave the 1st well empty for the operation of blanking (optional).
- Dispense 100 µL of Sample Diluent to each well except the well for operation of blanking.
- Add 100 µL of Sample, 100 µL of Negative and Positive Controls in duplicate pipetting up and down for homogenization.
Pipette gently avoiding overflowing and contaminating adjacent wells.
Seal strips securely with microplate sealer.
- Incubate the microplate for **60 min at +37°C**.
- After incubation, remove solution from the wells by inverting the microplate and tapping dry on paper towel. Wash the microtiter plate 5 cycles according to the washing procedure (chapter I.3).
- Add 200 µL of Conjugate # 1 into each well, except the 1st blanking well, and cover with the sealer.
Important note: Be careful not to touch the plastic inner surface of the well with the tip filled with the Conjugate. Contamination might occur.
- Incubate the microplate for **30 min at +37°C**.
- After incubation, remove solution from the wells by inverting the microplate and tapping dry on paper towel. Wash the microtiter plate 3 cycles according to the washing procedure (chapter I.3).
- Dispense 200 µL of diluted Conjugate # 2 into each well, except the 1st blanking well, and cover with the sealer.
Important note: Be careful not to touch the plastic inner surface of the well with the tip filled with the Conjugate. Contamination might occur.
- Incubate the microplate for **30 min at +37°C**.
- After incubation, remove solution from the wells by inverting the microplate and tapping dry on paper towel. Wash the microtiter plate 5 cycles according to the washing procedure (chapter I.3).
- Pipette 150 µL of the Substrate TMB into each well, the blank well included.
- Incubate the microplate for **30 min at +18...25°C**.
Important note: Do not expose to strong direct illumination. High background might be generated.
- Pipette 100 µL of Stop Solution into all the wells using the same pipetting sequence as in step 12 to stop the enzymatic reaction. Addition of acid will turn the positive control and positive samples from blue to yellow.
- Measure the color intensity of the solution in each well, as described in chapter I.5, at 450nm filter (reading) and possibly at 600-650nm (background subtraction), blanking the instrument on A1.
Reading has to be carried out just after the addition of the Stop Solution and anyway not any longer than 30 minutes after its addition. Some self oxidation of the chromogen can occur leading to high background.

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 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 chromogen can occur leading to a higher background

N. ASSAY SCHEME

STEP	PROCEDURE
Sample step	Add 100 µL of Sample Diluent. Add 100 µL of sample/control to the diluent and pipet up & down for mixing. Test Negative and Positive Controls in duplicate. Incubate 60 minutes at 37°C.
Wash step	Perform wash step 5x.
Conjugate 1	Add 200 µL of ready-to-use Conjugate 1 to wells of the microtiter plate. Incubate 30 minutes at 37°C.
Wash step	Perform wash step 3x.
Conjugate 2	Add 200 µL of diluted Conjugate 2 to wells of the microtiter plate. Incubate 30 minutes at 37°C
Wash step	Perform wash step 5x.
Substrate TMB	Add 150 µL of Substrate TMB to the wells of the microtiter plate.
Colour Development	Incubate 30 minutes at +18...25°C.
Stopping	Add 100 µL of Stop Solution and read OD at 450nm with reference wavelength at 600-650nm in an ELISA microplate reader.

An example of dispensation scheme is reported in the table below:

		Microplate											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	PC3	S8										
B	NC	S1	S9										
C	NC	S2											
D	PC1	S3											
E	PC1	S4											
F	PC2	S5											
G	PC2	S6											
H	PC3	S7											

Legenda: BLK = Blank NC = Negative Control
PC1 = Positive Control HIV-1
PC2 = Positive Control HIV-2
PC3 = Positive Control HIV p-24
S = Sample

O. INTERNAL QUALITY CONTROL

A check is performed on the controls and or calibrator any time the kit is used in order to verify whether the expected OD450nm values have been matched in the analysis.

Ensure that the following parameters are met:

Check	Requirements
Blank well	< 0.100 OD450nm value
Negative Control (NC)	< 0.100 mean OD450nm value after blanking
Positive Control HIV-1	> 0.500 OD450nm value
Positive Control HIV-2	> 0.500 OD450nm value
Positive Control HIV p-24	> 0.500 OD450nm 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:

Problem	Check
Blank well > 0.100 OD450nm	1. that the Substrate solution has not become contaminated during the assay
Negative Control (NC) > 0.100 OD450nm after blanking	1. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 2. that the proper washing solution has been used and the washer has been primed with it before use; 3. that no mistake has been done in the assay procedure (dispensation of positive control instead of negative control); 4. that no contamination of the negative control or of the wells where the control was dispensed has occurred due to positive samples, to spills or to the enzyme conjugate; 5. that micropipettes have not become contaminated with positive samples or with the enzyme conjugate 6. that the washer needles are not blocked or partially obstructed.
Positive Controls < 0.500 OD450nm	1. that the procedure has been correctly performed; 2. that no mistake has occurred during the distribution of the control (dispensation of negative control instead of positive control). 3. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 4. that no external contamination of the positive control has occurred.

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

P. CALCULATION OF RESULTS

P.1. Validity

Two Negative Controls (NC), two HIV-1 Positive Controls (PC1), two HIV-2 Positive Controls (PC2) and two HIV-1 p24 Controls (PC3) should be included in each run. The results for the controls should be within the acceptance criteria before any sample results can be interpreted.

Calculation of the Negative Control Mean NC_{MEAN} :

Example:

Absorbance NC
0.021
0.025

0.046

$$NC_{MEAN} = 0.046 / 2 = 0.023$$

The mean of the absorbance of the Negative Controls, after blanking, must be less than 0.100. If the mean value is greater than or equal to 0.100, the run should be repeated.

Calculation of the HIV-1 Positive Control Mean $HIV1-PC_{MEAN}$:

Example:

Absorbance HIV1-PC
1.545
1.239

2.784

$$HIV1-PC_{MEAN} = 2.784 / 2 = 1.392$$

The mean of the absorbance of the HIV-1 Positive Controls must be greater than 0.500. If the mean value is less than or equal to 0.500, the run should be repeated.

Calculation of the HIV-2 Positive Control Mean $HIV2-PC_{MEAN}$:

Example:

Absorbance HIV2-PC
1.459
1.343

2.802

$$HIV2-PC_{MEAN} = 2.802 / 2 = 1.401$$

The mean of the absorbance of the HIV-2 Positive Controls must be greater than 0.500. If the mean value is less than or equal to 0.500, the run should be repeated.

Calculation of the HIV-1 p24 Positive Control Mean $HIV-1\ p24-PC_{MEAN}$:

Example:

Absorbance HIV-1 p24-PC
2.223
2.172

4.395

$$HIV-1\ p24-PC_{MEAN} = 4.395 / 2 = 2.198$$

The mean of the absorbance of the HIV-1 p24 Positive Controls must be greater than 0.500. If the mean value is less than or equal to 0.500, the run should be repeated.

P.2. Cut-Off Calculation

The tests results are calculated by means of a cut-off value determined with the following formula on the mean OD_{450nm} value of the Negative Control (NC) - OD_{450nm} Blank:

$$(NC_{mean} - blank) + 0.170 = \text{Cut-Off (Co)}$$

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

Important note: When the calculation of results is performed by the operating system of an ELISA automated work station, ensure that the proper formulation is used to calculate the cut-off value and generate the correct interpretation of results.

Q. INTERPRETATION OF RESULTS

1. Specimens with absorbance values less than the cut-off value are considered not reactive by the criteria of this immunoassay, and may be considered negative for antibodies to HIV1+2 and HIV-1 p24. Further testing is not required.
2. Specimens with absorbance values equal to or greater than the cut-off are considered to be reactive or positive for HIV-1 and/or HIV-2 antibodies or HIV-1 p24. These specimens (using the original specimen) should be re-tested in duplicate before final confirmation of the result.
3. Initially reactive specimens, which do not react in either of the duplicate repeat tests, are considered negative for antibodies of HIV1+2 and HIV-1 p24. Further testing is not required.
4. If one of both retested values is equal to or greater than the cut-off value, the specimen is considered repeatedly reactive. Specimens that have been found repeatedly reactive are interpreted to be positive for the presence of antibodies to HIV-1 and/or HIV-2 or HIV-1 p24. In most settings it is appropriate to investigate repeatedly reactive specimens by additional, more specific tests.

Important notes:

1. Interpretation of results should be done under the supervision of the responsible of the laboratory to reduce the risk of judgment errors and misinterpretations.
2. Repeatedly reactive specimens should be submitted to a Confirmation Assay before diagnosis of HIV infection is released.
3. When test results are transmitted from the laboratory to an informatics centre, attention has to be done to avoid erroneous data transfer.
4. Diagnosis of HIV infection has to be done and released to the patient only by a qualified medical doctor.

R. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Evaluation of Performances has been conducted in accordance to what reported in the Common Technical Specifications (CTS) as required by art. 5, Chapter 3 of IVD Directive 98/79/EC.

The performances evaluation was carried out both in an external centre and in Adaltis' laboratories as well to complete the study.

R.1. SPECIFICITY AND SENSITIVITY

R.1.1 Specificity

The specificity evaluated on:

- ❖ 5014 European unselected blood donors from two centres including 40 samples from first time donors
- ❖ 201 Hospitalized patients
- ❖ 116 Potentially interfering samples:
 - ✓ 27 Pregnancy samples (6 monopar, 17 multipar and 4 unknown)
 - ✓ 27 Rheumatoid Factor (RF) positive samples
 - ✓ 25 Hemolyzed samples including heavy hemolyzed
 - ✓ 27 with other infection (4 HBV, 5 EBV, 5 HCV, 4 HSV, 5 Rubella, 4 Toxoplasmosis)
 - ✓ 5 Hyperbilirubinemia samples
 - ✓ 5 Hyperlipemia samples
- ❖ 50 Samples [25 Positives (HIV-1, HIV-2 and HIV-1 p24) and 25 Negative] have been tested and no difference due to the method of sample preparation (plasma-serum, citrate, EDTA and Heparin) has been observed.

From the 5014 European unselected blood donors, 19 (nineteen) samples were initially reactive (IR) and tested in duplicate. These resulted in 17 (seventeen) repeated reactive (RR) and they were tested with a confirmatory test. One sample remained indeterminate.

Actual Status	Test Results			
	IR	RR	NEG	Total
Negative	18	16	4997	5013
Positive	0	0	0	0
Indetermined	1	1	0	1
Total	19	17	4997	5014

A final specificity has been found at 99.7%.

R.1.2 Analytical Sensitivity (Limit of Detection)

The analytical sensitivity was determined by means of the WHO international standard for HIV-1 p24 Antigen, First International Reference Reagent, NIBSC code 90/636.

A dilution into a negative matrix was prepared (0.1-10 IU/mL). This dilution was tested in three different test-runs (three microplates) over two tests (two days). For each individual run, a new dilution of samples was made. The summary results are shown in Table below.

Run	1	2	3
HIV-1 p24 (IU/mL)	OD/CO		
10	11.9	12.6	12.3
5	8.0	10.7	9.8
2.5	4.3	6.2	5.7
1	1.8	2.8	2.6
0.5	1.0	1.6	1.4
0.25	0.6	1.0	0.8
0.1	0.4	0.5	0.5
0	0.2	0.3	0.3

The sensitivity limit has been estimated < 1.0 IU/mL

R.1.3 Diagnostic Sensitivity

The diagnostic sensitivity of the EIAGEN Detect HIV 4 Total Screening Kit was based on testing of a panel of 500 HIV1/2 positive samples, 31 seroconversion panels

(supplied by BBI-Seracare/ZeptoMetrix) and 40 early seroconversion samples.

In details:

- ❖ 500 Positive Samples (400 HIV-1 and 100 HIV-2 including subtype A, B, C, D, F, G, H, J, K, CRF);
- ❖ 50 cell culture supernatants including different HIV-1 subtypes (group M subtype A to K, CRF01_AE, CRF02_AG, group N, group O) and HIV-2;
- ❖ 50 HIV-1 p24 Antigen Positive Samples
- ❖ 31 Seroconversion Panels (see table below)

Seroconversion Panel	Adaltis EIAgen	4 th gen. assay	3 rd gen. assay	HIV -1 p24 antigen	NAT
	First sample detected positive in the panel				
Y-PRB925	5		5	5	5
AB/PRB927	2	2	2	2	2
AC/PRB928	2	2	2	2	2
AD/PRB929	3	3	6	3	3
AE PRB930	1		3	1	1
PRB933	2	2	2	2	2
PRB934	1	1	1	1	1
AP/PRB940	1	2	3	2	1
AQ/PRB941	3	4	4	3	2
AS/PRB943	3	3	6	3	2
AU PRB945	3		4	3	1
AW/PRB947	2	2	2	2	1
AX PRB948	3	4	4+	3	3
AZPRB950	2		4	2	2
BA PRB 951	3	3	5	3	3
PRB952	3	3	4	3	2
BE/PRB955	2	2	4	2	1
BF PRB 956	4	4	5	4	2
BI/PRB959	1	1	3	1	1
PRB960	7	8	9+	8	8
PRB962	5	5	6+	5	3
PRB963	6	6	7	6	5
PRB964	6+	6	ND	6	4
PRB965	4	2	4	2	1
PRB967	4	4	4	4	2
PRB968	7	7	7	7	5
6240	7	8	9	8	6
9028	6	6	ND	6	6
9077	12	12	14	12	12
9079	9	9	11	9	8
12007	4	4	5	ND	4

- ❖ 42 Early Seroconversion Samples (positive for HIV-1 p24 core antigen and HIV antibodies are absent or weakly present - indeterminate result on Western Blot test).

A final sensitivity has been found 100%.

R.2. PRECISION

The precision of the device was assessed by determining its values in a within and between runs. In the tables below results are reported for a Negative sample and Positive samples.

R.2.1 Intra lot results:

EIAgen Detect HIV 4 Total Screening code: 081311

1st Lot

Sample	S/Co Mean	Precision - %CV		
		Within run	Between Run	Total
Negative	0.37	23.2	4.5	23.6
Pos A-HIV 1	1.80	10.6	9.4	14.1
Pos A-HIV 2	1.91	10.7	7.7	13.1
Pos HIV-1 p24	2.14	10.9	4.6	11.8

EIAgen Detect HIV 4 Total Screening code: 081311

2nd Lot

Sample	S/Co Mean	Precision - %CV		
		Within run	Between Run	Total
Negative	0.40	12.6	10.8	16.6
Pos A-HIV 1	1.47	6.9	7.4	10.3
Pos A-HIV 2	1.53	7.6	8.1	11.1
Pos HIV-1 p24	1.78	4.6	4.9	6.7

EIAgen Detect HIV 4 Total Screening code: 081311

3th Lot

Sample	S/Co Mean	Precision - %CV		
		Within run	Between Run	Total
Negative	0.52	18.7	5.4	19.5
Pos A-HIV 1	1.65	8.6	4.6	9.8
Pos A-HIV 2	1.78	9.7	4.9	10.9
Pos HIV-1 p24	2.05	7.4	4.6	8.7

EIAgen Detect HIV 4 Total Screening code: 081311

4th Lot

Sample	S/Co Mean	Precision - %CV		
		Within run	Between Run	Total
Negative	0.58	19.6	3.0	19.8
Pos A-HIV 1	1.59	9.4	1.4	9.5
Pos A-HIV 2	1.66	11.4	2.64	11.7
Pos HIV-1 p24	2.17	9.1	2.0	9.3

R.2.2 Inter lot results:

Sample	S/Co Mean	Precision - %CV	
		Between run	Total
Negative	0.48	18.4	26.5
Pos A-HIV 1	1.63	9.7	13.3
Pos A-HIV 2	1.72	9.9	14.2
Pos HIV-1 p24	2.03	8.6	12.1

R.2.3 Specifications:

Intra Lot:

Within Run:

%CV on positive samples < 15%

%CV on negative sample < 25%

Between Run:

%CV on positive samples < 15%

%CV on negative sample < 25%

Inter lot:

Between Lot:

%CV on positive samples < 15%

%CV on negative sample < 25%

Total precision:

%CV on positive samples < 20%

%CV on negative sample < 30%

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"> - 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) -incorrect temperature or incorrect incubation time (suggestion: more care in the incubator maintenance; note down the beginning of the incubation) -error in washing or in photometer reading (suggestion: check operating or settings of respective instruments) -contamination of Substrate or Conjugate (suggestion: use only disposable and clean plastic containers)
Low reproducible results	<ul style="list-style-type: none"> -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) -error in washing or in reading (suggestion: check operating or settings of respective instruments) -contamination of Substrate (suggestion: use only disposable and clean plastic containers) -pollution or degradation of reagents (suggestion: use appropriate tips, disposable and clean plastic containers for reagents and high quality distilled or equivalent water)
no colorimetric reaction after addition of substrate	<ul style="list-style-type: none"> -some reagent not pipetted - strong contamination of Conjugates or Substrate -errors in performing the assay procedure (e.g. accidental pipetting of reagents in a wrong sequence or from the wrong vial, etc.)
too low reaction (too low ODs)	<ul style="list-style-type: none"> -incubation time too short, incubation temperature too low -incorrect conjugate dilution
too high reaction (too high ODs)	<ul style="list-style-type: none"> -incorrect conjugate dilution -incubation time too long, incubation temperature too high -water quality for wash buffer insufficient (low grade of deionization) -insufficient washing (conjugates not properly removed)
unexplainable outliers	<ul style="list-style-type: none"> -contamination of pipettes, tips or containers -inconstant and insufficient washing (conjugates not properly removed)
too high within-run CV%	<ul style="list-style-type: none"> -reagents and/or strips not pre-warmed to Room Temperature prior to use - plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)

ERROR	POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS
too high between-run CV%	<ul style="list-style-type: none"> -incubation conditions not constant (time, temperature) -controls and samples not dispensed at the same time (with the same intervals) (check pipetting order) -person-related variation

T. AUTOMATION

The procedure identified in this instruction for use is 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


- The user of this kit is advised to carefully read and understand the instructions for use. Strict adherence to the protocol is necessary to obtain reliable test results. In particular, correct sample and reagent pipetting, along with careful washing and timing of incubation steps is essential for accurate, reproducible detection of HIV-1 and HIV-2 antibodies and p24 antigens.
- If possible, use fresh serum or plasma samples. Sample degradation as well as multiple freeze-thaw cycles may cause erroneous results. **Do not use heat-inactivated samples.**
- Falsely reactive test results can be expected with a test kit of this nature. The proportion of reactives will depend on the sensitivity and specificity of the test kit and on the prevalence of HIV-1 and HIV-2 antibodies in the population to be screened.
- After the EIAgen Detect HIV 4 Total Screening Kit is performed, repeatedly reactive samples should be submitted for additional testing using Western Blot (WB), Indirect Immunofluorescence Assay (IFA) or Radioimmunoassay (RIA) tests. The determination that a person's samples contains antibodies to HIV and/or HIV antigens has extensive medical, social, psychological and economic implications. It is recommended that confidentiality, appropriate counselling and medical evaluation be considered an essential aspect of the testing sequence.
- AIDS and AIDS-related conditions are clinical diseases and their diagnosis can only be established clinically. EIA testing alone cannot be used to diagnose AIDS. A non-reactive test result at any point in the testing sequence does not preclude the possibility of exposure to or infection with HIV. The risk of an asymptomatic person, who is repeatedly reactive, of developing AIDS and/or AIDS-related conditions, is not known.
- The test result should be used in conjunction with all other clinical and diagnostic data.
- Antibodies to HIV may occur due to voluntary participation in an HIV vaccine study. Interpretation of this diagnostic test will depend on the type of vaccine given. Correlation with the medical history and additional testing may be necessary to accurately diagnose HIV in vaccine volunteers.


BIBLIOGRAPHY


1. Alizon, M., Sonigo, P., Barré-Sinoussi, F., Chermann, J.-C., Tiollais, P., Montagnier, L. and Wain-Hobson, S., 1984. Molecular Cloning of Lymphadenopathy-Associated Virus. *Nature* 312:757-760.
2. Barré-Sinoussi, F., Chermann, J.-C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbrum, W. and Montagnier, L. 1983. Isolation of a T-lymphotropic Retrovirus from a Patient at Risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). *Science* 220:868-871.
3. Clavel, F., Mansinho, K., Chamaret, S. et al. 1987. Human Immunodeficiency Virus Type 2 Infection Associated with AIDS in West Africa. *N. Engl. J. Med.* 316:1180-1185.
4. Gallo, R.C., Salahuddin, S.Z., Popovic, M., Shearer, G.M., Kaplan, M., Haynes, B.F., Palker, T.J., Redfield, R., Oleske, J., Safal, B., White, G., Foster, P. and Markham, P.D. 1984. Frequent Detection and Isolation of Cytopathic Retroviruses (HTLV-III) from Patients with AIDS and at Risk for AIDS. *Science* 224:500-503.
5. Gold, J. and Dwyer, J., 1994. A Short History of AIDS. *Med. J. Aust.* 160:251-252.
6. Hahn, B.N., Shaw, G.M., Arya, S.K., Popovic, M., Gallo, R.C. and Wong-Staal, F., 1984. Molecular Cloning and Characterization of the HTLV-III Virus Associated with AIDS. *Nature* 312:166-169.
7. IVD Directive 98/79/CE, Common Technical Specifications (CTS) – Annex II, List A.
8. Lin, H.J. 1995. Laboratory Tests for Human Immunodeficiency Viruses. *J. Int. Fed. Clin. Chem.* 7:61-65.
9. Luciw, P.A., Potter, S.J., Steimer, K., Dina, D. and Levy, J.A., 1984. Molecular Cloning of AIDS-Associated Retrovirus. *Nature* 312:760-763.
10. Ly, T.D., Laperche, S., Brennan, C., Vallari, A., Ebel, A., Hunt, J., Martin, L., Daghfal, D., Schochetman, G. And Devare, S. 2004. Evaluation of the sensitivity and specificity of six HIV combined p24 antigen and antibody assays. *J. Virol. Meth.* 122: 185-194.
11. Popovic, M., Sarngadharan, M.G, Read, E., and Gallo, R.C., 1984. Detection, Isolation, and Continuous Production of Cytopathic Retrovirus (HTLV-III) from Patient with AIDS and Pre-AIDS. *Science* 224:497-500.
12. Sarngadharan, M.G., Popovic, M., Bruch, L., Schüpbach, J. and Gallo, R.C., 1984. Antibodies Reactive with Human T-Lymphotropic Retroviruses (HTLV-III) in the Serum of Patients with AIDS. *Science* 224:506-508.
13. Saville, R.D., Constantine, N.T., Cleghorn, F.R., Jack, N., Bartholomew, C., Edwards, J., Gomez, P. and Blattner, W.A. 2001. Fourth-generation enzyme-linked immunosorbent assay for the simultaneous detection of human immunodeficiency virus antigen and antibody. *J. Clin. Microbiol.* 39 (7): 2518-2524.
14. Sehulster, L.M., Hollinger, F.B., Dreesman, G.R. and Melnick, J.L., 1981. Immunological and Biophysical Alteration of Hepatitis B Virus Antigens by Sodium Hypochlorite Disinfection, *App. and Environ. Microbiol.* 42:762-767.
15. Sinicco, A., For a, R., Scalandra, M., Lucchini, A., Caramello, P. and Giovanni, P. 1993. Risk of Developing AIDS after Primary Acute HIV-1 Infection. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 6:575-581.
16. Spire, B., Montagnier, L., Barré-Sinoussi, F. and Chermann, J.-C., 1984. Inactivation of Lymphadenopathy Associated Virus by Chemical Disinfectants. *Lancet*: 889-901, Oct. 20.
17. Vézinet-Brun, F., Barré-Sinoussi, F., Salmot, A.G., Christol, D. Montagnier, L., Rouzioux, C., Klatzmann, D., Rozenbaum, W., Gluckmann, J.C. and Chermann, J.-C., 1984. Detection of IgG Antibodies to Lymphadenopathy-Associated Virus in Patients with AIDS or Lymphadenopathy Syndrome. *Lancet*: 1253-1256, June 9.
18. Weber, B., Thorstensson, R., Tanprasert, S., Schmitt, U. And Melchior, W. 2003. Reduction of the diagnostic window in three cases of human immunodeficiency-1 subtype E primary infection with fourth-generation HIV screening assays. *Vox Sanguinis* 85: 73-79.
19. World Health Organization. 2004. HIV assays: operational characteristics (Phase 1): report 15 antigen/antibody ELISAs. www.who.int/diagnostics_laboratory/publications/en/HIV_Report15.pdf.

EIAgen

Detect HIV 4 Total Screening Kit

REF 081311  96

REF 081312  192

REF 081315  480



IVD

 0459

Lea atentamente este prospecto antes de utilizar este producto.

No se puede garantizar la fiabilidad de los resultados de este ensayo si no se siguen exactamente las instrucciones indicadas en este prospecto.



Fabricante:
Adaltis S.r.l
Via Durini, 27
20122 Milano (Italy)
Tel. +39-0774-5791 - Fax +39-0774-353085
www.adaltis.net

es

SIMBOLOS USADOS EN LAS ETIQUETAS

Español ES							
	Dispositivo Médico para Diagnóstico in Vitro Solamente	Código de Catalogo	Número de Lote	Atención, consulte las Instrucciones de uso	Rango de Temperatura	Fecha de Vencimiento	Número de Tests
					MICROPLATE	DIL SPE	CONTROL -
	Fabricante	Mantener al Reparado de la Luz	Riesgo Biológico	Fecha de Fabricación	Microplaca	Diluyente de Muestras	Control Negativo
	CONTROL + HIV-1	CONTROL + HIV-2	CONTROL + HIV p-24	CONJ 1			
	Control Positivo HIV-1	Control Positivo HIV-2	Control Positivo HIV p-24	Conjugado # 1			
	CONJ 2 100X	CONJ 2 DIL	SUBS TMB	SOLN STOP	WASH BUF 25X		
	Conjugado # 2 Concentrado 100x	Diluyente de Conjugado # 2	Sustrato TMB	Solución de Parada	Solución de Lavado Concentrada 25x		

A. USO PREVISTO

EIAgen Detect HIV 4 Total Screening Kit es un inmunoensayo de fase sólida enzimática de cuarta generación que utiliza una mezcla de antígenos y anticuerpos, destinado al screening diagnóstico *in vitro* en suero y plasma humano (EDTA, Heparina y Citrato) de anticuerpos para todos los subtipos conocidos de HIV-1, HIV-2 y el antígeno p24 de HIV-1

El kit es un ensayo de Ag/Ab combinados por lo que no se puede utilizar para detectar sólo el antígeno p24 de HIV-1. Este kit es para uso diagnóstico *in vitro* solamente, debe ser utilizado por profesionales de la salud y su venta al público no está autorizada.

B. INTRODUCCIÓN

El Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) es un grupo de síntomas que resultan de la incapacidad causada al sistema inmune humano por el virus de inmunodeficiencia humana (HIV). La infección HIV podría avanzar a una fase sintomática que se caracteriza por infecciones oportunistas y que podrían causar la muerte.

Los agentes etiológicos del SIDA, HIV, apuntan a unos tipos específicos de células T causando Linfopenia y afectando las células T mediadoras de la inmunidad. El HIV es miembro de una familia de retrovirus con dos subfamilias: HIV-1 y HIV-2. El HIV-1 es más virulento y transmisible que el HIV-2. El HIV-1 es la causa de las infecciones de HIV a nivel global mientras que el HIV-2 se encuentra predominantemente en África Occidental. Como la reacción serológica cruzada entre el HIV-1 y el HIV-2 es altamente variable y depende de las muestras examinadas, deben estar incluidos en el ensayo antígenos para la detección específica de ambos HIV-1 y HIV-2.

El HIV es transmitido a través del contacto sexual con personas infectadas, al compartir agujas y jeringas con personas infectadas y la transfusión de sangre contaminada. Los enzimo-inmunoensayos (tales como el EIAgen Detect HIV 4 Total Screening ELISA cuarta generación) están recomendados para examinar la sangre y el plasma humano en búsqueda de la presencia de anticuerpos anti-HIV y antígenos HIV-1 p24. La presencia de anti-HIV-1 y/o anti-HIV-2 en la sangre indica una infección potencial con HIV-1 y/o HIV-2 y en consecuencia esta sangre no debería ser usada en transfusiones o para la fabricación de productos inyectables.

C. PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

Antígenos que representan epítomos de HIV-1 gp41 y HIV-2 gp36 están recubriendo pocillos de una microplaca junto con los anticuerpos monoclonales contra del HIV-1 p24. La muestra de suero o de plasma se añade al pocillo y si los anticuerpos específicos para el HIV-1 y/o HIV-2 (IgG, IgM o IgA) están presentes en la muestra, se formaran complejos estables con los antígenos de HIV adheridos al pocillo. El antígeno de HIV-1 p24, si está presente, se unirá simultáneamente a los anticuerpos en el pocillo y al detector de anticuerpos presente en el diluyente de muestras. Los anticuerpos no reactivos serán eliminados mediante el lavado. Los complejos anticuerpo-antígeno estables, se identifican a

través de la sucesiva adición de antígenos biotinilados y peroxidasa de rábano (HRP) conjugados con Estreptavidina. Estos complejos anticuerpo-antígeno se cuantifican a través de la actividad catalítica de la peroxidasa de rábano. A continuación se agrega una solución de sustrato de peroxidasa y es convertida a un producto de color azul. Una muestra positiva genera un color azul oscuro mientras que un color azul claro casi invisible indica que tenemos una muestra negativa. Una vez se agrega la solución de parada, el color de la solución cambiará de azul a amarillo. La densidad óptica (OD) es medida con un espectrofotómetro (lector ELISA) a 450nm con un filtro de referencia de 600-650nm y estará en proporción a la cantidad de anticuerpos anti-HIV1/2 y HIV-1 p24 que estén presentes en la muestra.

D. COMPONENTES

El kit contiene reactivos para realizar 96 pruebas (código 081311), 192 pruebas (código 081312) o 480 pruebas (código 081315).

Microplaca	1
Control Negativo	1x2 mL/vial
Control Positivo HIV-1	1x2 mL/vial
Control Positivo HIV-2	1x2 mL/vial
Control Positivo HIV p-24	1x2 mL/vial
Coniugado # 1	1x25 mL/vial
Coniugado # 2 Conc. 100x	1x0.25 mL/vial
Diluyente de Coniugado # 2	1x25 mL/vial
Diluyente de Muestras	1x12.5 mL/vial
Sustrato TMB	1x40 mL/vial
Solución de Parada	1x15 mL/vial
Solución de Lavado Conc. 25x	1x50 mL/vial
Envoltorios de placa	2
Número de pruebas	96
Código	081311

Microplaca	2
Control Negativo	1x2 mL/vial
Control Positivo HIV-1	1x2 mL/vial
Control Positivo HIV-2	1x2 mL/vial
Control Positivo HIV p-24	1x2 mL/vial
Coniugado # 1	2x25 mL/vial
Coniugado # 2 Conc. 100x	2x0.25 mL/vial
Diluyente de Coniugado # 2	2x25 mL/vial
Diluyente de Muestras	2x12.5 mL/vial
Sustrato TMB	2x40 mL/vial
Solución de Parada	1x40 mL/vial
Solución de Lavado Conc. 25x	2x50 mL/vial
Envoltorios de placa	4
Número de pruebas	192
Código	081312

Microplaca	5
Control Negativo	1x4 mL/vial
Control Positivo HIV-1	1x4 mL/vial
Control Positivo HIV-2	1x4 mL/vial
Control Positivo HIV p-24	1x4 mL/vial
Coniugado # 1	5x25 mL/vial
Coniugado # 2 Conc. 100x	5x0.25 mL/vial
Diluyente de Coniugado # 2	5x25 mL/vial
Diluyente de Muestras	5x12.5 mL/vial
Sustrato TMB	3x40 mL/vial
Solución de Parada	2x40 mL/vial
Solución de Lavado Conc. 25x	5x50 mL/vial
Envoltorios de placa	10
Número de pruebas	480
Código	081315

1. Microplaca:

12 tiras de 8 pocillos rompibles recubiertos con peptidos de HIV específicos de gp36 y gp41 y proteína de gp41 junto con anticuerpos monoclonales específicos contra el Antígeno p24 del HIV-1.

Las microplacas están selladas dentro de una bolsa de aluminio con desecante. Atempere la microplaca a temperatura ambiente (+18...24°C) antes de abrir la bolsa. Las tiras que no hayan sido usadas tienen que ser depositadas nuevamente dentro de la bolsa y sellarla para ser guardadas a una temperatura de +2...8°C, en presencia del desecante.

2. Control Negativo

Control listo para usar. Contiene suero humano negativo para anticuerpos HIV y para Antígeno p24 y 0.05% Proclin 300 como conservante.

3. Control Positivo HIV-1

Control listo para usar. Contiene suero humano positivo para anticuerpos HIV-1 y 0.05% Proclin 300 como conservante.

Nota Importante: No se puede asegurar totalmente la ausencia de patógenos viables en el control positivo, y por lo tanto, el control debería ser manipulado como de potencial riesgo biológico, de acuerdo a las buenas prácticas del laboratorio.

4. Control Positivo HIV-2

Control listo para usar. Contiene suero humano positivo para anticuerpos HIV-2 y 0.05% Proclin 300 como conservante.

Nota Importante: No se puede asegurar totalmente la ausencia de patógenos viables en el control positivo, y por lo tanto, el control debería ser manipulado como de potencial riesgo biológico, de acuerdo a las buenas prácticas del laboratorio.

5. Control Positivo HIV p-24

Control listo para usar. Contiene proteína recombinante de HIV-1 p24 y 0.05% Proclin 300 como conservante.

6. Conjugado # 1

Listo para usar. Reactivo codificado en color azul. Este contiene una mezcla de antígenos biotinilados en un tampón de fosfato y 0.05% Proclin 300 como conservante.

7. Conjugado # 2 Concentrado 100x

Solución concentrada al 100x. Contiene peroxidasa de rábano conjugada con Estreptavidina en un tampón estabilizador con conservante.

Reactivo para ser diluido con el Diluyente de Conjugado # 2.

Nota Importante: Cualquier porción que no sea usada del Conjugado # 2 diluido puede guardarse un máximo 6 días a +2...8°C.

8. Diluyente de Conjugado # 2

Listo para usar. Reactivo codificado en color naranja. El reactivo es usado para la dilución del Conjugado # 2 Concentrado 100x. Este contiene tampón fosfato y 0.05% Proclin 300 como conservante.

9. Diluyente de Muestras

Listo para usar. Reactivo codificado en color rojo. Contiene componentes activos, 1.0% v/v de proteínas de suero de ratón, 0.1% w/v de IgG humana añadida y 0.05% de Proclin 300 como conservante.

10. Sustrato TMB

Listo para usar. Contiene 0.26 mg/mL de 3,3',5,5' Tetrametilbenzidina (TMB) y 0.01% w/v de peróxido de Hidrógeno (H₂O₂) en un tampón de citrato.

Mezcle suavemente antes de usar.

Nota:

Es altamente sensible a la luz. Almacenar al abrigo de la luz.

11. Solución de Parada

Listo para usar.

Contiene una solución 0,3 M de H₂SO₄.

Mezcle suavemente antes de usarse.

La MSDS está disponible para el personal del laboratorio previa solicitud.

12. Solución de Lavado Concentrada 25x

Solución concentrada 25x.

Contiene 0.2% Proclin 300 como conservante. Una vez diluido el tampón de lavado contiene tampón de fosfato salino, Proclin 300 y Tween 20 como conservantes.

Una vez diluida, la solución de lavado es estable durante 6 días a +2...8°C.

E. MATERIAL NECESARIO NO INCLUIDO

1. Micropipetas calibradas de 200 µL, 50 µL y 10 µL y puntas desechables de plástico.
2. Agua grado EIA (doble destilada o desionizada, tratada con carbón vegetal para eliminar sustancias químicas oxidantes usadas como desinfectantes).
3. Cronómetro con un rango de 60 minutos o mayor.
4. Papel absorbente.
5. Incubador termostático calibrado de microplacas ELISA (seco o húmedo) configurado a +37°C (±0.5°C de tolerancia)
6. Lector calibrado de microplacas ELISA con 450nm (lectura) y si es posible con filtros de 600-650nm (blanco).
7. Lavador calibrado de microplacas ELISA.
8. Vortex o dispositivo de mezclado similar.

F. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. El equipo debe ser usado por personal técnico que haya sido entrenado adecuadamente y bajo la supervisión de un médico responsable por el laboratorio.
Este folleto debe ser leído cuidadosamente antes de usar el producto.
2. Este kit tiene que ser usado en un laboratorio certificado y calificado por una autoridad nacional en esta área (Ministerio de Salud o entidades similares) para poder llevar a cabo este tipo de análisis.
3. Todo el personal involucrado en el desarrollo y ejecución del ensayo debe vestir ropa protectora usada en los laboratorios, guantes libres de talco y gafas protectoras. El uso de cualquier artículo afilado (agujas) o cortante (cuchillas) debe ser evitado. Todo el personal involucrado debe estar entrenado

en prácticas de bioseguridad tal como lo recomienda el Centro de Control de Enfermedades en Atlanta, EE.UU. y como está reportado en la publicación del Instituto Nacional de Salud: "Bioseguridad en los Laboratorios de Microbiología y Biomédica", ed. 1984.

4. Todo el personal involucrado en el manejo de muestras debe estar vacunado contra la HBV y la HAV las cuales están disponibles, son seguras y efectivas.
5. El ambiente del laboratorio debe estar controlado de forma tal que evite los contaminantes tales como el polvo o los microorganismos que se transportan en el aire cuando se abren los tubos de ensayo, las microplacas o cuando se está ejecutando la prueba. Proteja el Sustrato TMB (TMB + H₂O₂) de la luz fuerte y evite la vibración de la mesa de trabajo cuando la prueba se está llevando a cabo.
6. Una vez recibido, guarde el kit a +2...8°C en un refrigerador de temperatura controlada o en cámara refrigerada.
7. No intercambie componentes entre los diferentes lotes de kits. Se recomienda que los componentes entre dos kits del mismo lote no sean intercambiados.
8. Revise que los reactivos estén claros y que no contengan partículas visiblemente gruesas o agregadas. De ser así, contacte al supervisor del laboratorio para que inicie el procedimiento necesario para su reemplazo.
9. Evite la contaminación cruzada entre muestras de suero/plasma usando las puntas desechables y cambiándolas siempre después de cada muestra.
10. Evite la contaminación cruzada entre los reactivos mediante el uso de puntas desechables y cambiándolas cada vez que las haya usado.
11. No use el kit después de la fecha de caducidad que está impresa en las etiquetas expuestas en la caja externa, caja interna y viales.
12. Maneje todas las muestras como potencialmente infecciosas. Todas las muestras de suero humano deberían ser manejadas al Nivel 2 de Bioseguridad como está recomendado por el Centro de Control de Enfermedades, Atlanta, EE.UU. de acuerdo con lo reportado en la publicación del Instituto de salud: "Bioseguridad en Laboratorios de Microbiología y Biomédica", ed. 1984.
13. Se recomienda el uso de recipientes de plástico para la preparación de soluciones de lavado o para transferir componentes a otras estaciones de trabajo de manera que se evite contaminación.
14. Los productos de desecho generados mientras se usa el equipo tienen que ser descargados siguiendo las directivas y leyes nacionales concernientes a los desechos de laboratorios y sustancias biológicas. En particular, los desechos líquidos generados a partir del proceso de lavado, residuos de controles y maestra deben ser tratados como material potencialmente infeccioso y desactivados. Un procedimiento sugerido es aquel que utiliza lejía doméstica al 10% por 16-18 horas o un calentamiento de desactivación en la autoclave a 121°C durante 20 minutos.
15. Los derramamientos accidentales deben ser secados con papel absorbente previamente

humedecido con lejía doméstica y luego con agua. El papel absorbente debe ser depositado en los contenedores destinados para desperdicios de laboratorios/hospitales.

16. La Solución de Parada contiene 0,3M de ácido sulfúrico. Evite el contacto con la piel o con los ojos. En el caso que haya contacto, lavarse inmediatamente con abundante agua.
17. No fume, coma, beba o aplique cosméticos en las áreas donde se manipulan muestras o reactivos.
18. Otros materiales de desecho que se hayan generado por el uso del equipo (ejemplo: puntas usadas en muestras y controles, microplacas usadas) deberían ser manejados como potencialmente infecciosos y desechados en concordancia a las leyes y directivas nacionales que rigen el manejo de desechos de laboratorio.
19. No pipetee usando la boca.

G. MUESTRAS: PREPARACIÓN Y ADVERTENCIAS

1. La sangre debe ser extraída asépticamente por punción venosa y el plasma o el suero preparado usando las técnicas estándar para la preparación de muestras de laboratorio. No se ha observado ningún efecto en la preparación de la muestra con citrato, EDTA y heparina.
2. Evite cualquier adición de conservantes a las muestras; especialmente azida sódica porque este químico afecta la actividad enzimática del conjugado y genera resultados falsos negativos.
3. Las muestras deben estar claramente identificadas con códigos o nombres para evitar la mala interpretación de los resultados. Cuando se utiliza el kit para analizar unidades de sangre se recomienda encarecidamente utilizar etiquetas de códigos de barras.
4. Las muestras hemolizadas (rojas) y aquellas visiblemente hiperlipidémicas (lechosas) deben ser descartadas porque podrían generar falsos resultados. Las muestras que contienen residuos de fibrina o partículas gruesas o filamentos microbianos y otro tipo de cuerpos extraños deberían ser descartadas porque podrían ocasionar falsos resultados.
5. El suero y el plasma pueden ser guardados a +2...8°C hasta cinco días después de su obtención. Para períodos de tiempo mayor, las muestras pueden ser guardadas congeladas a -20°C por varios meses. Cualquier muestra congelada no debería ser congelada/descongelada más de una vez porque esto podría afectar el resultado final de la prueba.
6. Si hay partículas presentes, centrifugar a 2.000 rpm durante 20 minutos o filtre usando filtros de 0.2-0.8µ para limpiar la muestra.
7. No use muestras inactivadas por calor porque ellas pueden originar una falsa reactividad.
8. Guardar muestras diluidas no es aconsejable y puede afectar negativamente el desarrollo de la prueba.
9. Mezcle las muestras antes de usarlas.

H. PREPARACIÓN DE COMPONENTES Y ADVERTENCIAS

Un estudio realizado en un kit abierto no ha detectado ninguna pérdida relevante de actividad hasta los 2 meses.

Permita que los reactivos alcancen la temperatura ambiente (+18...24°C) al menos 30 minutos antes de su uso.

Tome solo el volumen necesario para la prueba. Vuelva a guardar el resto a +2...8°C.

1. Microplaca

Permita que la microplaca alcance la temperatura ambiente (1 hora) antes de abrir el contenedor.

Las tiras que no haya usado tienen que ser devueltas a la bolsa de aluminio firmemente cerrada, para ser guardadas a +2...8°C.

Cuando abra el kit por primera vez, las tiras que quedan allí son estables hasta por dos meses o hasta que el indicador de humedad que está dentro de la bolsa desecante se torne de amarillo a verde.

2. Control Negativo

Listo para usar. Mezcle bien antes de usar en el Vortex.

3. Controles Positivos

Listos para usar. Mezcle bien en el Vortex antes de su uso. Manipule este componente como potencialmente infeccioso.

4. Conjugado # 1

Listo para usar. Mezcle bien antes de usar.

Sea cuidadoso y no contamine el líquido con químicos oxidantes, polvo o microorganismos que reposan en el aire.

Si este componente tiene que ser transferido use solo plástico, si es posible, contenedores desechables estériles.

5. Conjugado # 2 Concentrado 100x

El reactivo concentrado 100x tiene que ser diluido en el Diluyente de Conjugado # 2.

Ejemplo: Agregue 250 µL de Conjugado Concentrado # 2 a 24,75 mL de Diluyente de Conjugado # 2.

Una vez diluido, mezcle cuidadosamente antes de su uso.

Una vez diluido procure no contaminar el líquido con químicos oxidantes, polvo o microorganismos que reposan en el aire.

Si el componente debe ser transferido use solo plástico, si es posible, contenedores desechables estériles.

6. Diluyente de Conjugado #2

Listo para usar. Mezcle bien en el Vortex antes de usar.

El reactivo se utiliza para la dilución del Conjugado #2.

7. Diluyente de Muestras

Reactivo listo para ser usado. Mezcle bien en el Vortex antes de usar.

8. Sustrato TMB

Componente listo para ser usado.

Mezcle bien en el Vortex antes de usar.

Sea cuidadoso de no contaminar el líquido con químicos oxidantes, polvo y microorganismos que permanecen en el aire.

No exponga el TMB a una fuerte iluminación, agentes oxidantes o superficies metálicas.

Si el componente tiene que ser transferido use solo plástico, si es posible, contenedores desechables estériles.

9. Solución de Parada

Listo para usar.

Mezcle bien en el Vortex antes de usar.

10. Solución de Lavado Concentrada 25x

La solución concentrada 25x tiene que ser diluida con agua grado EIA y mezclada cuidadosamente antes de su uso.

Ejemplo: Agregue 50 mL de solución para lavado a 25x en 1200 mL de agua desionizada.

Tal vez se presenten algunos cristales de sal en el vial; tenga cuidado de disolver todo el contenido durante la preparación de la solución.

En la preparación evite la formación de espuma ya que las burbujas podrían dar origen a un mal lavado.

Una vez diluido, la solución de lavado es estable hasta 6 días cuando se guarda a +2...8°C.

I. INSTRUMENTOS Y HERRAMIENTAS UTILIZADOS CON EL KIT

1. Las micropipetas deben estar calibradas para proporcionar el volumen correcto requerido por el ensayo y tienen que ser sometidas regularmente a un proceso de descontaminación (alcohol doméstico al 10%, solución de lejía, desinfectantes grado hospital) a aquellas partes de la pipeta que puedan entrar accidentalmente en contacto con la muestra. También deberían ser regularmente sometidas a mantenimiento. También se debe ejecutar con regularidad la descontaminación de derramamientos o residuos en los componentes del equipo. El mantenimiento debe ser regular de manera tal que la precisión en los resultados sea del 1% y una veracidad del $\pm 2\%$.
2. La temperatura del incubador ELISA debe fijarse a +37°C (tolerancia de $\pm 0.5\%$ °C) y regularmente se debe estar revisando para asegurarse que la temperatura correcta se está manteniendo. Tanto el incubador como los baños de agua son adecuados para la incubación de las pruebas ELISA.
3. El lavador de ELISA es extremadamente importante para el desarrollo de toda la prueba en general. El lavador tiene que ser cuidadosamente validado y correctamente optimizado utilizando los controles del equipo y los paneles de referencia, antes de usar el equipo para los exámenes de laboratorio rutinarios.

5-3-5 ciclos de lavado (aspiración + dispensación de 400 µL/pocillo de solución de lavado = 1 ciclo) son suficientes para asegurarse que el comportamiento del ensayo salga según lo esperado. Para establecer sus ajustes correctamente, se recomienda ejecutar una prueba con los controles del equipo y muestras de referencia que estén bien identificadas como negativa y positiva. Verifique los valores reportados abajo en la sección "Control de Calidad Interno". De

acuerdo a las instrucciones del fabricante se debe llevar a cabo una calibración regular del lavador, de los volúmenes dispensados y su mantenimiento. (descontaminación y limpieza de las agujas).

4. El tiempo de incubación tiene una tolerancia de $\pm 5\%$ (o para la primera incubación la tolerancia va de 57 minutos a 63 minutos, para la 2^a, 3^a y 4^a incubación la tolerancia ronda entre 29 y 31 minutos).
5. El lector de ELISA tiene que estar equipado con un filtro de lectura de 450nm y de manera ideal con un segundo filtro (600-650nm) en caso de que sea necesario un blanco. Su comportamiento estándar debería ser (a) ancho de banda $\leq 10\text{nm}$; (b) rango de absorbancia de 0 a ≥ 2.0 (c) linealidad a ≥ 2.0 ; fiabilidad $\geq 1\%$. El blanco es llevado a cabo en el pocillo identificado en la sección "Procedimiento del Ensayo". El sistema óptico del lector tiene que ser calibrado regularmente para asegurarse que la densidad óptica obtenida es correcta. El mantenimiento se debe hacer regularmente de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

L. CONTROLES Y OPERACIONES PREVIOS AL ENSAYO

1. Revise la fecha de caducidad del kit impresa en la etiqueta externa. No use el kit si la fecha ha expirado.
2. Revise que los componentes líquidos no estén contaminados con partículas visibles o agregadas. Observe que el sustrato no tenga color o un color azul muy pálido. Esto lo puede hacer simplemente aspirando una pequeña cantidad con una pipeta plástica estéril. Asegúrese que no haya sufrido un daño durante su transporte y que no haya derramamientos de líquido en la caja. También revise la bolsa de aluminio que contiene la microplaca para que no esté golpeada o dañada.
3. Diluya el Conjugado # 2 como se describe arriba.
4. Diluya el contenido del Tampón de lavado concentrado 25x como se describe arriba.
5. Deje que todos los otros componentes alcancen la temperatura ambiente (aproximadamente 1 hora) y entonces mezcle suavemente con el Vortex todos los reactivos líquidos como se describe.
6. Ajuste el incubador ELISA a $+37^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ y prepare el lavador de ELISA purgándolo con la solución de lavado diluida tal como indica el fabricante. Establezca el número correcto de ciclos tal como se halló en la validación del instrumento para su uso con el equipo.
7. Revise que el lector ELISA esté encendido o asegúrese que este va a estar encendido al menos 20 minutos antes de la lectura.
8. Si está usando un equipo automatizado, enciéndalo, revise que su configuración sea la correcta para el protocolo del ensayo.
9. Revise que las micropipetas sean las correctas para el volumen que se va a manejar.
10. Verifique que el resto del equipo está disponible y listo para su uso.
11. En caso de problemas, no prosiga con la prueba y avise a su supervisor.

M. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO (Manual)

El ensayo tiene que ser llevado a cabo de acuerdo a lo que se establece más abajo, teniendo cuidado de mantener el mismo tiempo de incubación para todas las muestras de la prueba.

1. Ponga el número necesario de pocillos en el marco de la microplaca. Deje el primer pocillo vacío para la operación de blanco (opcional).
2. Dispense 100 μL de Diluyente de Muestras a cada pocillo excepto al pocillo de blanco.
3. Agregue 100 μL de muestra. Agregue 100 μL de Controles Positivo y Negativo por duplicado. Aspirar y expirar hacia arriba y hacia abajo para homogenizar.
Pipetee suavemente para evitar derramamientos y que se contaminen los pocillos adyacentes.
Selle las tiras con la lámina adhesiva.
4. Incube la microplaca durante **60 minutos a $+37^{\circ}\text{C}$** .
5. Después de la incubación, elimine la solución de los pocillos invirtiendo la microplaca y golpeándola contra una toalla de papel absorbente. Lave la placa de microtitulación 5 ciclos de acuerdo al procedimiento de lavado (capítulo I.3).
6. Agregue 200 μL de Conjugado # 1 dentro de cada pocillo, excepto el primero que es para blanco, y cubra con la lámina adhesiva.

Nota Importante: Sea cuidadoso de no tocar el plástico interior de los pocillos con la punta llena de Conjugado. Podría ocurrir una contaminación.

7. Incube la microplaca durante **30 minutos a $+37^{\circ}\text{C}$** .
8. Después de la incubación, elimine la solución de los pocillos invirtiendo la microplaca y golpeándola contra una toalla de papel absorbente. Lave la placa de microtitulación 3 ciclos de acuerdo al procedimiento de lavado (capítulo I.3).
9. Dispense 200 μL de Conjugado # 2 diluido en cada pocillo, excepto el primero que es para blanco y cúbralos con la lámina adhesiva.
Nota Importante: Sea cuidadoso de no tocar el plástico interior de los pocillos con la punta llena de Conjugado. Podría ocurrir una contaminación.
10. Incube la microplaca durante **30 minutos a $+37^{\circ}\text{C}$** .
11. Después de la incubación, remueva la solución de los pocillos invirtiendo la microplaca y golpeándola contra una toalla de papel absorbente. Lave la placa de microtitulación 5 ciclos de acuerdo al procedimiento de lavado (capítulo I.3).
12. Dispense 150 μL de Sustrato TMB dentro de cada pocillo incluyendo el de blanco.
13. Incube la microplaca durante **30 minutos a $+18...25^{\circ}\text{C}$** .

Nota Importante: No exponga directamente a una fuerte iluminación. Se podría generar un ruido de fondo alto.

14. Dispense 100 μL de Solución de Parada en los pocillos usando la misma frecuencia de pipeteo que en el paso 12 para detener la reacción enzimática. La adición de ácido cambiará el control positivo y las maestra positivas de azul a amarillo.
15. Mida la intensidad del color de la solución en cada pocillo como está descrito en el procedimiento de lectura a 450nm filtro (lectura) y si es posible a 600-650nm (substracción de fondo), realizando el blanco del instrumento en A1.

La lectura tiene que ser hecha justo después de la adición de Solución de Parada y de cualquier forma no más allá de 30 minutos después de la adición. Es posible que se presente alguna auto-oxidación del cromógeno que ocasione un ruido de fondo alto.

Notas Importantes:

1. Si el segundo filtro no está disponible, asegúrese que no hay huellas dactilares en el fondo del pocillo antes de la lectura a 450nm. Las huellas dactilares pueden generar resultados falsos positivos en la lectura.
2. Idealmente la lectura debería hacerse inmediatamente después de adicionar la Solución de Parada pero definitivamente no más allá de 20 minutos después. Es posible que se presente alguna auto-oxidación del cromógeno que ocasione un ruido de fondo alto.

N. ESQUEMA DEL ENSAYO

PASO	PROCEDIMIENTO
Muestra	Añadir 100 µL de Diluyente de muestras. Añadir 100 µL de muestra/control al diluyente y pipetee arriba y abajo para mezclar. Dispense los Controles Positivo y Negativo por duplicado. Incube 60 minutos a 37°C.
Lavado	Realice el paso de lavado 5x.
Conjugado 1	Añadir 200 µL de Conjugado 1 listo para usar a los pocillos de la placa de microtitulación. Incube durante 30 minutos a 37°C.
Lavado	Realice el paso de lavado 3x.
Conjugado 2	Añadir 200 µL de Conjugado 2 a los pocillos de la placa de microtitulación. Incube durante 30 minutos a 37°C.
Lavado	Realice el paso de lavado 5x.
Sustrato TMB	Añadir 150µL de Sustrato TMB a los pocillos de la placa de microtitulación.
Desarrollo de Color	Incube 30 minutos a +18...25°C.
Parada	Añadir 100 µL de Solución de Parada y leer la OD a 450nm con referencia de longitud de onda a 600-650nm en un lector ELISA

Un ejemplo de esquema de dispensación está reportado en la tabla de abajo:

Microplaca

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	PC3	S8									
B	NC	S1	S9									
C	NC	S2										
D	PC1	S3										
E	PC1	S4										
F	PC2	S5										
G	PC2	S6										
H	PC3	S7										

Leyenda: BLK = Blanco NC = Control Negativo
 PC1 = Control Positivo HIV-1 PC3 = Control Positivo HIV p-24
 PC2 = Control Positivo HIV-2 S = Muestra

O. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

Siempre se ha de realizar una revisión de los controles y/o calibradores para verificar que los valores esperados de Densidad Optica a 450 nm se han cumplido en el ensayo.

Asegúrese que los siguientes parámetros se hayan cumplido:

Comprobar	Requerimiento
Blanco	< 0.100 OD 450nm
Control Negativo (NC)	OD media 450nm después de restar blanco < 0.100
Control Positivo HIV-1	> 0.500 OD 450nm
Control Positivo HIV-2	> 0.500 OD 450nm
Control Positivo HIV p-24	> 0.500 OD 450nm

Si los resultados del examen concuerdan con los requerimientos establecidos arriba, siga con la siguiente sección.

Si los resultados no concuerdan, no prosiga y aplique las siguientes revisiones:

Problema	Comprobar
Blanco > 0.100 OD450nm	1. que la Solución de Sustrato no se haya contaminado durante el ensayo.
Control Negativo (NC) >0.100 OD450nm Después de restar el blanco	1. que el procedimiento de lavado y la configuración del lavador estén validados en el estudio de pre-calificación; 2. que se haya usado la solución de lavado correcta y que el lavador haya sido purgado con la misma antes de usar; 3. que no se haya cometido ningún error en el procedimiento del ensayo (dispensación de un control positivo en vez de un control negativo); 4. que no se haya presentado contaminación del Control Negativo o de los pocillos donde se dispensó el control debido a derrames de muestras positivas o conjugado enzimático; 5. que las micropipetas no se contaminen con muestras positivas o conjugado enzimático; 6. Que las puntas del lavador no estén bloqueadas o parcialmente obstruidas.
Controles Positivos < 0.500 OD450nm	1. que el ensayo haya sido ejecutado correctamente; 2. que no hayan ocurrido errores durante la distribución del control (dispensar control negativo en vez de control positivo); 3. que el procedimiento de lavado y la configuración del lavador estén validados en el estudio de pre-calificación; 4. que no haya ocurrido una contaminación externa del Control Positivo.

Si alguno de los problemas arriba mencionados ha ocurrido, reportar el problema al supervisor para que se tomen las medidas correctivas.

P. CÁLCULO DE RESULTADOS

P.1. Validación

En cada ensayo se deben incluir dos Controles Negativos (NC), dos Controles Positivos (PC1) HIV-1, dos Controles Positivos (PC2) HIV-2 y dos Controles p24 (PC3) HIV-1. Los resultados de los controles deberían estar dentro del criterio de aceptación antes de que cualquier resultado de muestras pueda ser interpretado.

Cálculo de la Media del Control Negativo NC_{MEDIA}:

Ejemplo:

Absorbancia NC

0.021

0.025

0.046

$$NC_{MEDIA} = 0.046 / 2 = 0.023$$

La media de la absorbancia de los Controles Negativos, después de restar el blanco, tiene que ser menos de 0.100. Si el valor de la media es mayor o igual a 0.100, el ensayo se debe repetir.

Cálculo de la Media del Control Positivo HIV-1 PC_{MEDIA}:

Ejemplo:

Absorbancia PC HIV-1

1.545

1.239

2.784

$$HIV1- PC_{MEDIA} = 2.784 / 2 = 1.392$$

La media de la absorbancia del Control Positivo HIV-1 debe ser mayor que 0.500. Si el valor es menor o igual a 0.500, el ensayo se debe repetir.

Cálculo de la Media del Control Positivo HIV-2 PC_{MEDIA}:

Ejemplo:

Absorbancia HIV2-PC

1.459

1.343

2.802

$$HIV2-PC_{MEDIA} = 2.802 / 2 = 1.401$$

La media de absorbancia para el Control Positivo HIV-2 tiene que ser mayor que 0.500. Si el valor de la media es menor o igual a 0.500, el ensayo se debe repetir.

El cálculo de la Media del Control Positivo p24 HIV-1 p24PC_{MEDIA}:

Ejemplo:

Absorbancia HIV-1 p24PC

2.223

2.172

4.395

$$HIV-1 p24PC_{MEDIA} = 4.395 / 2 = 2.198$$

La media de absorbancia para el Control Positivo HIV-1 p24 tiene que ser mayor que 0.500. Si el valor de la media es menor o igual a 0.500, el ensayo se debe repetir.

P.2. Cálculo del valor umbral

Los resultados de la prueba son calculados por medio del valor de corte que se determina con la siguiente fórmula basada en la media OD_{450nm} del Control Negativo (NC) - OD_{450nm} Blanco:

$$(NC_{Media} - \text{blanco}) + 0.170 = \text{Valor Umbral (Cut-Off)}$$

El valor encontrado para la prueba es usado para la interpretación de los resultados como está descrito en el siguiente párrafo.

Nota importante: Cuando el cálculo de los resultados se realiza por el sistema operativo de un sistema automático ELISA, asegúrese de que está usando la correcta fórmula para calcular el valor umbral y generar la correcta interpretación de los resultados.

Q. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

1. Las muestras con valores de absorbancia menores al valor umbral son consideradas no reactivas bajo el criterio de este inmuno-ensayo, y podrían ser consideradas negativas para anticuerpos de HIV-1+2 y HIV-1 p24. Pruebas adicionales no son necesarias.
2. Aquellas muestras con valores de absorbancia igual a o mayores que el valor umbral, son consideradas reactivas o positivas para anticuerpos HIV-1 y/o HIV-2 o HIV-1 p24. Estas muestras (usando la muestra original) deberían ser re-examinadas por duplicado antes de confirmar el resultado final.
3. Las muestras inicialmente reactivas, que no reaccionan en cualquiera de los duplicados de pruebas repetidas, son consideradas negativas para anticuerpos de HIV1+2 y HIV p24. Exámenes adicionales no son necesarios.
4. Si uno de los dos valores re-examinados es igual o mayor que el valor umbral, la muestra es considerada repetidamente reactiva. La muestras que han sido encontradas repetidamente reactivas son interpretadas como positivas para la presencia de anticuerpos para HIV-1 y/o HIV-2 o HIV-1 p24. En la mayoría de los casos es mejor investigar muestras repetidamente reactivas con pruebas adicionales más específicas.

Notas importantes:

1. La interpretación de los resultados debería ser hecha bajo la supervisión del responsable del laboratorio para reducir el riesgo de errores de juicio y malas interpretaciones.
2. Las muestras que son repetidamente reactivas deberían ser sometidas a un Ensayo de Confirmación antes de entregar un resultado positivo por infección de HIV.
3. Cuando el resultado de la prueba es transmitido del laboratorio al centro informático, se debe prestar especial atención para evitar error en la transferencia de datos.

4. El diagnóstico de HIV tiene que ser hecho y comunicado al paciente a través de un médico cualificado.

R. CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES

La Evaluación del Comportamiento se tiene que llevar a cabo de acuerdo a lo que está reportado en las Especificaciones Técnicas Comunes (CTS) y como está requerido por el art. 5, Capítulo 3 de la IVD Directiva 98/79/EC. La Evaluación de Desempeño fue llevada a cabo en dos centros externos.

R.1. ESPECIFICIDAD Y SENSIBILIDAD

R.1.1 Especificidad

La especificidad evaluada en:

- ❖ 5014 donantes de sangre Europeos no seleccionados de dos centros incluyendo 40 muestras de donantes por primera vez
- ❖ 201 Pacientes hospitalizados
- ❖ 116 Muestras potencialmente conflictivas:
 - ✓ 27 Muestras de mujeres embarazadas (5 monopar y 17 múltipar y 4 desconocidos)
 - ✓ 27 Muestras positivas de Factor Reumatoide (RF)
 - ✓ 25 Muestras hemolizadas incluyendo las fuertemente hemolizadas
 - ✓ 27 con otras infecciones (4 HBV, 5 EBV, 5 HCV, 4 HSV, 5 Rubéola, 4 Toxoplasmosis).
 - ✓ 5 Muestras Hiperbilirrubinemia.
 - ✓ 5 Muestras Hiperlipidemia.
- ❖ 50 Muestras [25 Positivas (HIV-1, HIV-2 y HIV-1 p24) y 25 muestras Negativas] han sido examinadas y no se ha observado diferencia alguna debido al método utilizado en la preparación de la muestra (plasmasuero, citrato, EDTA y Heparina)

De los 5014 donantes Europeos no seleccionados, 19 (diecinueve) muestras fueron inicialmente reactivas (IR) y examinadas por duplicado. Esto resultó en 17 (diecisiete) muestras Repetidamente Reactivas (RR). Estas muestras fueron examinadas con una prueba confirmatoria. Una muestra permaneció indeterminada.

Estatus Actual	Resultados de la Prueba			
	IR	RR	NEG	Total
Negativo	18	16	4997	5013
Positivo	0	0	0	0
Inderterminado	1	1	0	1
Total	19	17	4997	5014

Se ha encontrado una especificidad final del 99.7%.

R.1.2 Sensibilidad Analítica (Límite de Detección)

La sensibilidad analítica fue determinada mediante los estándares internacionales de WHO para Antígenos HIV-1 p24, First International Reference Reagent, NIBSC código 90/636.

Se preparó una dilución dentro de una matriz negativa (0.1-10 IU/mL). Esta dilución fue probada en tres series de pruebas diferentes (tres microplacas) en dos pruebas (dos días). Para cada serie individual, se preparó una nueva dilución.

El resumen de los resultados se muestra en la siguiente Tabla:

Ensayo	1	2	3
HIV-1 p24 (IU/mL)	OD/CO		
10	11.9	12.6	12.3
5	8.0	10.7	9.8
2.5	4.3	6.2	5.7
1	1.8	2.8	2.6
0.5	1.0	1.6	1.4
0.25	0.6	1.0	0.8
0.1	0.4	0.5	0.5
0	0.2	0.3	0.3

El límite de la sensibilidad ha sido estimado en <1.0 IU/mL.

R.1.3 Sensibilidad Diagnóstica

El diagnóstico de sensibilidad de EI Agen Detect HIV 4 Total Screening Kit se basó en la prueba de un panel con 500 muestras positivas de HIV 1/2, 31 paneles de seroconversión (suministrados por BBI-Seracare/ZeptoMetrix) y 40 muestras de seroconversión temprana.

En detalle:

- ❖ 500 Muestras positivas (400 HIV-1 y 100 HIV-2 incluyendo subtipos A, B, C, D, F, G, H, J, K, CRF);
- ❖ 50 Cultivos de células sobrenadantes incluyendo diferentes subtipos de HIV-1 (grupo M subtipo A a la K, CRF01_AE, CRF02_AG, grupo N, grupo O) and HIV-2;
- ❖ 50 HIV-1 p24 Muestras Antígeno Positivo
- ❖ 31 Paneles de seroconversión (ver tabla siguiente)

Panel Seroconversión	Adaltis EI Agen	Ensayo de 4 ^a gen.	Ensayo de 3 ^a gen.	Antígeno HIV -1 p24	NAT
	Primera muestra detectada positiva en el panel				
Y-PRB925	5		5	5	5
AB/PRB927	2	2	2	2	2
AC/PRB928	2	2	2	2	2
AD/PRB929	3	3	6	3	3
AE PRB930	1		3	1	1
PRB933	2	2	2	2	2
PRB934	1	1	1	1	1
AP/PRB940	1	2	3	2	1
AQ/PRB941	3	4	4	3	2
AS/PRB943	3	3	6	3	2
AU PRB945	3		4	3	1
AW/PRB947	2	2	2	2	1
AX PRB948	3	4	4+	3	3
AZPRB950	2		4	2	2
BA PRB 951	3	3	5	3	3
PRB952	3	3	4	3	2
BE/PRB955	2	2	4	2	1
BF PRB 956	4	4	5	4	2
BI/PRB959	1	1	3	1	1
PRB960	7	8	9+	8	8
PRB962	5	5	6+	5	3
PRB963	6	6	7	6	5
PRB964	6+	6	ND	6	4
PRB965	4	2	4	2	1
PRB967	4	4	4	4	2
PRB968	7	7	7	7	5
6240	7	8	9	8	6
9028	6	6	ND	6	6
9077	12	12	14	12	12
9079	9	9	11	9	8
12007	4	4	5	ND	4

- ❖ 42 Muestras de Seroconversión tempranas (positivas para HIV-1 antígeno core de p24 y anticuerpos HIV están ausentes o débilmente presentes y resultados indeterminados en la prueba Western Blot).

La sensibilidad final encontrada es del 100%.

R.2. PRECISIÓN

La precisión del ensayo ha sido evaluada determinando sus valores Intra-ensayo e Inter-ensayo. En las tablas siguientes se reportan los resultados para una muestras Negativas y para una muestras Positivas.

R.2.1 Resultados Intra lote:

EIAgen Detect HIV 4 Total Screening código: 081311

1^{er} Lote

Muestra	S/Co Media	Precisión - %CV		
		Intra Ensayo	Inter Ensayo	Total
Negativo	0.37	23.2	4.5	23.6
Pos A-HIV 1	1.80	10.6	9.4	14.1
Pos A-HIV 2	1.91	10.7	7.7	13.1
Pos HIV-1 p24	2.14	10.9	4.6	11.8

EIAgen Detect HIV 4 Total Screening código:081311

2^{ndo} Lote

Muestra	S/Co Media	Precisión - %CV		
		Intra Ensayo	Inter Ensayo	Total
Negativo	0.40	12.6	10.8	16.6
Pos A-HIV 1	1.47	6.9	7.4	10.3
Pos A-HIV 2	1.53	7.6	8.1	11.1
Pos HIV-1 p24	1.78	4.6	4.9	6.7

EIAgen Detect HIV 4 Total Screening código: 081311

3^{er} Lote

Muestra	S/Co Media	Precisión - %CV		
		Intra Ensayo	Inter Ensayo	Total
Negativo	0.52	18.7	5.4	19.5
Pos A-HIV 1	1.65	8.6	4.6	9.8
Pos A-HIV 2	1.78	9.7	4.9	10.9
Pos HIV-1 p24	2.05	7.4	4.6	8.7

EIAgen Detect HIV 4 Total Screening código: 081311

4^{to} Lote

Muestra	S/Co Media	Precisión - %CV		
		Intra Ensayo	Inter Ensayo	Total
Negativo	0.58	19.6	3.0	19.8
Pos A-HIV 1	1.59	9.4	1.4	9.5
Pos A-HIV 2	1.66	11.4	2.64	11.7
Pos HIV-1 p24	2.17	9.1	2.0	9.3

R.2.2 Resultados Inter Lote:

Muestra	S/Co Media	Precisión - %CV	
		Inter Ensayo	Total
Negativo	0.48	18.4	26.5
Pos A-HIV 1	1.63	9.7	13.3
Pos A-HIV 2	1.72	9.9	14.2
Pos HIV-1 p24	2.03	8.6	12.1

R.2.3 Especificaciones:

Intra Lote:

Intra ensayo:

%CV en muestras positivas < 15%

%CV en muestras negativas < 25%

Inter ensayo:

%CV en muestras positivas < 15%

%CV en muestras negativas < 25%

Inter Lote:

%CV en muestras positivas < 15%

%CV en muestras negativas < 25%

Precisión Total:

%CV en muestras positivas < 20%

%CV en muestras negativas < 30%

S. SUGERENCIAS PARA RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Respetar las especificaciones y el procedimiento del ensayo así como usar también los reactivos correctamente y el correcto pipeteo, puede ayudar a evitar los siguientes tipos de errores:

ERROR	POSIBLES CAUSAS / SUGERENCIAS
OD muy diferente ($\pm 50\%$) del OD reportado en el CC	<ul style="list-style-type: none"> -dispensar el volumen incorrecto de reactivo (sugerencia: revise que correspondan el volumen dispensado por la pipeta y el requerido por el ensayo; Recalibre nuevamente las pipetas). -temperatura incorrecta o tiempo de incubación incorrecto (sugerencia: tenga más cuidado en el mantenimiento del incubador; anote el comienzo de la incubación) -error en el lavado o en la lectura del fotómetro (sugerencia: revise la operación o la configuración de los respectivos instrumentos). -contaminación del Sustrato o del Conjugado (sugerencia: utilice solamente contenedores desechables plásticos y limpios).

ERROR	POSIBLES CAUSAS / SUGERENCIAS
baja precisión en los resultados	-no dispensar un volumen constante de reactivos o de muestras (sugerencia: revise la precisión de las pipetas y que el volumen dispensado por la pipeta corresponda al indicado por el ensayo; recalibre nuevamente las pipetas). -error en el lavado o en la lectura (sugerencia: revise la operación o la configuración de los respectivos instrumentos). -error en el lavado o en la lectura del fotómetro (sugerencia: revise la operación o la configuración de los respectivos instrumentos). -contaminación del Sustrato (sugerencia: utilice solamente contenedores desechables plásticos y limpios). -polución o degradación de los reactivos (sugerencia: use las puntas apropiadas, contenedores desechables plásticos y limpios para reactivos y agua destilada de alta calidad o su equivalente).
sin reacción colorimétrica después de la adición de sustrato	-algunos reactivos no pipeteados. -fuerte contaminación en los reactivos o el sustrato. -error ejecutando el procedimiento del ensayo (ej. Pipetear los reactivos en la secuencia equivocada o desde el tubo equivocado, etc.).
reacción muy baja (ODs muy bajos)	-tiempo de incubación muy corto, temperatura de incubación muy baja. -dilución incorrecta del conjugado.
reacción muy alta (ODs muy altos)	-dilución incorrecta del conjugado. -tiempo de incubación muy largo, temperatura de incubación muy alta. -calidad del agua insuficiente para el tampón de lavado (bajo grado de desionización). -lavado insuficiente (el conjugado no ha sido eliminado correctamente).
valores atípicos inexplicables	-contaminación de pipetas, puntas o contenedores. -lavado inconstante e insuficientes (el conjugado no ha sido eliminado correctamente).
CV% muy alto dentro del ensayo	-reactivos y/o tiras no pre-calentados a temperatura ambiente antes de su uso. -el lavador no está lavando correctamente (sugerencia: limpiar el cabezal de lavado).
CV% muy alto entre ensayos	-las condiciones de incubación no son constantes (tiempo, temperatura). -controles y muestras no dispensadas al mismo tiempo (con los mismos intervalos)(revise el orden del pipeteo). -variación relacionada con el personal.

T. AUTOMATIZACIÓN

El procedimiento descrito en estas instrucciones de uso es para pruebas manuales solamente. Cuando utilice instrumentos automatizados, siga los procedimientos que están contenidos en el manual del operador suministrado por el fabricante. Los laboratorios tienen que seguir sus procedimientos aprobados de validación para demostrar la compatibilidad de este producto en sistemas automatizados.

U. LIMITACIONES


- Advertimos que el usuario de este kit debe leer cuidadosamente las instrucciones para su uso y entenderlas completamente. Es necesario seguir estrictamente el protocolo para obtener resultados fiables de las pruebas. En particular, es esencial un correcto muestreo y pipeteo del reactivo, al igual que un cuidadoso lavado y sincronización del tiempo de incubación para que una fiable y exacta detección de anticuerpos HIV-1 y HIV-2 y antígenos p24.
- Si es posible use muestras frescas de suero o plasma. Muestras degradadas al igual que múltiples ciclos de congelado y descongelado pueden causar resultados erróneos. **No use muestras inactivadas por calor.**
- Con el uso de un ensayo de esta naturaleza se pueden esperar resultados falsamente reactivos. La proporción de reactivos dependerá en la sensibilidad y especificidad del kit utilizado y en la prevalencia de anticuerpos HIV-1 y HIV-2 en la población que va a ser examinada.
- Después de usar EIAGEN Detect HIV 4 Total Screening Kit, las muestras que sean repetidamente reactivas deben ser sometidas a exámenes adicionales usando el Western Blot (WB), Ensayo Inmunofluorescente Indirecto (IFA) o Ensayo Radioinmunoprecipitación (RIPA). La determinación de que las muestras de una persona contienen anticuerpos para HIV y/o antígenos HIV tiene implicaciones que van desde las médicas hasta las sociales, psicológicas y económicas. Se recomienda como parte de la secuencia de información de la prueba, asesoría apropiada y evaluación médica.
- SIDA y las condiciones relacionadas al SIDA son enfermedades clínicas y su diagnóstico solo puede ser establecida clínicamente. El examen EIA por sí solo no puede ser usado para diagnosticar SIDA. Un resultado no reactivo en cualquier punto de la secuencia de la prueba no excluye la posibilidad de exposición al HIV o su infección. El riesgo de una persona asintomática, quién es repetidamente reactiva, de desarrollar SIDA y/o condiciones relacionadas al SIDA, no es conocido.
- El resultado de la prueba debería ser usado en conjunción con todos los otros datos clínicos y de diagnóstico.
- Los anticuerpos para HIV se pueden presentar debido a la participación voluntaria en un estudio para hallar una vacuna contra el SIDA. La interpretación de esta prueba de diagnóstico depende del tipo de vacuna que se haya suministrado. Correlación con la historia médica y pruebas adicionales podría ser necesario para diagnosticar con exactitud los voluntarios en la búsqueda de una vacuna contra el SIDA.


BIBLIOGRAFIA


1. Alizon, M., Sonigo, P., Barré-Sinoussi, F., Chermann, J.-C., Tiollais, P., Montagnier, L. and Wain-Hobson, S., 1984. Molecular Cloning of Lymphadenopathy-Associated Virus. *Nature* 312:757-760.
2. Barré-Sinoussi, F., Chermann, J.-C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Daugey, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbrum, W. and Montagnier, L. 1983. Isolation of a T-lymphotropic Retrovirus from a Patient at Risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). *Science* 220:868-871.
3. Clavel, F., Mansinho, K., Chamaret, S. et al. 1987. Human Immunodeficiency Virus Type 2 Infection Associated with AIDS in West Africa. *N. Engl. J. Med.* 316:1180-1185.
4. Gallo, R.C., Salahuddin, S.Z., Popovic, M., Shearer, G.M., Kaplan, M., Haynes, B.F., Palker, T.J., Redfield, R., Oleske, J., Safal, B., White, G., Foster, P. and Markham, P.D. 1984. Frequent Detection and Isolation of Cytopathic Retroviruses (HTLV-III) from Patients with AIDS and at Risk for AIDS. *Science* 224:500-503.
5. Gold, J. and Dwyer, J., 1994. A Short History of AIDS. *Med. J. Aust.* 160:251-252.
6. Hahn, B.N., Shaw, G.M., Arya, S.K., Popovic, M., Gallo, R.C. and Wong-Staal, F., 1984. Molecular Cloning and Characterization of the HTLV-III Virus Associated with AIDS. *Nature* 312:166-169.
7. IVD Directive 98/79/CE, Common Technical Specifications (CTS) – Annex II, List A.
8. Lin, H.J. 1995. Laboratory Tests for Human Immunodeficiency Viruses. *J. Int. Fed. Clin. Chem.* 7:61-65.
9. Luciw, P.A., Potter, S.J., Steimer, K., Dina, D. and Levy, J.A., 1984. Molecular Cloning of AIDS-Associated Retrovirus. *Nature* 312:760-763.
10. Ly, T.D., Laperche, S., Brennan, C., Vallari, A., Ebel, A., Hunt, J., Martin, L., Daghfal, D., Schochetman, G. And Devare, S. 2004. Evaluation of the sensitivity and specificity of six HIV combined p24 antigen and antibody assays. *J. Virol. Meth.* 122: 185-194.
11. Popovic, M., Sarngadharan, M.G, Read, E., and Gallo, R.C., 1984. Detection, Isolation, and Continuous Production of Cytopathic Retrovirus (HTLV-III) from Patient with AIDS and Pre-AIDS. *Science* 224:497-500.
12. Sarngadharan, M.G., Popovic, M., Bruch, L., Schüpbach, J. and Gallo, R.C., 1984. Antibodies Reactive with Human T-Lymphotropic Retroviruses (HTLV-III) in the Serum of Patients with AIDS. *Science* 224:506-508.
13. Saville, R.D., Constantine, N.T., Cleghorn, F.R., Jack, N., Bartholomew, C., Edwards, J., Gomez, P. and Blattner, W.A. 2001. Fourth-generation enzyme-linked immunosorbent assay for the simultaneous detection of human immunodeficiency virus antigen and antibody. *J. Clin. Microbiol.* 39 (7): 2518-2524.
14. Sehulster, L.M., Hollinger, F.B., Dreesman, G.R. and Melnick, J.L., 1981. Immunological and Biophysical Alteration of Hepatitis B Virus Antigens by Sodium Hypochlorite Disinfection, *App. and Environ. Microbiol.* 42:762-767.
15. Sinicco, A., For a, R., Scalandra, M., Lucchini, A., Caramello, P. and Giovanni, P. 1993. Risk of Developing AIDS after Primary Acute HIV-1 Infection. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 6:575-581.
16. Spire, B., Montagnier, L., Barré-Sinoussi, F. and Chermann, J.-C., 1984. Inactivation of Lymphadenopathy Associated Virus by Chemical Disinfectants. *Lancet*: 889-901, Oct. 20.
17. Vézinet-Brun, F., Barré-Sinoussi, F., Salmot, A.G., Christol, D. Montagnier, L., Rouzioux, C., Klatzmann, D., Rozenbaum, W., Gluckmann, J.C. and Chermann, J.-C., 1984. Detection of IgG Antibodies to Lymphadenopathy-Associated Virus in Patients with AIDS or Lymphadenopathy Syndrome. *Lancet*: 1253-1256, June 9.
18. Weber, B., Thorstensson, R., Tanprasert, S., Schmitt, U. And Melchior, W. 2003. Reduction of the diagnostic window in three cases of human immunodeficiency-1 subtype E primary infection with fourth-generation HIV screening assays. *Vox Sanguinis* 85: 73-79.
19. World Health Organization. 2004. HIV assays: operational characteristics (Phase 1): report 15 antigen/antibody ELISAs. www.who.int/diagnostics_laboratory/publications/en/HIV_Report15.pdf.

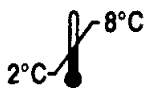
EIAgen

Detect HIV 4 Total Screening Kit

REF 081311  96

REF 081312  192

REF 081315  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

fr

SYMBOLES UTILISÉS SUR LES ÉTIQUETTES

Français FR							
	Trousse Médicale Diagnostique in Vitro	Code de Catalogue	Numéro de Lot	Attention : lire le mode d'emploi	Limites de Température	Date d'Expiration	Nombre de Tests
					MICROPLATE	DIL SPE	CONTROL -
	Fabriqué par	Ne pas Exposer à la Lumière	Risques Biologiques	Date de Fabrication	Microplaque	Diluant pour Échantillon	Contrôle Négatif
	CONTROL+ HIV-1	CONTROL+ HIV-2	CONTROL+ HIV p-24	CONJ 1			
	Contrôle Positif HIV-1	Contrôle Positif HIV-2	Contrôle Positif HIV p-24	Conjugué # 1			
	CONJ 2 100X	CONJ 2 DIL	SUBS TMB	SOLN STOP	WASH BUF 25X		
	Conjugué # 2 Concentré 100x	Diluant pour Conjugué # 2	Substrat TMB	Solution d'Arrêt	Solution de Lavage Concentré 25x		

A. UTILISATION

Le EIAGEN Detect HIV 4 Total Screening Kit est une 4^{ème} génération phase solide dosage immuno-enzymatique utilisant un mélange d'antigènes et des anticorps pour le dépistage de diagnostic in vitro dans le sérum humain ou de plasma (EDTA, héparine et Citrate) des anticorps au HIV-1, HIV-2 et l'antigène p24 du HIV-1.

Ce kit est un dosage combiné Ag/Ab et ne doit pas être utilisée pour la détection du HIV-1 de l'antigène p24 seul. Ce kit est à usage diagnostique in vitro par un professionnel de la santé et ne sera pas vendue au grand public.

B. INTRODUCTION

Le syndrome d'immunodéficience acquise (AIDS) est un ensemble de symptômes résultant de la neutralisation du système immunitaire humain causée par le virus de l'immunodéficience humaine (HIV). L'infection par le HIV peut évoluer vers une phase symptomatique qui est caractérisé par des infections opportunistes et qui peut causer la mort.

L'agent étiologique du AIDS, le HIV, ciblant des types spécifiques de cellules T provoquant une lymphopénie et une incidence sur l'immunité à médiation cellulaire T. Le HIV est un membre d'une famille de rétrovirus avec deux sous-familles: HIV-1 et HIV-2. HIV-1 est plus virulent et transmissible que le HIV-2. HIV-1 est la cause des infections à HIV dans le monde, alors que le HIV-2 se trouve principalement dans les pays d'Afrique de l'Ouest. Comme réaction croisée sérologique entre le HIV-1 et HIV-2 est très variable et dépend de l'échantillon testé, les antigènes pour la détection spécifique de fois par le HIV-1 et HIV-2 sont inclus dans l'essai.

Le HIV se transmet par contact sexuel avec des personnes infectées, le partage d'aiguilles et de seringues avec des personnes infectées et la transfusion de sang contaminé. Immuno-enzymatique dosages (comme le EIAGEN Detect HIV 4 Total Screening Kit ELISA 4^{ème} génération) sont recommandés pour le dépistage du sang et du plasma humains pour la présence d'anticorps anti-HIV et le HIV-1 antigène p24. La présence d'anticorps anti-HIV-1 et/ou anti-HIV-2 dans le sang indique une infection potentielle par le HIV-1 et/ou HIV-2 et, par conséquent cette sang doit pas être utilisé pour la transfusion ou pour la fabrication de produits injectables.

C. PRINCIPE DU TEST

Antigènes représentant des épitopes de gp41 du HIV-1 et HIV-2 gp36 sont appliquées sur les puits de la microplaque avec des anticorps monoclonaux dirigés contre le HIV-1, p24. Le sérum ou le plasma échantillon est ajouté dans le puits, et si les anticorps spécifiques pour le HIV-1 et/ou HIV-2 (IgG, IgM ou IgA) sont présents dans l'échantillon, des complexes stables se forment avec les antigènes du HIV attachés aux puits. HIV-1 de l'antigène p24, la présence empêche lier simultanément à l'anticorps dans le puits et les anticorps détecteurs présents dans le diluant de l'échantillon. Des anticorps non réactifs sont éliminés par lavage. Des complexes antigène-anticorps stable sont identifiés par l'addition successive d'antigènes biotinylés et la

peroxydase de raifort (HRP) de la streptavidine conjuguée. Ces complexes anticorps-antigène sont quantifiées par l'activité catalytique de la peroxydase de raifort. Solution de substrat de la peroxydase est ajouté et est converti en un produit de couleur bleue. Un échantillon positif génère une couleur bleu foncé, tandis que la couleur bleue pâle ou incolores puits indiquent un échantillon négatif. Lors de l'ajout de solution d'arrêt, la couleur de la solution passe du bleu au jaune. La densité optique (DO) est mesurée avec un spectrophotomètre (lecteur ELISA) à 450 nm avec une longueur d'onde de référence à 600-650nm et est en proportion de la quantité de anti-HIV1/2-antibodies et HIV-1 p24 présent dans l'échantillon.

D. CONTENU DE LA TROUSSE

Le kit contient des réactifs pour 96 tests (code 081311), 192 tests (code 081312), ou 480 essais (code 081315).

Microplaque	1
Contrôle Négatif	1x2 mL/flacon
Contrôle Positif HIV-1	1x2 mL/flacon
Contrôle Positif HIV-2	1x2 mL/flacon
Contrôle Positif HIV p-24	1x2 mL/flacon
Conjugué # 1	1x25 mL/flacon
Conjugué # 2 Concentré 100x	1x0.25 mL/flacon
Diluant pour Conjugué # 2	1x25 mL/flacon
Diluant pour échantillon	1x12.5 mL/flacon
Substrat TMB	1x40 mL/flacon
Solution d'Arrêt	1x15 mL/flacon
Solution de Lavage Concentré 25x	1x50 mL/flacon
Feuilles adhésives pour la fermeture hermétique des microplaques	2
Nombre de tests	96
Code	081311

Microplaque	2
Contrôle Négatif	1x2 mL/flacon
Contrôle Positif HIV-1	1x2 mL/flacon
Contrôle Positif HIV-2	1x2 mL/flacon
Contrôle Positif HIV p-24	1x2 mL/flacon
Conjugué # 1	2x25 mL/flacons
Conjugué # 2 Concentré 100x	2x0.25 mL/flacons
Diluant pour Conjugué # 2	2x25 mL/flacons
Diluant pour échantillon	2x12.5 mL/flacons
Substrat TMB	2x40 mL/flacons
Solution d'Arrêt	1x40 mL/flacon
Solution de Lavage Concentré 25x	2x50 mL/flacons
Feuilles adhésives pour la fermeture hermétique des microplaques	4
Nombre de tests	192
Code	081312

Microplaque	5
Contrôle Négatif	1x4 mL/flacon
Contrôle Positif HIV-1	1x4 mL/flacon
Contrôle Positif HIV-2	1x4 mL/flacon
Contrôle Positif HIV p-24	1x4 mL/flacon
Conjugué # 1	5x25 mL/flacons
Conjugué # 2 Concentré 100x	5x0.25 mL/flacons
Diluant pour Conjugué # 2	5x25 mL/flacons
Diluant pour échantillon	5x12.5 mL/flacons
Substrat TMB	3x40 mL/flacons
Solution d'Arrêt	2x40 mL/flacons
Solution de Lavage Concentré 25x	5x50 mL/flacons
Feuilles adhésives pour la fermeture hermétique des microplaques	10
Nombre de tests	480
Code	081315

1. Microplaque:

12 barrettes de 8 puits sécables revêtus de gp36 du HIV spécifiques et les peptides gp41 et gp41 protéines avec des anticorps monoclonaux spécifiques au HIV-1 p24 Ag.

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 retournés 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 négative de sérum humain des anticorps du HIV et de l'antigène p24, et 0,05% Proclin 300 comme conservateur.

3. Contrôle Positif HIV-1

Prêt à utiliser le contrôle. Il contient du sérum humain positif pour anti-HIV 1 et 0,05% Proclin 300 comme conservateur.

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

4. Contrôle Positif HIV-2

Prêt à utiliser le contrôle. Il contient du sérum humain positif pour anti-HIV 2 et 0,05% Proclin 300 comme conservateur.

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

5. Contrôle Positif HIV p-24

Prêt à utiliser le contrôle. Il contient recombinant p24 HIV-1 et 0,05% de Proclin 300 comme conservateur.

6. Conjugué # 1

Prêt à l'emploi et bleu couleur codée réactif. Il contient un mélange d'antigènes biotinylés dans un tampon phosphate et 0,05% Proclin 300 comme conservateur.

7. Conjugué # 2 Concentré 100x

100x solution concentré. Il contient la peroxydase de raifort conjuguée à la streptavidine dans du tampon de stabilisation spécifique avec conservateur.

Réactif doit être dilué avec le Diluant pour Conjugué # 2.

Remarque importante: Toute portion inutilisée de cette Conjugué # 2 Solution diluée peut être conservée à +2...8°C pendant pas plus de 6 jours.

8. Diluant pour Conjugué # 2

Prêt à l'emploi et la couleur orange codé réactif.

Réactif est utilisé pour la dilution du Conjugué #2 Concentré 100x. Il contient un tampon phosphate et 0,05% Proclin 300 comme conservateur.

9. Diluant pour échantillon

Prêt à l'emploi et rouge couleur codée réactif.

Il contient des composants actifs et des protéines de sérum de souris agrégée 1,0% v/v, 0,1% w/v d'IgG humaine agrégée et 0,05% de Proclin 300 comme conservateur.

10. Substrat TMB

Composant prêt à l'emploi. Elle contient 0,26 mg/mL de 3,3', 5,5' tétraméthylbenzidine (TMB) et de 0,01% w/v de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), dans un tampon citrate.

Mélanger doucement avant utilisation.

Note:

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

11. Solution d'Arrêt

Composant prêt à l'emploi.

Il contient une solution de H₂SO₄ 0,3 M.

Mélanger doucement avant utilisation.

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

12. Solution de Lavage Concentré 25x

25x solution concentrée.

Il contient 0,2% de Proclin 300 comme conservateur.

Une fois diluée, la solution de lavage (tampon de lavage dilué) contient une solution saline de tampon phosphate et Proclin 300 et le Tween 20 comme agent de conservation.

Après dilution, la solution de lavage est stable pendant 6 jours à +2...8°C.

E. MATERIEL NECESSAIRE NON FOURNI

1. Micropipettes calibrées 200 µL, 50 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 (tolérance: ±0,5°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. Le kit 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 HBV et le HAV, 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 (TMB et H₂O₂) de la lumière forte et éviter les vibrations de la surface de la table où le test est effectué.
6. Dès la 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'étiquette externe (boîte en carton / emballage secondaire) et interne (flacons).
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 de la solution de lavage ou dans le transfert des composants dans d'autres récipients de postes de travail automatisés, afin d'éviter toute contamination.
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 effluents liquides générés par la procédure de lavage, de résidus de contrôles à partir d'échantillons et doit être traitée comme matière potentiellement infectieuse et inactivé. 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 doivent être absorbé 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 0,3 M d'acide sulfurique. Éviter le contact avec la peau et les yeux. En cas de contact, rincer immédiatement et abondamment avec de l'eau.
17. Ne pas fumer, manger, boire ou utiliser des produits cosmétiques dans les zones où des échantillons ou des réactifs du kit sont manipulés
18. Autres déchets générés par l'utilisation du kit (exemple: les embouts utilisés pour les échantillons et les contrôles, utilisé microplaques) doivent être traités comme étant potentiellement infectieux et éliminés conformément aux directives et lois concernant les déchets de laboratoires nationaux.
19. Ne pas pipeter à la bouche.

G. ÉCHANTILLON: 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 toute addition d'agents de conservation aux échantillons; 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 est fortement recommandée.
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 stockés 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 0.8u pour nettoyer l'échantillon à tester.
7. Ne pas utiliser d'échantillons inactivés à la chaleur car ils pourraient donner naissance à de faux réactivité.
8. Stockage des échantillons dilués est pas recommandé et peut affecter les performances du test.
9. Mélanger les échantillons avant l'utilisation.

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 2 mois. Laisser les réactifs à atteindre la température ambiante (+18...24°C) au moins 30 minutes avant utilisation. Prendre que le volume nécessaire pour l'essai. Retourner la portion inutilisée à +2...8°C.

1. Microplaque

Laisser la microplaque pour atteindre la température ambiante (environ 1 heure) avant d'ouvrir le contenant. Les barrettes non utilisées doivent être replacés dans la poche en aluminium fermement zippée et stocké à +2...8°C. Lors de l'ouverture de la première fois, des bandes résiduelles sont stables jusqu'à deux mois ou jusqu'à ce que 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. Contrôles Positifs

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

4. Conjugué # 1

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.

5 . Conjugué # 2 Concentré 100x

Le réactif 100x concentré doit être dilué dans de Diluant pour Conjugué # 2. Exemple: Ajouter 250 µL de Conjugué # 2 Concentré à 24,75 mL de Diluant pour Conjugué # 2. Une fois dilué mélange bien finir par rapport à l'extrémité avant de l'utiliser. Une fois dilué, veiller 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.

6 . Diluant pour Conjugué # 2

Prêt à l'emploi . Mélangez bien le vortex avant utilisation. Réactif est utilisé pour la dilution du Conjugué # 2.

7 . Diluant pour l'échantillon

Prêt à utiliser le réactif. Mélangez bien le vortex avant utilisation.

8 . Substrat TMB

Composant 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 . Ne pas exposer à une forte illumination, agents oxydants et les surfaces métalliques . Si ce composant doit être transféré utilisation possible récipient en plastique jetable, stérile.

9 . Solution d'Arrêt

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

10 . Solution de Lavage Concentré 25x

La solution concentrée 25x doit être dilué avec de l'eau de qualité EIA et mélangé doucement fin - sur -end avant l'utilisation. Exemple: Ajouter 50 mL de solution de lavage 25x à 1200 mL d'eau déminéralisée. Comme certains des cristaux de sel peuvent être présents dans le flacon, prendre soin de dissoudre tout le contenu lors de la préparation de la solution. Dans la préparation d'éviter la formation de mousse que la présence de bulles peut donner origine à une mauvaise efficacité du lavage . Après dilution, la solution de lavage est stable pendant 6 jours à +2...8°C.

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 ménage , solution à 10% d'eau de javel, les désinfectants de qualité hospitalière) de ces pièces qui pourraient accidentellement entrer en contact avec l'échantillon. Ils doivent également être régulièrement entretenus. Décontamination des déversements ou des résidus de composants du kit devrait également être effectuée régulièrement . Ils doivent également être régulièrement entretenus afin de montrer une précision de 1% et une exactitude de ± 2% .
2. L'incubateur ELISA doit être réglé à +37°C (tolérance de ± 0,5°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 globales de l'essai. La rondelle doit être soigneusement validé et correctement optimisé en utilisant les contrôles de la

trousse et des panneaux de référence, avant d'utiliser le kit de tests de laboratoire de routine.

5-3-5 cycles de lavage (aspiration + dispensation de 400 µL/puits de solution de lavage = 1 cycle) sont suffisantes pour faire en sorte que l'essai fonctionne comme prévu. Afin de régler correctement leur nombre, il est recommandé d'exécuter un test avec les contrôles de la trousse et bien caractérisés des échantillons de référence positifs et négatifs , et vérifier qu'elles correspondent aux valeurs indiquées ci-dessous dans la section "Contrôle de Qualité Interne". Étalonnage régulier des volumes livrés par, 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 $\pm 5\%$ (ou pour la tolérance à la première incubation entre 57 min à 63 min , de deuxième , de la tolérance et de la 3ème et 4ème incubation entre 29 min à 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 (600-650nm) à des fins de suppression. Ses performances standard doivent être (a) de bande passante ≤ 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 étalonnée périodiquement pour assurer que la densité optique est mesurée correcte. Il doit être entretenu régulièrement conformément aux instructions du fabricant.

L. CONTRÔLES ET PROCÉDURES PRÉALABLES AU TEST

1. Vérifiez la date d'expiration de la trousse imprimée sur l'étiquette extérieure. Ne pas utiliser l'appareil si expiré.
2. Vérifiez que les composants liquides ne sont pas contaminés par des particules visibles ou des agrégats. Vérifiez que le substrat est incolore ou bleu pâle par l'aspiration d'un petit volume de celui-ci avec une pipette en plastique 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 le Conjugué # 2 tel que décrit ci-dessus.
4. Diluer tout le contenu de la mémoire tampon de lavage concentré 25x tel que décrit ci-dessus.
5. Permettre à tous les autres composants pour atteindre la température ambiante (environ 1 heure), puis mélanger doucement sur vortex tous les réactifs liquides comme décrit .
6. Régler l'incubateur ELISA à $+37^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ 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 validation de l'instrument pour son utilisation avec le kit .
7. Vérifiez que le lecteur ELISA est allumé ou s'assurer qu'il sera allumé au moins 20 minutes avant de lire.
8. Si vous utilisez un poste de travail automatisé, allumer, vérifier 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 (Manuel)

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.

1. Placer le nombre requis de micropuits dans le support de cupule. Laissez le 1er puits vide pour l'opération de suppression (en option) .
2. Distribuer 100 µL de Diluant pour échantillon dans chaque puits sauf le puits pour l'exploitation de suppression.
3. Ajouter 100 µL de l'Échantillon, 100 µL de Contrôles Négatifs et Positifs en double pipetage de haut en bas pour l'homogénéisation. Pipette doucement en évitant débordement et de contaminer les puits adjacents. Sceller bandes en toute sécurité avec microplaque scellant.
4. Incuber la microplaque pendant **60 min à 37°C**.
5. Après incubation, éliminer la solution des puits en inversant la microplaque et en tapant sec sur une serviette de papier . Laver la plaque de microtitration cinq cycles selon le mode opératoire de lavage (chapitre I.3).
6. Ajouter 200 µL de Conjugué # 1 dans chaque puits, sauf le 1er découpage bien, et couvrir avec le scellant.
Remarque importante: Veillez à ne pas toucher la surface intérieure du plastique bien avec la pointe rempli avec le conjugué. La contamination peut se produire.
7. Incuber la microplaque pendant **30 min à 37°C**.
8. Après incubation, éliminer la solution des puits en inversant la microplaque et en tapant sec sur une serviette de papier . Laver la plaque de microtitration à 3 cycles selon le mode opératoire de lavage (chapitre I.3).
9. Distribuer 200 µL de Conjugué # 2 dilué dans chaque puits, sauf le 1er découpage bien, et couvrir avec le scellant .
Remarque importante: Veillez à ne pas toucher la surface intérieure du plastique bien avec la pointe rempli avec le conjugué. La contamination peut se produire .
10. Incuber la microplaque pendant **30 min à 37°C**.
11. Après incubation, éliminer la solution des puits en inversant la microplaque et en tapant sec sur une serviette de papier . Laver la plaque de microtitration cinq cycles selon le mode opératoire de lavage (chapitre I.3).
12. Pipette 150 µL de la Substrat TMB dans chaque puits, le puits blanc inclus .
13. Incuber la microplaque pendant **30 min à +18...25°C**.
Remarque importante: Ne pas exposer à une forte illumination directe . Haut de fond peut être générée.
14. Pipeter 100 µL de solution d'arrêt dans tous les puits à l'aide de la même séquence de pipetage comme à l'étape 12 pour arrêter la réaction enzymatique.

L'addition d'acide transformera le contrôle positif et les échantillons positifs du bleu au jaune .

15. Mesurer l'intensité de la couleur de la solution dans chaque puits, comme décrit dans le chapitre I.5, au filtre de 450nm (lecture) et peut-être à 600-650nm (soustraction de fond), suppression de l'instrument sur A1 .

La lecture doit être effectuée juste après l'addition de la solution d'arrêt et de toute façon pas plus longtemps que 30 minutes après son addition. Certains auto oxydation du chromogène peut se produire conduisant à bruit de fond élevé.

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 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 chromogène peut se produire conduisant à un fond plu

N. SCHÉMA DU TEST

ÉTAPE	PROCEDURE
Étape de l'échantillon	Ajouter 100 µL de diluant pour Échantillon. Ajouter 100 µL de l'échantillon/ contrôle au diluant et pipette de haut en bas pour mélanger. Testez témoins négatifs et positifs en double exemplaire. Incuber 60 minutes à 37°C.
Étape de lavage	Effectuer l'étape de lavage 5x.
Conjuguer 1	Ajouter 200 µL de prêt à l'emploi Conjugué 1 à puits de la plaque de microtitration. Incuber 30 minutes à 37°C.
Étape de lavage	Effectuer l'étape de lavage 3x.
Conjuguer 2	Ajouter 200 µL de conjugué dilué à 2 puits de la plaque de microtitration. Incuber 30 minutes à 37°C.
Étape de lavage	Effectuer l'étape de lavage 5x.
Substrat TMB	Ajouter 150 µL de Substrat TMB dans les puits de la plaque de microtitration.
Couleur développement	Incuber 30 minutes à +18...25°C.
Stopping	Ajouter 100 µL de solution d'arrêt et lire la DO à 450 nm de longueur d'onde de référence à 600-650 nm dans un lecteur de microplaques ELISA.

Un exemple de système de dispense est présentée dans le tableau ci-dessous:

Microplate

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	PC3	S8									
B	NC	S1	S9									
C	NC	S2										
D	PC1	S3										
E	PC1	S4										
F	PC2	S5										
G	PC2	S6										
H	PC3	S7										

Légende: BLK = Blanc NC = Contrôle Négatif
PC1 = Contrôle Positif HIV-1 PC2 = Contrôle Positif HIV-2
PC3 = Contrôle Positif HIV p-24 S = Échantillon

O. CONTRÔLE DE QUALITÉ INTERNE

Un contrôle est effectué sur les commandes et calibrateur ou chaque fois que le kit est utilisé dans le but de vérifier si les valeurs de OD450nm attendus ont été identifié dans l'analyse.

Assurez-vous que les paramètres suivants sont remplies:

Paramètre	Condition exigée
Puits blanc	Valeur de la DO à 450 nm < 0.100
Control Negatif (NC)	Valeur moyenne de la DO à 450 nm < 0.100 après soustraction des blancs
Control Positif HIV-1	Valeur de la DO à 450 nm > 0.500
Control Positif HIV-2	Valeur de la DO à 450 nm > 0.500
Control Negatif HIV p-24	Valeur de la DO à 450 nm > 0.500

Si les résultats du test répondent aux conditions ci-dessus, passer à la section suivante. Sinon, ne pas poursuivre mais effectuer les vérifications suivantes:

Problème	Vérifier
Puits blanc DO à 450 nm > 0.100	1. si la solution de Substrat n'a pas été contaminée au cours du test.
Contrôle Négatif (CN) DO à 450 nm > 0.100 après soustraction des blancs	1. si la procédure de lavage et le paramétrage de la station de lavage sont ceux validés au cours de l'étude de préqualification; 2. si l'on a utilisé la bonne solution de lavage et si la station de lavage a été amorcée avec cette solution avant utilisation; 3. si aucune erreur n'a été commise dans la procédure de test (distribution de contrôle positif au lieu du contrôle négatif); 4. s'il n'y a pas eu une contamination du contrôle négatif ou des puits dans lesquels ce contrôle a été distribué par des échantillons positifs, des projections ou le conjugué enzymatique; 5. si les micropipettes n'ont pas été contaminées par des échantillons positifs ou par le conjugué enzymatique; 6. si les aiguilles de la station de lavage ne sont pas totalement ou partiellement obstruées.

Contrôles Positifs DO à 450 nm < 0.500	<ol style="list-style-type: none"> 1. si la procédure a été réalisée correctement; 2. si aucune erreur n'a été commise lors de sa distribution (par exemple distribution de contrôle négatif au lieu de contrôle positif); 3. si la procédure de lavage et le paramétrage de la station de lavage sont ceux validés au cours de l'étude de préqualification; 4. s'il n'y a pas eu de contamination externe de l'étalon.
---	---

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

P. CALCUL DES RÉSULTATS

P.1. Validité

Deux Contrôles Négatifs (NC), deux HIV-1 Contrôles Positifs (PC1), deux HIV-2 Contrôles Positifs (PC2) et deux HIV-1 p24 Contrôles (PC3) doivent être inclus dans chaque série. Les résultats des contrôles doivent être dans les critères d'acceptation des résultats de l'échantillon avant peuvent être interprétés.

Calcul de Contrôle Négatif Moyenne NC_{MEAN} :

Exemple:
 Absorbance NC
 0,021
 0,025

 0,046

$$NC_{MEAN} = 0,046 / 0,023 = 2$$

La moyenne de l'absorbance des contrôles négatifs, après découpage, doit être inférieure à 0,100. Si la valeur moyenne est supérieure ou égale à 0,100, le terme doit être répété.

Calcul de HIV1 Contrôle Positif Moyenne HIV1- PC_{MEAN} :

Exemple:
 Absorbance HIV1-PC
 1.545
 1.239

 2.784

$$HIV1-PC_{MEAN} = 2.784 / 2 = 1.392$$

La moyenne de l'absorbance des HIV-1 Contrôles Positifs doit être supérieure à 0,500. Si la valeur moyenne est inférieure ou égale à 0,500, le terme doit être répété.

Calcul de HIV-2 Contrôle Positif Moyenne HIV2- PC_{MEAN} :

Exemple:
 Absorbance HIV2-PC
 1.459
 1.343

 2.802

$$HIV2-PC_{MEAN} = 2.802 / 2 = 1.401$$

La moyenne de l'absorbance des HIV-2 Contrôles Positifs doit être supérieure à 0,500. Si la valeur moyenne est inférieure ou égale à 0,500, le terme doit être répété.

Calcul de HIV-1 p24 Contrôle Positif Moyenne HIV-1 $p24-PC_{MEAN}$:

Exemple:
 Absorbance HIV-1 p24-PC
 2.223
 2.172

 4.395

$$HIV-1 p24-PC_{MEAN} = 4.395 / 2 = 2.198$$

La moyenne de l'absorbance des HIV-1 p24 Contrôles Positifs doit être supérieure à 0,500. Si la valeur moyenne est inférieure ou égale à 0,500, le terme doit être répété.

P.2 . Calcul du Seuil

Les résultats des tests sont calculées au moyen d'une valeur de seuil déterminée selon la formule suivante sur la valeur moyenne de la DO à 450 nm de Contrôle Négatif (NC) - OD_{450nm} Blank:

$$(NC_{mean} - blank) + 0.170 = \text{Cut-Off (Co)}$$

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

Remarque importante: Lorsque le calcul des résultats est effectuée par le système d'exploitation d'une station de travail automatisée ELISA, veiller à ce que la bonne formulation est utilisée pour calculer la valeur de coupure et de générer l'interprétation correcte des résultats.

Q. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

1. Échantillons présentant des valeurs d'absorbance inférieure à la valeur de coupure sont réputés ne pas réactive par les critères de ce test immunologique, et peut être considéré comme négatif pour les anticorps anti HIV1+2 et HIV-1 p24. D'autres tests n'est pas nécessaire.
2. Échantillons présentant des valeurs d'absorbance sont égales ou supérieures à la coupure sont considérés comme des réactifs ou positifs pour le HIV-1 et/ou HIV-2 ou des anticorps HIV-1 p24. Ces spécimens (en utilisant l'échantillon original) doivent être re- testés en double avant la confirmation finale du résultat.
3. Initialement échantillons réactifs, qui ne réagissent pas dans l'un des essais répétés en double, sont considérés comme négatifs pour les anticorps de HIV1+2 et HIV-1 p24. D'autres tests n'est pas nécessaire.
4. Si l'une des deux valeurs réanalysée est égale ou supérieure à la valeur seuil, l'échantillon est considéré comme réactif de façon répétée. Les échantillons qui se sont révélés positifs répétables sont interprétés comme positifs pour la présence d'anticorps dirigés contre le HIV-1 et/ou HIV-2 ou HIV-1 p24. Dans la plupart des réglages, il convient d'étudier les échantillons à plusieurs reprises réactifs par des tests supplémentaires, plus spécifiques.

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. Plusieurs reprises échantillons réactifs doivent être soumis à un test de confirmation avant le diagnostic de l'infection à HIV est libéré.
3. 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.
4. Diagnostic de l'infection à HIV doit être fait et publié pour le patient que par un médecin qualifié.

R. CARACTÉRISTIQUES EN MATIÈRE DE PERFORMANCES

Évaluation de la performance a été réalisée conformément à ce que rapportés dans les Spécifications Techniques Communes (STC) comme l'exige l'art .5, chapitre 3 de la directive IVD 98/79/CE. L'évaluation des performances a été effectuée à la fois dans un centre externe et dans les laboratoires de Adaltis ainsi d'achever l'étude .

R.1 . SPÉCIFICITÉ ET SENSIBILITÉ

R.1.1 Spécificité

La spécificité évaluée sur:

- ❖ 5014 non sélectionnés bailleurs de fonds Européens de sang provenant de deux centres dont 40 échantillons de donneurs première fois
- ❖ 201 patients hospitalisés
- ❖ 116 échantillons potentiellement interférentes:
 - ✓ 27 échantillons de grossesse (6 monopar, 17 multipar et 4 inconnu)
 - ✓ 27 Facteur Rhumatoïde (RF) Les échantillons positifs
 - ✓ 25 échantillons hémolysés y compris hémolysés lourde
 - ✓ 27 avec d'autres infections (4 HBV, 5 EBV, 5 HCV, 4 HSV, 5 Rubéole, 4 Toxoplasmose)
 - ✓ 5 échantillons Hyperbilirubinémie
 - ✓ 5 échantillons Hyperlipémie
- ❖ 50 échantillons [25 Positifs (HIV-1, HIV-2 et HIV-1 p24) et 25 Négatif] ont été testées et aucune différence due à la méthode de préparation de l'échantillon (plasma-sérum, citrate, EDTA et Héparine) a été observé.

De 5014 les bailleurs de fonds Européens de sang non sélectionnés, 19 (dix-neuf) échantillons étaient initialement réactifs (IR) et testé en double. Elles ont abouti à 17 (dix-sept) répétée réactive (RR) et ils ont été testés avec un test de confirmation. Un échantillon est resté indéterminé.

Statut Réelle	Résultats des Tests			
	IR	RR	NEG	Total
Négatif	18	16	4997	5013
Positif	0	0	0	0
Indéterminé	1	1	0	1
Total	19	17	4997	5014

Une spécificité finale a été trouvée à 99,7%.

R.1.2 Sensibilité Analytique (Limite de Détection)

La sensibilité analytique a été déterminée au moyen de la norme internationale de l'OMS pour le HIV-1 antigène p24, premier réactif international de référence, le code NIBSC 90/636.

Une dilution dans une matrice négative a été préparé (0,1-10 UI/mL). Cette dilution a été testé dans trois essais d'exploitation différents (trois microplaques) plus de deux essais (deux jours). Pour chaque passage individuel, une nouvelle dilution des échantillons a été effectué.

Les résultats analytiques sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Essai	1	2	3
HIV-1 p24 (IU/mL)	OD/CO		
10	11.9	12.6	12.3
5	8.0	10.7	9.8
2.5	4.3	6.2	5.7
1	1.8	2.8	2.6
0.5	1.0	1.6	1.4
0.25	0.6	1.0	0.8
0.1	0.4	0.5	0.5
0	0.2	0.3	0.3

La limite de sensibilité est estimée <1,0 UI/mL

R.1.3 Sensibilité Diagnostique

La sensibilité diagnostique de la trousse de dépistage totale EIAGEN Detect HIV 4 Total Screening Kit a été basée sur des tests d'un panel de 500 HIV1/2 échantillons positifs, 31 panels de séroconversion (fourni par BBI-Seracare/ZeptoMetrix) et 40 échantillons de séroconversion précoce.

En détails:

- ❖ 500 échantillons positifs (400 HIV-1 et 100 HIV-2 compris le sous-type A, B, C, D, F, G, H, J, K, CRF);
- ❖ 50 cellules surnageants de culture, y compris les différents sous-types du HIV-1 (groupe M sous-type A à K, CRF01_AE, CRF02_AG, groupe N, groupe O) et le HIV-2;
- ❖ 50 HIV-1 p24 échantillons positifs antigène
- ❖ 31 panels de séroconversion (voir tableau ci-dessous)

Séroconversion Panneau	Adaltis EIAGEN	4 th gen. assay	3 rd gen. assay	HIV -1 p24 antigen	NAT
	Premier échantillon détecté positif dans le panneau				
Y-PRB925	5		5	5	5
AB/PRB927	2	2	2	2	2
AC/PRB928	2	2	2	2	2
AD/PRB929	3	3	6	3	3
AE PRB930	1		3	1	1
PRB933	2	2	2	2	2
PRB934	1	1	1	1	1
AP/PRB940	1	2	3	2	1
AQ/PRB941	3	4	4	3	2
AS/PRB943	3	3	6	3	2
AU PRB945	3		4	3	1
AW/PRB947	2	2	2	2	1
AX PRB948	3	4	4+	3	3
AZPRB950	2		4	2	2
BA PRB 951	3	3	5	3	3
PRB952	3	3	4	3	2

Séroconversion Panneau	Adaltis EIAgen	4 th gen. assay	3 rd gen. assay	HIV -1 p24 antigen	NAT	Premier échantillon détecté positif dans le panneau				
BE/PRB955	2	2	4	2	1					
BF PRB 956	4	4	5	4	2					
BI/PRB959	1	1	3	1	1					
PRB960	7	8	9+	8	8					
PRB962	5	5	6+	5	3					
PRB963	6	6	7	6	5					
PRB964	6+	6	ND	6	4					
PRB965	4	2	4	2	1					
PRB967	4	4	4	4	2					
PRB968	7	7	7	7	5					
6240	7	8	9	8	6					
9028	6	6	ND	6	6					
9077	12	12	14	12	12					
9079	9	9	11	9	8					
12007	4	4	5	ND	4					

EIAgen Detect HIV 4 Total Screening Kit code: 081311
3^{ème} Lot

Échantillon	S/Co Moyenne	Précision - %CV		
		Intra essai	Inter essai	Total
Negatif	0.52	18.7	5.4	19.5
Pos A-HIV 1	1.65	8.6	4.6	9.8
Pos A-HIV 2	1.78	9.7	4.9	10.9
Pos HIV-1 p24	2.05	7.4	4.6	8.7

EIAgen Detect HIV 4 Total Screening Kit code: 081311
4^{ème} Lot

Échantillon	S/Co Moyenne	Précision - %CV		
		Intra essai	Inter essai	Total
Negatif	0.58	19.6	3.0	19.8
Pos A-HIV 1	1.59	9.4	1.4	9.5
Pos A-HIV 2	1.66	11.4	2.64	11.7
Pos HIV-1 p24	2.17	9.1	2.0	9.3

R.2.2 Inter lot Résultats:

Échantillon	S/Co Moyenne	Précision - %CV	
		Inter essai	Total
Negatif	0.48	18.4	26.5
Pos A-HIV 1	1.63	9.7	13.3
Pos A-HIV 2	1.72	9.9	14.2
Pos HIV-1 p24	2.03	8.6	12.1

R.2.3 Spécifications:

Intra Lot:

Intra Essai:

% CV sur des échantillons positifs <15%

% CV sur échantillon négatif <25%

Inter Essai:

% CV sur des échantillons positifs <15%

% CV sur échantillon négatif <25%

Inter Lot:

Between Lot:

% CV sur des échantillons positifs <15%

% CV sur échantillon négatif <25%

Précision total:

% CV sur des échantillons positifs <20%

% CV sur échantillon négatif <30%

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:

- ❖ 42 échantillons précoce séroconversion (positifs pour le HIV-1 antigène p24 du noyau et anticorps anti-HIV sont absents ou faiblement présente - résultat indéterminé sur le test Western Blot).

Une sensibilité finale a été trouvée à 100%.

R.2. PRECISION

La précision du dispositif a été évaluée par la détermination de ses valeurs dans un intérieur et entre les pistes. Dans les tableaux ci-dessous les résultats sont présentés pour un échantillon négatif et échantillons positifs.

R.2.1 Intra lot Résultats:

EIAgen Detect HIV 4 Total Screening Kit code: 081311
1^{ère} Lot

Échantillon	S/Co Moyenne	Précision - %CV		
		Intra essai	Inter essai	Total
Negatif	0.37	23.2	4.5	23.6
Pos A-HIV 1	1.80	10.6	9.4	14.1
Pos A-HIV 2	1.91	10.7	7.7	13.1
Pos HIV-1 p24	2.14	10.9	4.6	11.8

EIAgen Detect HIV 4 Total Screening Kit code: 081311
2^{ème} Lot

Échantillon	S/Co Moyenne	Précision - %CV		
		Intra essai	Inter essai	Total
Negatif	0.40	12.6	10.8	16.6
Pos A-HIV 1	1.47	6.9	7.4	10.3
Pos A-HIV 2	1.53	7.6	8.1	11.1
Pos HIV-1 p24	1.78	4.6	4.9	6.7

ERREUR	CAUSES POSSIBLES / SUGGESTIONS
OD très différent ($\pm 50\%$) de la DO a rapporté QC	<ul style="list-style-type: none"> - 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) - Température incorrecte ou mauvaise heure d'incubation (suggestion: plus de soin dans le maintien de l'incubateur; noter le début de l'incubation) - Erreur dans le lavage ou photométrie (suggestion: vérifier les paramètres de fonctionnement ou instruments respectifs) - Contamination de substrat ou conjugué (suggestion: utiliser uniquement des contenants de plastique jetables et propres)
Faibles résultats reproductibles	<ul style="list-style-type: none"> - 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) - Erreur dans le lavage ou en lecture (suggestion: vérifier les paramètres de fonctionnement ou instruments respectifs) - Contamination de substrat (suggestion: utiliser uniquement des contenants de plastique jetables et propres) - 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)
aucune réaction colorimétrique après addition du substrat	<ul style="list-style-type: none"> - Certains réactif pas pipette - Une forte contamination du conjugué et du substrat - 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)
trop faible réaction (trop faible DO)	<ul style="list-style-type: none"> - Temps d'incubation trop court, la température d'incubation trop faible - Incorrect conjugué dilution
trop grande réaction (trop élevés DO) - incorrect conjugué dilution	<ul style="list-style-type: none"> - Temps d'incubation trop long, température d'incubation trop élevée - Qualité de l'eau pour le tampon de lavage insuffisant (bas grade de désionisation) - Lavage insuffisant (conjugués pas correctement supprimé)
aberrantes inexplicables	<ul style="list-style-type: none"> - Contamination des pipettes, des conseils ou des conteneurs - Laver inconstant et insuffisante (conjugués pas correctement supprimé)

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

T. AUTOMATION

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

- L'utilisateur de ce kit est conseillé de lire attentivement et comprendre les instructions d'utilisation. Le strict respect du protocole est nécessaire pour obtenir des résultats fiables. En particulier, l'échantillon correct et réactif pipetage, avec un lavage soigneux et le calendrier des étapes d'incubation est essentiel pour exacts, la détection reproductible du HIV-1 et HIV-2 anticorps et les antigènes p24.
- Si possible, utiliser des échantillons de sérum ou de plasma frais. La dégradation de l'échantillon ainsi que de multiples cycles de gel-dégel peuvent entraîner des résultats erronés. **Ne pas utiliser d'échantillons inactivés par la chaleur.**
- Les résultats des tests faussement réactifs peuvent être attendus avec un kit de test de cette nature. La proportion des réactifs sera fonction de la sensibilité et de la spécificité de la trousse d'essai et sur la prévalence du HIV-1 et HIV-2 dans la population d'anticorps à cribler.
- Après la EIAGEN Detect HIV 4 Total Screening Kit est effectué, des échantillons à plusieurs reprises réactifs doivent être soumises à des essais supplémentaires en utilisant Western Blot (WB), indirecte Immunofluorescence Assay (IFA) ou radioimmuno-précipitation Essai tests (RIPA). La détermination que les échantillons d'une personne contient des anticorps dirigés contre les antigènes du HIV et/ou le HIV a de vastes implications médicales, sociales, psychologiques et économiques. Il est recommandé que la confidentialité, de conseils appropriés et une évaluation médicale être considéré comme un aspect essentiel de la séquence de test.
- Affections liées au AIDS sida et sont des maladies cliniques et le diagnostic ne peut être établi cliniquement. Test EIA seul ne peut pas être utilisé pour diagnostiquer le sida. Un résultat de test non réactif à tout moment de la séquence de test n'exclut pas la possibilité d'exposition ou l'infection par le HIV.

Le risque d' une personne asymptomatique, qui est répétée réactive , de développer le sida et/ou des conditions liées au sida , n'est pas connue.


- Le résultat du test doit être utilisé en combinaison avec toutes les autres données cliniques et diagnostiques.
- Les anticorps anti- HIV peuvent se produire en raison de la participation volontaire à une étude de vaccin contre le HIV. L'interprétation de ce test de diagnostic dépend du type de vaccin administré . Corrélation avec les antécédents médicaux et des tests supplémentaires peut être nécessaire pour diagnostiquer avec précision le HIV chez les volontaires de la vaccination.


REFERENCES


1. Alizon, M., Sonigo, P., Barré-Sinoussi, F., Chermann, J.-C., Tiollais, P., Montagnier, L. and Wain-Hobson, S., 1984. Molecular Cloning of Lymphadenopathy-Associated Virus. *Nature* 312:757-760.
2. Barré-Sinoussi, F., Chermann, J.-C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Daugey, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbrum, W. and Montagnier, L. 1983. Isolation of a T-lymphotropic Retrovirus from a Patient at Risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). *Science* 220:868-871.
3. Clavel, F., Mansinho, K., Chamaret, S. et al. 1987. Human Immunodeficiency Virus Type 2 Infection Associated with AIDS in West Africa. *N. Engl. J. Med.* 316:1180-1185.
4. Gallo, R.C., Salahuddin, S.Z., Popovic, M., Shearer, G.M., Kaplan, M., Haynes, B.F., Palker, T.J., Redfield, R., Oleske, J., Safal, B., White, G., Foster, P. and Markham, P.D. 1984. Frequent Detection and Isolation of Cytopathic Retroviruses (HTLV-III) from Patients with AIDS and at Risk for AIDS. *Science* 224:500-503.
5. Gold, J. and Dwyer, J., 1994. A Short History of AIDS. *Med. J. Aust.* 160:251-252.
6. Hahn, B.N., Shaw, G.M., Arya, S.K., Popovic, M., Gallo, R.C. and Wong-Staal, F., 1984. Molecular Cloning and Characterization of the HTLV-III Virus Associated with AIDS. *Nature* 312:166-169.
7. IVD Directive 98/79/CE, Common Technical Specifications (CTS) – Annex II, List A.
8. Lin, H.J. 1995. Laboratory Tests for Human Immunodeficiency Viruses. *J. Int. Fed. Clin. Chem.* 7:61-65.
9. Luciw, P.A., Potter, S.J., Steimer, K., Dina, D. and Levy, J.A., 1984. Molecular Cloning of AIDS-Associated Retrovirus. *Nature* 312:760-763.
10. Ly, T.D., Laperche, S., Brennan, C., Vallari, A., Ebel, A., Hunt, J., Martin, L., Daghfal, D., Schochetman, G. And Devare, S. 2004. Evaluation of the sensitivity and specificity of six HIV combined p24 antigen and antibody assays. *J. Virol. Meth.* 122: 185-194.
11. Popovic, M., Sarngadharan, M.G., Read, E., and Gallo, R.C., 1984. Detection, Isolation, and Continuous Production of Cytopathic Retrovirus (HTLV-III) from Patient with AIDS and Pre-AIDS. *Science* 224:497-500.
12. Sarngadharan, M.G., Popovic, M., Bruch, L., Schüpbach, J. and Gallo, R.C., 1984. Antibodies Reactive with Human T-Lymphotropic Retroviruses (HTLV-III) in the Serum of Patients with AIDS. *Science* 224:506-508.
13. Saville, R.D., Constantine, N.T., Cleghorn, F.R., Jack, N., Bartholomew, C., Edwards, J., Gomez, P. and Blattner, W.A. 2001. Fourth-generation enzyme-linked immunosorbent assay for the simultaneous detection of human immunodeficiency virus antigen and antibody. *J. Clin. Microbiol.* 39 (7): 2518-2524.
14. Sehulster, L.M., Hollinger, F.B., Dreesman, G.R. and Melnick, J.L., 1981. Immunological and Biophysical Alteration of Hepatitis B Virus Antigens by Sodium Hypochlorite Disinfection, *App. and Environ. Microbiol.* 42:762-767.
15. Sinicco, A., For a, R., Scalandra, M., Lucchini, A., Caramello, P. and Giovanni, P. 1993. Risk of Developing AIDS after Primary Acute HIV-1 Infection. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 6:575-581.
16. Spire, B., Montagnier, L., Barré-Sinoussi, F. and Chermann, J.-C., 1984. Inactivation of Lymphadenopathy Associated Virus by Chemical Disinfectants. *Lancet*: 889-901, Oct. 20.
17. Vézinet-Brun, F., Barré-Sinoussi, F., Salmot, A.G., Christol, D. Montagnier, L., Rouzioux, C., Klatzmann, D., Rozenbaum, W., Gluckmann, J.C. and Chermann, J.-C., 1984. Detection of IgG Antibodies to Lymphadenopathy-Associated Virus in Patients with AIDS or Lymphadenopathy Syndrome. *Lancet*: 1253-1256, June 9.
18. Weber, B., Thorstensson, R., Tanprasert, S., Schmitt, U. And Melchior, W. 2003. Reduction of the diagnostic window in three cases of human immunodeficiency-1 subtype E primary infection with fourth-generation HIV screening assays. *Vox Sanguinis* 85: 73-79.
19. World Health Organization. 2004. HIV assays: operational characteristics (Phase 1): report 15 antigen/antibody ELISAs. www.who.int/diagnostics_laboratory/publications/en/HIV_Report15.pdf.

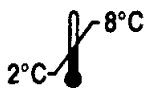
EIAgen

Detect HIV 4 Total Screening Kit

REF 081311  96

REF 081312  192

REF 081315  480



IVD

CE 0459

Leggere attentamente questo foglietto illustrativo prima di effettuare il dosaggio ed attenersi scrupolosamente alle istruzioni che vi sono riportate.














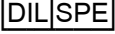



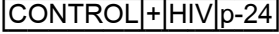

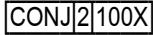
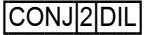



L'affidabilità dei risultati è garantita soltanto se le istruzioni vengono seguite attentamente.



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

it

SIMBOLI UTILIZZATI NELLE ETICHETTE

Italiano 							
	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	Rischio Biologico	Data di Fabbricazione	Micropiastra	Diluente Campioni	Controllo Negativo
							
	Controllo Positivo HIV-1	Controllo Positivo HIV-2	Controllo Positivo HIV p-24	Coniugato # 1			
							
	Coniugato # 2 Concentrato 100x	Diluente Coniugato # 2	Substrato TMB	Soluzione Bloccante	Soluzione di Lavaggio Concentrata 25x		

A. FINALITA' D'USO

EIAgen Detect HIV 4 Total Screening Kit è un saggio di quarta generazione in fase solida (Enzyme-Linked Immunosorbent assay) che utilizza un mix di antigeni ed anticorpi per lo screening diagnostico *in vitro* nel siero umano o plasma (EDTA, Eparina e Citrato) di anticorpi anti-HIV-1, HIV-2 e dell'antigene HIV-1 p24.

Questo kit è un saggio combinato Ag/Ab e non può essere utilizzato per la ricerca del solo antigene HIV-1 p24. Questo kit è per esclusivo uso diagnostico *in vitro* e deve essere utilizzato solo da personale sanitario e non può essere venduto al pubblico.

B. INTRODUZIONE

La sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS) è costituita da un insieme di sintomi che derivano dall'inabilitazione del sistema sistema immunitario umano provocato dal Virus dell'Immunodeficienza Umana (HIV). L'infezione da HIV può evolversi verso una fase sintomatica che è caratterizzata da infezioni opprtunistiche e che potrebbe causare la morte.

L'agente eziologico dell'AIDS, l'HIV, colpisce tipi specifici di cellule T causando la Linfopenia e contagiando l'immunità mediata dalle cellule T. L'HIV appartiene ad una famiglia di retrovirus con due sottogruppi: HIV-1 e HIV-2. HIV-1 è più virulento e trasmissibile dell' HIV-2. HIV-1 è la causa di infezioni HIV a livello globale, mentre HIV-2 è prevalentemente diffuso nei paesi dell'Africa Occidentale. Siccome la reazione sierologica incrociata tra HIV-1 e HIV-2 è molto variabile e dipende dal campione testato, gli antigeni per la determinazione specifica sia dell' HIV-1 che dell'HIV-2 sono inclusi nel dosaggio.

L'HIV si trasmette tramite rapporti sessuali con persone infette, scambiando aghi e siringhe con persone infette e tramite trasfusione di sangue contaminato. I dosaggi Immuno-Assorbenti legati ad un Enzima (come per esempio EIAgen Detect HIV 4 Total Screening ELISA di 4th gen) sono consigliati per la ricerca nel sangue umano e nel plasma della presenza di anticorpi anti-HIV e antigene HIV-1 p24. La presenza di anti-HIV-1 e/o anti-HIV-2 nel sangue indica una potenziale infezione con HIV-1 e/o HIV-2 e di conseguenza questo sangue non deve essere utilizzato per trasfusioni o per la produzione di materiali iniettabili.

C. PRINCIPIO DEL TEST

Gli antigeni che rappresentano gli epitopi del gp41 dell' HIV-1 e del gp36 dell'HIV-2 sono coattati in micropozzetti insieme ad anticorpi monoclonali anti HIV-1 p24. Il campione di siero o plasma viene aggiunto al pozzetto e se sono presenti nel campione gli anticorpi specifici per HIV-1 e/o HIV-2 (IgG, IgM o IgA), si formeranno complessi stabili con gli antigeni HIV attaccati al pozzetto. Qualora presente, l'antigene HIV-1 p24 si legherà simultaneamente agli anticorpi nel pozzetto e agli anticorpi rivelatori presenti nel Diluente Campioni. Gli anticorpi non reattivi vengono rimossi durante il lavaggio. I complessi stabili antigene-anticorpo vengono identificati attraverso la successiva aggiunta di antigeni biotinilati e di streptadivina coniugata con perossidasi di rafano (HRP). Questi complessi anticorpo-antigene sono quantificati tramite l'attività catalitica della perossidasi di

rafano. Una volta aggiunta la soluzione di perossidasi-substrato il prodotto vira ad un colore blu. Un campione positivo genera un colore blu scuro mentre il blu chiaro o l'assenza di colore indica un campione negativo. Una volta aggiunta la soluzione bloccante, il colore virerà da blu a giallo. La Densità Ottica (OD) si misura con uno spettrofotometro (lettore ELISA) a 450nm con filtro 600-650nm e varia in proporzione alla quantità di anticorpi anti-HIV1/2 e HIV-1 p24 presenti nel campione.

D. COMPONENTI

Ogni kit contiene i reagenti sufficienti per eseguire 96 tests (codice 081311), o 192 tests (codice 081312) o 480 tests (codice 081315).

Micropiastra	1
Controllo Negativo	1x2 mL/flacone
Controllo Positivo HIV-1	1x2 mL/flacone
Controllo Positivo HIV-2	1x2 mL/flacone
Controllo Positivo HIV p-24	1x2 mL/flacone
Coniugato # 1	1x25 mL/flacone
Coniugato # 2 Concentrato 100x	1x0.25 mL/flacone
Diluente Coniugato # 2	1x25 mL/flacone
Diluente Campioni	1x12.5 mL/flacone
Substrato TMB	1x40 mL/flacone
Soluzione Bloccante	1x15 mL/flacone
Soluzione di Lavaggio Conc. 25x	1x50 mL/flacone
Fogli adesivi copripiastra	2
Numero di tests	96
Codice	081311

Micropiastra	2
Controllo Negativo	1x2 mL/flacone
Controllo Positivo HIV-1	1x2 mL/flacone
Controllo Positivo HIV-2	1x2 mL/flacone
Controllo Positivo HIV p-24	1x2 mL/flacone
Coniugato # 1	2x25 mL/flacone
Coniugato # 2 Concentrato 100x	2x0.25 mL/flacone
Diluente Coniugato # 2	2x25 mL/flacone
Diluente Campioni	2x12.5 mL/flacone
Substrato TMB	2x40 mL/flacone
Soluzione Bloccante	1x40 mL/flacone
Soluzione di Lavaggio Conc. 25x	2x50 mL/flacone
Fogli adesivi copripiastra	4
Numero di tests	192
Codice	081312

Micropiastra	5
Controllo Negativo	1x4 mL/flacone
Controllo Positivo HIV-1	1x4 mL/flacone
Controllo Positivo HIV-2	1x4 mL/flacone
Controllo Positivo HIV p-24	1x4 mL/flacone
Coniugato # 1	5x25 mL/flacone
Coniugato # 2 Concentrato 100x	5x0.25 mL/flacone
Diluente Coniugato # 2	5x25 mL/flacone
Diluente Campioni	5x12.5 mL/flacone
Substrato TMB	3x40 mL/flacone
Soluzione Bloccante	2x40 mL/flacone
Soluzione di Lavaggio Conc. 25x	5x50 mL/flacone
Fogli adesivi copripiastra	10
Numero di tests	480
Codice	081315

1. Micropiastra:

La piastra è composta da 12 strips x 8 micropozzetti divisibili attivati con HIV specifici peptidi gp36 e gp41 e con gp41 proteina con Anticorpo Monoclonale specifico per HIV-1 p24 Ag.

Le micropiastre sono sigillate in una busta con un desiccante.

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

2. Controllo Negativo

Pronto all'uso. Contiene siero umano negativo per Anti-HIV e per Antigine p24 in presenza di 0.05% di Proclin 300 come conservante.

3. Controllo Positivo HIV-1

Pronto all'uso. Contiene siero umano positivo per Anti-HIV 1 in presenza di 0.05% di Proclin 300 come conservante.

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

4. Controllo Positivo HIV-2

Pronto all'uso. Contiene siero umano positivo per Anti-HIV 2 e 0.05% di Proclin 300 come conservante.

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

5. Controllo Positivo HIV p-24

Pronto all'uso. Contiene HIV-1 p24 ricombinante e 0.05% di Proclin 300 come conservante.

6. Coniugato # 1

Pronto all'uso e di colore blu. Contiene una miscela di antigeni biotinilati in tampone fosfato in presenza di 0.05% di Proclin 300 come conservante.

7. Coniugato # 2 Concentrato 100x

Soluzione concentrata 100x. Contiene perossidasi di rafano coniugata con streptavidina in uno specifico tampone stabilizzante in presenza di conservante.

Il reagente deve essere diluito con il Diluente del Coniugato # 2.

Nota Importante: *Qualsiasi porzione non usata del Coniugato # 2 diluito può essere conservata a +2...8°C per non più di 6 giorni.*

8. Diluente Coniugato # 2

Pronto all'uso e di colore arancione.

Il reagente è usato per la diluizione del Coniugato # 2 Concentrato 100x. Contiene tampone fosfato e 0.05% di Proclin 300 come conservante.

9. Diluente Campione

Pronto all'uso e di colore rosso.

Contiene componenti attivi e 1.0% v/v di proteina di siero aggregato di topo e 0.1% p/v di IgG aggregate umane con 0.05% di Proclin 300 come conservante.

10. Substrato TMB

Reagente pronto all'uso. Contiene 0.26 mg/mL di 3,3',5,5' Tetrametilbenzidina (TMB) e 0.01% p/v di Perossido d'idrogeno (H₂O₂), in tampone citrato.

Miscelare gentilmente prima dell'uso.

Nota:

Da conservare al riparo dalla luce in quanto sensibile alla forte illuminazione.

11. Soluzione Bloccante

Reagente pronto all'uso.

Contiene una soluzione 0.3 M di H₂SO₄.

Miscelare gentilmente prima dell'uso.

La scheda di sicurezza (MSDS) è disponibile su richiesta dell'utilizzatore professionale.

12. Soluzione di Lavaggio Concentrata 25x

Soluzione concentrata 25x.

Contiene 0.2% di Proclin 300 come conservante. Una volta diluita la soluzione contiene tampone salino fosfato in presenza di Proclin 300 e Tween 20 come conservanti.

Una volta diluita la soluzione di lavaggio è stabile per 6 giorni a +2...8°C.

E. MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

1. Micropipette calibrate da 200 µL, 50 µL e 10 µL e puntali usa e getta.
2. Acqua di grado EIA (distillata o deionizzata, trattata con carbone attivo per rimuovere agenti ossidanti 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. (tolleranza ± 0,5 °C).
6. Lettore calibrato di micropiastre ELISA con lettura a 450nm e possibilmente con filtro 600-650nm per la sottrazione 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 dispositivo 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 sono disponibili vaccini 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 micropiastro 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. Dopo il ricevimento, conservare il kit a +2...8°C in un frigorifero o camera fredda a temperatura controllata.
7. Non scambiare i componenti tra diversi 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 i campioni (sieri o 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 utilizzare il kit dopo la data di scadenza riportata sulle etichette esterne (contenitore secondario - box) ed interne (flaconi/micropiastro).
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 eliminati 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. Non fumare, non mangiare o applicare cosmetici nelle aree dove campioni e reagenti vengono maneggiati.
18. Altri materiali di scarto generati dall'uso del kit (ad esempio: i puntali usati per controlli e campioni, micropiastre usate) dovrebbero essere maneggiati come potenzialmente infetti ed eliminati in accordo alle direttive nazionali e alle leggi concernenti lo smaltimento dei rifiuti di laboratorio.
19. Non pipettare con la bocca.

G. CAMPIONI: PREPARAZIONE E RACCOMANDAZIONI

1. Il sangue è estratto asetticamente con 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 viene 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 5 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 2000 rpm per 20 minuti o filtrare con filtri a 0.2-0.8µm per pulire il campione da testare.
7. Non usare campioni inattivati a caldo perché questi potrebbero dare origine a falsa reattività.
8. La conservazione dei campioni diluiti non è raccomandabile perché può provocare effetti dannosi alle performances del test.
9. Agitare i campioni prima del loro utilizzo.

H. PREPARAZIONE DEI COMPONENTI E AVVERTENZE

Studi condotti su un kit aperto non hanno mostrato alcuna rilevante perdita di attività fino a 2 mesi. Collocare i reagenti del kit a temperatura ambiente prima del loro utilizzo e per almeno 30 minuti. Prelevare solo il volume necessario per il test da eseguire. Riportare le rimanenti porzioni a +2...8°C.

1. Micropiastra

Permettere che la micropiastra raggiunga la temperatura ambiente (almeno 1h) prima di aprire la busta.

Le strips non utilizzate devono essere riposte nell'apposita busta, in presenza dell'essiccante fornito, sigillate fermamente e conservate a +2...8°C.

Dopo la prima apertura le strips residue sono stabili per due mesi o 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. Controlli Positivi

Pronto all'uso. Miscelare su vortex prima dell'uso. Maneggiare questi componenti come potenzialmente infettivi.

4. Coniugato # 1

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.

5. Coniugato # 2 Concentrato 100x

Reagente concentrato 100x da diluire con il Diluente del Coniugato # 2.

Esempio: Aggiungere 250 µL di Coniugato # 2 concentrato in 24,75 mL di Diluente del Coniugato # 2.

Una volta diluito, miscelare molto bene prima dell'uso.

Prestare attenzione per non contaminare il liquido diluito con ossidanti chimici, polveri o microbi presenti nell'aria.

Se questo componente deve essere trasferito usare solo contenitori di plastica possibilmente sterili.

6. Diluente Coniugato # 2

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

Il reagent è da usare per la diluizione del Coniugato # 2.

7. Diluente dei Campioni

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

8. Substrato TMB

Reagente pronto all'uso.

Miscelare su vortex prima dell'uso.

Prestare attenzione per non contaminare il liquido diluito 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.

9. Soluzione Bloccante

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

10. Soluzione di Lavaggio Concentrata 25x

La soluzione concentrate 25x deve essere diluita in acqua bidistillata di grado EIA e miscelata bene prima del suo utilizzo.

Esempio: Aggiungere 50 mL della soluzione concentrata 25x fino a 1200 mL con acqua deionizzata.

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.

Una volta diluita la soluzione di lavaggio è stabile per 6 giorni a +2...8°C.

I. STRUMENTAZIONE USATA IN COMBINAZIONE CON IL KIT

1. Le micropipette devono essere calibrate per dispensare 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. Dovrebbero inoltre essere tenute controllate per ottenere una precisione dell'1% e una correttezza di $\pm 2\%$.

2. L'incubatore ELISA dovrebbe essere tarato a +37°C (tolleranza di $\pm 0.5^\circ\text{C}$) e regolarmente controllato per assicurare il mantenimento della temperatura corretta. Sia incubatori a secco che bagni ad acqua sono utilizzabili per le incubazioni se gli strumenti sono validati per l'incubazione di tests ELISA.

3. Il lavatore ELISA è estremamente importante per la completa riuscita del saggio. Il lavatore deve essere validato con attenzione e correttamente ottimizzato usando apparati di controllo e kit di riferimento, prima di utilizzarlo per gli esami di routine.

5-3-5 cicli di lavaggio (aspirazione+dispensazione di 400 µL per pozzetto = 1 ciclo) sono sufficienti per assicurare che il saggio dia il risultato atteso.

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 nella sezione "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 $\pm 5\%$ (per la prima incubazione la tolleranza è tra 57 min e 63 min, per la seconda, terza e quarta inculazione la tolleranza è tra 29 min 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 (620-650nm) per le operazioni di bianco. Le sue prestazioni standard dovrebbero essere (a) ampiezza di banda $\leq 10\text{nm}$; (b) intervallo di assorbimento da 0 a ≥ 2.0 ; (c) linearità ≥ 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 eseguita regolarmente secondo le istruzioni del produttore.

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 Cromogeno/Substrato sia incolore o azzurro 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 il Coniugato # 2 come descritto sopra.
4. Diluire tutto il contenuto della soluzione di lavaggio concentrata 25X come descritto.
5. Permettere a tutti i componenti del kit di raggiungere la temperatura ambiente (circa 1h) e poi miscelare su vortex 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 trovato nella validazione dello strumento per il suo uso con il kit.
7. Controllare che il lettore ELISA sia acceso da almeno 20 minuti prima della lettura.
8. Se si utilizza una stazione di lavoro ELISA 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 (Manuale)

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.

1. Inserire il corretto numero di micropozzetti nell'apposito sostegno. Lasciare la prima cella vuota per le operazioni del bianco (facoltativo).
2. Dispensare 100 µL di Diluente Campioni in ciascun pozzetto tranne quello per l'operazione del bianco.
3. Aggiungere 100 µL di Campione, 100 µL di Controllo Negativo e Positivo in duplicato pipettando "su e giù" per l'omogeneizzazione.
Pipettare delicatamente per evitare fuoriuscite e contaminazioni dei pozzetti adiacenti.
Sigillare le strips con il foglio adesivo.
4. Incubare la micropiastra per **60 min a +37°C**.
5. Dopo l'incubazione, rimuovere la soluzione dai pozzetti invertendo la micropiastra e sbattendola su un foglio di carta assorbente. Lavare la micropiastra tramite 5 cicli di lavaggio in accordo con la procedura di lavaggio (capitolo I.3).
6. Aggiungere 200 µL di Coniugato # 1 in ogni pozzetto, tranne il primo pozzetto vuoto, e coprire con il foglio adesivo.
Nota importante: *Attenzione a non urtare la superficie della plastica interna della cella con il puntale pieno di Coniugato. Possono avvenire contaminazioni.*
7. Incubare la micropiastra per **30 min a +37°C**.
8. Dopo l'incubazione, rimuovere la soluzione dai pozzetti invertendo la micropiastra e sbattendola su un foglio di carta assorbente. Lavare la micropiastra

tramite 3 cicli di lavaggio in accordo con la procedura di lavaggio (capitolo I.3).

9. Dispensare 200 µL di Coniugato # 2 diluito in ciascun pozzetto, tranne il primo pozzetto vuoto, e coprire con il foglio adesivo.

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

10. Incubare la micropiastra per **30 min a +37°C**.
11. Dopo l'incubazione, rimuovere la soluzione dai pozzetti invertendo la micro piastra e sbattendola su un foglio di carta assorbente. Lavare la micropiastra tramite 5 cicli di lavaggio in accordo con la procedura di lavaggio (capitolo I.3).
12. Pipettare 150 µL di Substrato TMB in ciascun pozzetto, incluso in pozzetto vuoto.
13. Incubare la micropiastra per **30 min a +18...25°C**.
Nota importante: *Non esporre a forte illuminazione diretta. Può determinare fondi alti.*
14. Pipettare 100 µL di Soluzione Bloccante in ciascun pozzetto seguendo la stessa sequenza di pipettamento descritta nel punto 12 per fermare la reazione enzimatica. L'aggiunta di acido farà virare il controllo positivo ed i campioni positivi da blu a giallo.
15. Misurare l'intensità di colore della soluzione in ogni pozzetto, come descritto nel capitolo I.5, con un filtro di lettura a 450nm e possibilmente con un filtro a 600-650nm per le operazioni del bianco in posizione A1 della micro piastra.

La lettura deve essere eseguita subito dopo l'aggiunta della Soluzione Bloccante e comunque mai più di 30 minuti dopo tale aggiunta. Può avvenire una leggera auto-ossidazione del cromogeno che porta ad un risultato di fondo alto.

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 cromogeno e portare ad un risultato di fondo alto.

N. SCHEMA DEL SAGGIO

STEP	OPERAZIONI
Campione	Aggiungere 100 µL di Diluente Campioni. Aggiungere al diluente 100 µL di campione/controllo e pipettare "su e giù" per miscelare. Testare i Controlli Negativi e Positivi in duplicato. Incubare 60 minutes a 37°C.
Lavaggio	Eseguire 5 cicli di lavaggio.
Coniugato 1	Aggiungere ai pozzetti della micropiastra 200 µL di Coniugato 1 pronto all'uso. Incubare 30 minutes a 37°C.
Lavaggio	Eseguire 3 cicli di lavaggio.

STEP	OPERAZIONI
Coniugato 2	Aggiungere ai pozzetti della micropiastra 200 µL di Coniugato 2 diluito. Incubare 30 minutes a 37°C
Lavaggio	Eseguire 5 cicli di lavaggio.
Substrato TMB	Aggiungere ai pozzetti della micropiastra 150 µL di Substrato TMB.
Sviluppo colore	Incubare 30 minutes a +18...25°C.
Soluzione Bloccante	Aggiungere 100 µL di Soluzione Bloccante e leggere la Densità Ottica a 450nm tramite un lettore di micropiastre ELISA con un filtro a 600-650nm.

Un esempio di schema di dispensazione è riportato di seguito:

Micropiastra

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	PC3	S8									
B	NC	S1	S9									
C	NC	S2										
D	PC1	S3										
E	PC1	S4										
F	PC2	S5										
G	PC2	S6										
H	PC3	S7										

Legenda: BLK = Bianco NC = Controllo Negativo
 PC1 = Controllo Positivo HIV-1
 PC2 = Controllo Positivo HIV-2
 PC3 = Controllo Positivo HIV p-24
 S = Campione

O. CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO

Un controllo di validazione è eseguito sui controlli e/o sul calibratore ogni volta che il kit viene usato per verificare che le prestazioni del saggio siano conformi sia ai valori di OD450 sia ai valori attesi.

Controllare che i seguenti requisiti corrispondano:

Parametro	Requisiti
Bianco	< 0.100 OD450nm valore
Controllo Negativo (NC)	< 0.100 OD450nm valore medio dopo sottrazione del bianco
Controllo Positivo HIV-1	> 0.500 OD450nm valore
Controllo Positivo HIV-2	> 0.500 OD450nm valore
Controllo Positivo HIV p-24	> 0.500 OD450nm valore

Se i risultati del test corrispondono ai requisiti stabiliti sopra, procedere alla prossima sezione. Se non corrispondono, non procedere ulteriormente ed eseguire i seguenti controlli:

Problema	Controllo
Bianco > 0.100 OD450nm	1. che la soluzione substrato non si sia contaminata durante il saggio
Controllo Negativo (NC) > 0.100 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 soluzione di lavaggio corretta e che il lavatore sia stato avvinato prima dell'uso; 3. che nessun errore sia stato commesso nella procedura del saggio (che non sia stato dispensato il controllo positivo al posto del controllo negativo) 4. che non sia avvenuta nessuna contaminazione del controllo negativo o dei micropozzetti dove questo è stato dispensato dovute a campioni positivi, schizzi, o al 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.
Controlli Positivi < 0.500 OD450nm	1. che le procedure siano state eseguite correttamente; 2. che nessun errore sia avvenuto durante la sua distribuzione (es. dispensazione del controllo negativo al posto del controllo positivo). 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 alcuno dei problemi riportati sopra, informare il supervisore per ulteriori azioni.

P. CALCOLO DEI RISULTATI

P.1. Validità

In ogni esecuzione del test si devono includere: due Controlli Negativi (NC), due Controlli Positivi HIV-1 (PC1), due Controlli Positivi HIV-2 (PC2) e due Controlli HIV-1 p24 (PC3). I risultati per i controlli devono seguire i criteri di accettazione prima dell'interpretazione del risultato del campione.

Calcolo della Media del Controllo Negativo NC_{MEAN} :

Esempio:
 Assorbanza NC
 0.021
 0.025

 0.046

$$NC_{MEAN} = 0.046 / 2 = 0.023$$

La media di assorbanza dei Controlli Negativi, dopo la sottrazione del bianco, deve essere minore di 0.100. Se il valore medio è maggiore o uguale a 0.100, la run si deve ripetere.

Calcolo della Media del Controllo Positivo HIV-1 HIV1-PC_{MEAN}:

Esempio:

Assorbanza HIV1-PC

1.545

1.239

2.784

$$\text{HIV1-PC}_{\text{MEAN}} = 2.784 / 2 = 1.392$$

La media di assorbanza dei Controlli Positivi HIV-1 deve essere maggiore di 0.500. Se il valore medio è minore o uguale a 0.500, la run si deve ripetere.

Calcolo della Media del Controllo Positivo HIV-2 HIV2-PC_{MEAN}:

Esempio:

Assorbanza HIV2-PC

1.459

1.343

2.802

$$\text{HIV2-PC}_{\text{MEAN}} = 2.802 / 2 = 1.401$$

La media di assorbanza dei Controlli Positivi HIV-2 deve essere maggiore di 0.500. Se il valore medio è minore o uguale a 0.500, la run si deve ripetere.

Calcolo della Media del Controllo Positivo HIV-1 p24 HIV-1 p24-PC_{MEAN}:

Esempio:

Assorbanza HIV-1 p24-PC

2.223

2.172

4.395

$$\text{HIV-1 p24-PC}_{\text{MEAN}} = 4.395 / 2 = 2.198$$

La media di assorbanza dei Controlli Positivi HIV-1 p24 deve essere maggiore di 0.500. Se il valore medio è minore o uguale a 0.500, la run si deve ripetere.

P.2. Calcolo del Cut-Off

I risultati dei test sono calcolati sulla media di un valore di cut-off determinato con la seguente formula del valore medio OD_{450nm} del Controllo Negativo (NC) - OD_{450nm} Bianco:

$$(\text{NC}_{\text{mean}} - \text{bianco}) + 0.170 = \text{Cut-Off (Co)}$$

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

Nota importante: quando il calcolo dei risultati viene eseguito dal sistema operativo di un sistema automatico di lavoro ELISA, assicurarsi venga usata la corretta formulazione per il calcolo del cut-off e per generare la corretta interpretazione dei risultati.

Q. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

1. Secondo i criteri di questo test, i campioni con valori di assorbanza minori del valore del cut-off sono considerati non reattivi e negativi agli anticorpi HIV1+2 e HIV-1 p24. Non sono richiesti ulteriori test.
2. I campioni con valori di assorbanza uguali o maggiori al valore del cut-off sono da considerarsi reattivi o positivi agli anticorpi HIV-1 e/o HIV-2 o HIV-1 p24. Tali campioni (utilizzando il campione originale) devono essere testati di nuovo in duplicato prima di una conferma finale del risultato.
3. I campioni inizialmente reattivi, che non reagiscono in nessuno dei successivi test in duplicato, sono da considerarsi negativi agli anticorpi HIV1+2 e HIV-1 p24. Non sono richiesti ulteriori test.
4. Se uno od entrambi i valori testati di nuovo è uguale o maggiore al valore del cut-off, il campione è da considerarsi ripetutamente reattivo. I campioni ripetutamente reattivi vengono interpretati come positivi per la presenza di anticorpi HIV-1 e/o HIV-2 o HIV-1 p24. Nella maggior parte dei casi è meglio eseguire ulteriori test più specifici su questi campioni ripetutamente reattivi.

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 eseguendo un Test di Conferma prima che la diagnosi di infezione da HIV sia confermata.
3. Quando i risultati sono trasmessi dal laboratorio ad un centro informatico, prestare attenzione per non trasferire dati errati.
4. La diagnosi di infezione da HIV deve essere fatta e comunicata al paziente solo da personale medico qualificato.

R. PRESTAZIONI

La valutazione delle prestazioni è stata condotta in accordo con quanto riportato in Common Technical Specifications (CTS) come richiesto dall' art. 5, Capitolo 3 di IVD Direttiva 98/79/EC.

La valutazione delle prestazioni è stata condotta sia presso un centro esterno sia nei laboratori Adaltis al fine di completare lo studio.

R.1. SPECIFICITA' E SENSIBILITA'

R.1.1 Specificità

La specificità valutata su:

- ❖ 5014 donatori di sangue casuali europei provenienti da due centri inclusi 40 campioni provenienti da donatori alla prima donazione
- ❖ 201 Pazienti ospedalizzati
- ❖ 116 Campioni potenzialmente interferenti:
 - ✓ 27 Campioni provenienti da donne gravide (6 primipare, 17 pluripare e 4 sconosciute)
 - ✓ 27 Campioni positivi al Fattore Reumatoide (RF)
 - ✓ 25 Campioni emolizzati inclusi gravemente emolizzati
 - ✓ 27 Campioni con altre infezioni (4 HBV, 5 EBV, 5 HCV, 4 HSV, 5 Rubella, 4 Toxoplasmosi)
 - ✓ 5 Campioni con Iperbilirubinemia
 - ✓ 5 Campioni con Iperlipemia

- ❖ Sono stati testati 50 campioni [25 Positivi (HIV-1, HIV-2 e HIV-1 p24) e 25 Negativi] e non è stata rilevata nessuna differenza dovuta al metodo di preparazione del campione (plasma-siero, citrato, EDTA e Eparina).

Dei 5014 donatori di sangue casuali europei, 19 (diciannove) campioni erano inizialmente reattivi (IR) e sono stati testati in duplicato. Di questi campioni testati 17 (diciassette) sono risultati ripetutamente reattivi (RR) e sono stati sottoposti ad un test di conferma. Un solo campione è rimasto indeterminato.

Risultati del Test				
Stato Attuale	IR	RR	NEG	Totali
Negativi	18	16	4997	5013
Positivi	0	0	0	0
Indeterminati	1	1	0	1
Totale	19	17	4997	5014

E' stata trovata una specificità finale pari al 99.7%.

R.1.2 Sensibilità Analitica (Limite di Detenzione)

La sensibilità analitica è stata valutata in accordo con lo standard internazionale del WHO per HIV-1 p24 Antigen, First International Reference Reagent, NIBSC code 90/636.

E' stata preparata una diluizione in una matrice negativa (0.1-10 IU/mL). Questa diluizione è stata testata in tre differenti run (tre micropiastre) durante due test (due giorni). Per ogni singola run, è stata fatta una nuova diluizione dei campioni.

I risultati sono riportati nella seguente tabella.

Run	1	2	3
HIV-1 p24 (IU/mL)	OD/CO		
10	11.9	12.6	12.3
5	8.0	10.7	9.8
2.5	4.3	6.2	5.7
1	1.8	2.8	2.6
0.5	1.0	1.6	1.4
0.25	0.6	1.0	0.8
0.1	0.4	0.5	0.5
0	0.2	0.3	0.3

Il limite di sensibilità è stato stimato < 1.0 IU/mL

R.1.3 Sensibilità Diagnostica

La sensibilità diagnostica dell' EI Agen Detect HIV 4 Total Screening Kit è stata valutata su un pannello di 500 campioni HIV1/2 positivi, 31 pannelli di sieroconversione (forniti da by BBI-Seracare/ZeptoMetrix) e su 40 campioni di sieroconversione precoce.

In particolare:

- ❖ 500 Campioni Positivi (400 HIV-1 e 100 HIV-2 incluso i sottotipi A, B, C, D, F, G, H, J, K, CRF);
- ❖ 50 cell culture supernatants inclusi differenti sottotipi HIV-1 (gruppo M sottotipo da A a K, CRF01_AE, CRF02_AG, gruppo N, gruppo O) e HIV-2;
- ❖ 50 Campioni Positivi HIV-1 p24 Antigene
- ❖ 31 Pannelli di Sieroconversione (vedi la seguente tabella)

Pannello di Sieroconversione	Adaltis EI Agen	Test di 4.a gen.	Test di 3.a gen.	HIV-1 p24 antigene	NAT
	Numero del primo campione positivo del pannello				
Y-PRB925	5		5	5	5
AB/PRB927	2	2	2	2	2
AC/PRB928	2	2	2	2	2
AD/PRB929	3	3	6	3	3
AE PRB930	1		3	1	1
PRB933	2	2	2	2	2
PRB934	1	1	1	1	1
AP/PRB940	1	2	3	2	1
AQ/PRB941	3	4	4	3	2
AS/PRB943	3	3	6	3	2
AU PRB945	3		4	3	1
AW/PRB947	2	2	2	2	1
AX PRB948	3	4	4+	3	3
AZPRB950	2		4	2	2
BA PRB 951	3	3	5	3	3
PRB952	3	3	4	3	2
BE/PRB955	2	2	4	2	1
BF PRB 956	4	4	5	4	2
BI/PRB959	1	1	3	1	1
PRB960	7	8	9+	8	8
PRB962	5	5	6+	5	3
PRB963	6	6	7	6	5
PRB964	6+	6	ND	6	4
PRB965	4	2	4	2	1
PRB967	4	4	4	4	2
PRB968	7	7	7	7	5
6240	7	8	9	8	6
9028	6	6	ND	6	6
9077	12	12	14	12	12
9079	9	9	11	9	8
12007	4	4	5	ND	4

- ❖ 42 Campioni di Sieroconversione Precoce (positivi per antigene dell'HIV-1 p24 core e anticorpi HIV assenti o debolmente presenti – i risultati indeterminati testati al Western Blot test).

E' stata trovata una sensibilità finale pari al 100%.

R.2. PRECISIONE

La precisione del dispositivo è stata assegnata determinando i valori trovati tra Inter-Lot e tra Intra-Lot. Nelle tabelle sotto sono riportati i valori per il campione Negativo ed i campioni Positivi.

R.2.1 Risultati Intra-Lot:

EI Agen Detect HIV 4 Total Screening codice: 081311
1°Lotto

Campione	S/Co Media	Precisione - %CV		
		Inter-Saggio	Intra-Saggio	Totale
Negativo	0.37	23.2	4.5	23.6
Pos A-HIV 1	1.80	10.6	9.4	14.1
Pos A-HIV 2	1.91	10.7	7.7	13.1
Pos HIV-1 p24	2.14	10.9	4.6	11.8

EIAgen Detect HIV 4 Total Screening codice: 081311
2° Lottot

Campione	S/Co Media	Precisione - %CV		
		Inter-Saggio	Intra-Saggio	Totale
Negativo	0.40	12.6	10.8	16.6
Pos A-HIV 1	1.47	6.9	7.4	10.3
Pos A-HIV 2	1.53	7.6	8.1	11.1
Pos HIV-1 p24	1.78	4.6	4.9	6.7

EIAgen Detect HIV 4 Total Screening codice: 081311
3° Lotto

Campione	S/Co Media	Precisione - %CV		
		Inter-Saggio	Intra-Saggio	Totale
Negativo	0.52	18.7	5.4	19.5
Pos A-HIV 1	1.65	8.6	4.6	9.8
Pos A-HIV 2	1.78	9.7	4.9	10.9
Pos HIV-1 p24	2.05	7.4	4.6	8.7

EIAgen Detect HIV 4 Total Screening code: 081311
4° Lotto

Campione	S/Co Media	Precisione - %CV		
		Inter-Saggio	Intra-Saggio	Totale
Negativo	0.58	19.6	3.0	19.8
Pos A-HIV 1	1.59	9.4	1.4	9.5
Pos A-HIV 2	1.66	11.4	2.64	11.7
Pos HIV-1 p24	2.17	9.1	2.0	9.3

R.2.2 Risultati Inter-Lot:

Campione	S/Co Media	Precisione - %CV	
		Intra-Saggio	Totale
Negativo	0.48	18.4	26.5
Pos A-HIV 1	1.63	9.7	13.3
Pos A-HIV 2	1.72	9.9	14.2
Pos HIV-1 p24	2.03	8.6	12.1

R.2.3 Specifiche:

Intra Lot:

Inter-Saggio:

%CV su campioni positivi < 15%

%CV su campione negativo < 25%

Intra-Saggio:

%CV su campioni positivi < 15%

%CV su campione negativo < 25%

Inter lot:

Intra-Saggio:

%CV su campioni positivi < 15%

%CV su campione negativo < 25%

Precisione totale:

%CV su campioni positivi < 20%

%CV su campione negativo < 30%

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 errori.

ERRORE	POSSIBILI CAUSE / SUGGERIMENTI
OD molto diverse (± 50%) da quelle riportate nel QC	<ul style="list-style-type: none"> errato volume di dispensazione dei campioni o 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 all'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 (suggerimento: usare solo contenitori di plastica monouso puliti)
Risultati poco riproducibili	<ul style="list-style-type: none"> volume di dispensazione dei reagenti e campioni non costante (suggerimento: controllare la precisione delle pipette e la corrispondenza tra il volume dispensato e quello richiesto dal saggio, nel caso tararle nuovamente) errore nell'esecuzione dei lavaggi e della lettura fotometrica (suggerimento: controllare il funzionamento o le impostazioni dei rispettivi strumenti) contaminazione del substrato (suggerimento: usare contenitori di plastica monouso puliti) inquinamento o degradazione dei reagenti (suggerimenti: utilizzare puntali appropriati, contenitori per il travaso dei reagenti, monouso adatti e acqua distillata o equivalente)
Nessuna reazione colorimetrica dopo l'aggiunta del Substrato	<ul style="list-style-type: none"> alcuni reagenti non sono stati dispensati forte contaminazione dei coniugati o del substrato Errata sequenza di esecuzione (es. dispensazione accidentale di reagenti in una sequenza sbagliata o dal contenitore sbagliato)
Reazione troppo blanda (OD troppo basse)	<ul style="list-style-type: none"> tempo di incubazione troppo breve, temperature di incubazione troppo bassa errori nella diluizione del coniugato
Reazione troppo intensa (OD troppo alte)	<ul style="list-style-type: none"> Incorretta diluizione del coniugato tempo di incubazione troppo lungo o temperatura di incubazione troppo alta qualità scadente dell'acqua usata per la soluzione di lavaggio (basso grado di deionizzazione) lavaggio non efficiente (coniugato non propriamente rimosso)
Inspiegabili risultati aberranti	<ul style="list-style-type: none"> contaminazione delle pipette, dei puntali o dei contenitori lavaggio incostante e insufficiente (coniugato non propriamente rimosso)
CV% intrasaggio elevato	<ul style="list-style-type: none"> reagenti e/o strip non portate a temperatura ambiente prima dell'uso il lavatore per micropiastre non lava correttamente (suggerimento: pulire la testa del lavatore)

ERRORE	POSSIBILI CAUSE / SUGGERIMENTI
CV% intersaggio elevato	<ul style="list-style-type: none"> • condizioni di incubazione non costanti (tempo o temperature) • controlli e campioni non dispensati allo stesso tempo (con stessi intervalli; (suggerimento: controllare la sequenza di dispensazione) • variabilità intrinseca degli operatori

- Anticorpi anti-HIV potrebbero essere presenti a causa della volontaria partecipazione a uno studio sul vaccino per l'HIV. L'interpretazione di questo test diagnostico dipende dal tipo di vaccino somministrato. Per una diagnosi accurata dell'HIV su tali volontari può essere necessaria la correlazione con l'anamnesi e ulteriori test.

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

- Si raccomanda una lettura attenta e una piena comprensione di queste istruzioni per l'uso, prima di procedere all'utilizzo di questo kit. Per ottenere risultati attendibili, rispettare rigorosamente il protocollo indicato. In particolare, per un'accurata e riproducibile determinazione degli anticorpi anti-HIV-1 e anti-HIV-2 e dell'antigene p24, è essenziale la corretta dispensazione di campioni e reagenti, oltre a un attento lavaggio e al rispetto dei tempi di incubazione.
- Se possibile, utilizzare campioni di plasma o siero fresco. La degradazione del campione così come ripetuti cicli di congelamento-scongelo possono causare risultati errati. **Non utilizzare campioni inattivati termicamente.**
- Con kit di questo tipo è possibile ottenere risultati falsamente reattivi. La proporzione di campioni reattivi dipende dalla sensibilità e dalla specificità del kit e dalla prevalenza di anticorpi anti-HIV-1 e anti-HIV-2 nella popolazione testata.
- Una volta eseguito il test EIAgen Detect HIV 4 Total Screening Kit, i campioni risultati ripetutamente reattivi devono essere sottoposti a ulteriori controlli utilizzando i test WB (Western Blot), IFA (Indirect Immunofluorescence Assay) o RIPA (Radioimmunoprecipitation Assay). La determinazione che il campione di una persona contenga anticorpi anti-HIV e/o l'antigene HIV ha ampie implicazioni mediche, sociali, psicologiche ed economiche. Si raccomanda pertanto che massima riservatezza, valutazione medica e consulenze appropriate costituiscano un aspetto essenziale della sequenza dei test.
- L'AIDS e le condizioni AIDS-correlate possono essere definiti solo tramite un'adeguata diagnosi clinica. La diagnosi dell'AIDS non può essere determinata con il solo test EIA. Un risultato di non reattività in qualsiasi fase della sequenza dei test non esclude la possibilità di esposizione al virus HIV o di infezione. Il rischio che soggetti asintomatici, ripetutamente reattivi, sviluppino l'AIDS e/o condizioni AIDS-correlate non è tuttora noto.
- I risultati di questo test dovrebbero essere valutati congiuntamente a tutte le altre informazioni cliniche e diagnostiche.

BIBLIOGRAFIA

1. Alizon, M., Sonigo, P., Barré-Sinoussi, F., Chermann, J.-C., Tiollais, P., Montagnier, L. and Wain-Hobson, S., 1984. Molecular Cloning of Lymphadenopathy-Associated Virus. *Nature* 312:757-760.
2. Barré-Sinoussi, F., Chermann, J.-C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbrum, W. and Montagnier, L. 1983. Isolation of a T-lymphotropic Retrovirus from a Patient at Risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). *Science* 220:868-871.
3. Clavel, F., Mansinho, K., Chamaret, S. et al. 1987. Human Immunodeficiency Virus Type 2 Infection Associated with AIDS in West Africa. *N. Engl. J. Med.* 316:1180-1185.
4. Gallo, R.C., Salahuddin, S.Z., Popovic, M., Shearer, G.M., Kaplan, M., Haynes, B.F., Palker, T.J., Redfield, R., Oleske, J., Safal, B., White, G., Foster, P. and Markham, P.D. 1984. Frequent Detection and Isolation of Cytopathic Retroviruses (HTLV-III) from Patients with AIDS and at Risk for AIDS. *Science* 224:500-503.
5. Gold, J. and Dwyer, J., 1994. A Short History of AIDS. *Med. J. Aust.* 160:251-252.
6. Hahn, B.N., Shaw, G.M., Arya, S.K., Popovic, M., Gallo, R.C. and Wong-Staal, F., 1984. Molecular Cloning and Characterization of the HTLV-III Virus Associated with AIDS. *Nature* 312:166-169.
7. IVD Directive 98/79/CE, Common Technical Specifications (CTS) – Annex II, List A.
8. Lin, H.J. 1995. Laboratory Tests for Human Immunodeficiency Viruses. *J. Int. Fed. Clin. Chem.* 7:61-65.
9. Luciw, P.A., Potter, S.J., Steimer, K., Dina, D. and Levy, J.A., 1984. Molecular Cloning of AIDS-Associated Retrovirus. *Nature* 312:760-763.
10. Ly, T.D., Laperche, S., Brennan, C., Vallari, A., Ebel, A., Hunt, J., Martin, L., Daghfal, D., Schochetman, G. And Devare, S. 2004. Evaluation of the sensitivity and specificity of six HIV combined p24 antigen and antibody assays. *J. Virol. Meth.* 122: 185-194.
11. Popovic, M., Sarngadharan, M.G, Read, E., and Gallo, R.C., 1984. Detection, Isolation, and Continuous Production of Cytopathic Retrovirus (HTLV-III) from Patient with AIDS and Pre-AIDS. *Science* 224:497-500.
12. Sarngadharan, M.G., Popovic, M., Bruch, L., Schüpbach, J. and Gallo, R.C., 1984. Antibodies Reactive with Human T-Lymphotropic Retroviruses (HTLV-III) in the Serum of Patients with AIDS. *Science* 224:506-508.
13. Saville, R.D., Constantine, N.T., Cleghorn, F.R., Jack, N., Bartholomew, C., Edwards, J., Gomez, P. and Blattner, W.A. 2001. Fourth-generation enzyme-linked immunosorbent assay for the simultaneous detection of human immunodeficiency virus antigen and antibody. *J. Clin. Microbiol.* 39 (7): 2518-2524.
14. Sehulster, L.M., Hollinger, F.B., Dreesman, G.R. and Melnick, J.L., 1981. Immunological and Biophysical Alteration of Hepatitis B Virus Antigens by Sodium Hypochlorite Disinfection, *App. and Environ. Microbiol.* 42:762-767.
15. Sinicco, A., For a, R., Scalandra, M., Lucchini, A., Caramello, P. and Giovanni, P. 1993. Risk of Developing AIDS after Primary Acute HIV-1 Infection. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 6:575-581.
16. Spire, B., Montagnier, L., Barré-Sinoussi, F. and Chermann, J.-C., 1984. Inactivation of Lymphadenopathy Associated Virus by Chemical Disinfectants. *Lancet*: 889-901, Oct. 20.
17. Vézinet-Brun, F., Barré-Sinoussi, F., Salmot, A.G., Christol, D. Montagnier, L., Rouzioux, C., Klatzmann, D., Rozenbaum, W., Gluckmann, J.C. and Chermann, J.-C., 1984. Detection of IgG Antibodies to Lymphadenopathy-Associated Virus in Patients with AIDS or Lymphadenopathy Syndrome. *Lancet*: 1253-1256, June 9.
18. Weber, B., Thorstensson, R., Tanprasert, S., Schmitt, U. And Melchior, W. 2003. Reduction of the diagnostic window in three cases of human immunodeficiency-1 subtype E primary infection with fourth-generation HIV screening assays. *Vox Sanguinis* 85: 73-79.
19. World Health Organization. 2004. HIV assays: operational characteristics (Phase 1): report 15 antigen/antibody ELISAs. www.who.int/diagnostics_laboratory/publications/en/HIV_Report15.pdf.

EIAgen

Detect HIV 4 Total Screening Kit

REF 081311

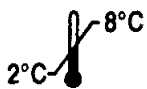
Σ 96

REF 081312

Σ 192

REF 081315

Σ 480



IVD

CE 0459

Estas instruções de utilização têm de ser lidas com atenção antes da utilização do produto. As instruções de utilização deverão ser rigorosamente cumpridas. A fiabilidade dos resultados do ensaio não pode ser garantida em caso de desvio a estas instruções de utilização.



Fabricado por:
Adaltis S.r.l
Via Durini, 27
20122 Milano (Italy)
Tel. +39-0774-5791 - Fax +39-0774-353085
www.adaltis.net

pt

SIMBOLOS USADOS NOS RÓTULOS

Português PT							
	Dispositivo Médico de Diagnóstico "in Vitro"	Código do Catálogo	Número de Lote	Atenção, consulte as Instruções de Utilização	Limite de Temperatura	Usar antes de	Número de Tests
					MICROPLATE	DIL SPE	CONTROL -
	Fabricado por...	Conservar ao Abrigo da Luz Solar	Risco biológico	Data de Fabricação	Microplaca	Diluyente de Amostras	Controle Negativo
	CONTROL+ HIV-1	CONTROL+ HIV-2	CONTROL+ HIV p-24	CONJ 1			
	Controle Positivo HIV-1	Controle Positivo HIV-2	Controle Positivo HIV p-24	Conjugado # 1			
	CONJ 2 100X	CONJ 2 DIL	SUBS TMB	SOLN STOP	WASH BUF 25X		
	Conjugado # 2 Concentrado 100x	Diluyente do Conjugado # 2	Substrato TMB	Solução de Paragem	Tampão de Lavagem Conc. 25x		

A. UTILIZAÇÃO PREVISTA

EIAgen Detect HIV 4 Total Screening Kit é um teste de quarta geração enzimo-imunoensaio que utiliza uma mistura de antígenos e anticorpos para rastreio diagnóstico in vitro em soro humano ou plasma (EDTA, Heparina e Citrato) em busca da presença de anticorpos anti-HIV-1, anti-HIV-2 e antígeno p24 do HIV-1.

Este kit é um ensaio combinado de Ag/Ac que não deve ser usado unicamente para a detecção do Antígeno p24 do HIV-1. Este kit é para uso diagnóstico in vitro por um profissional de cuidados de saúde e não serão vendidos para o público em geral.

B. INTRODUÇÃO

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) é um grupo de sintomas que resultam da incapacidade causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) ao sistema imune humano. A infecção pelo HIV pode avançar a uma fase sintomática, caracterizada por infecções oportunistas que podem causar a morte.

O agente etiológico da AIDS, HIV, tem como alvo tipos específicos de células T causando linfopenia e afetando as células T mediadoras da imunidade. O HIV é membro de uma família de retrovírus com duas subfamílias: HIV-1 e HIV-2. O HIV-1 é mais virulento e transmissível do que o HIV-2. O HIV-1 é a causa das infecções de HIV em nível mundial, enquanto que o HIV-2 é encontrado predominantemente na África Ocidental. Como a reação sorológica cruzada entre o HIV-1 e o HIV-2 é altamente variável e depende das amostras examinadas, são incluídos no ensaio antígenos para a detecção específica tanto do HIV-1 quanto do HIV-2.

O HIV é transmitido através do contato sexual com pessoas infectadas, ao compartilhar agulhas e seringas com pessoas infectadas e através da transfusão de sangue contaminado. Os ensaio-imunoensaios (tais como o EIAgen Detect HIV 4 Total Screening Kit) são recomendados para examinar o sangue e o plasma humano em busca da presença de anticorpos anti-HIV e antígeno p24 do HIV-1. A presença de anti-HIV-1 ou anti-HIV-2 no sangue indica uma infecção potencial por HIV-1 e/ou HIV-2 e, portanto, este sangue não deverá ser usado em transfusões ou para a fabricação de produtos injetáveis.

C. PRINCÍPIO DO PROCEDIMENTO

Antígenos que representam epítomos do HIV-1 gp41 e HIV-2 gp36 revestem as cavidades de uma microplaca junto com anticorpos monoclonais contra p24 do HIV-1. A amostra de soro ou de plasma é colocada na cavidade e, se anticorpos específicos para o HIV-1 e/ou HIV-2 (IgG, IgM ou IgA) estiverem presentes na amostra, serão formados complexos estáveis com os antígenos de HIV aderidos à cavidade. O antígeno p24 do HIV-1, se estiver presente na amostra, se unirá simultaneamente aos anticorpos desta cavidade e aos anticorpos detectores presentes no diluente de amostras. Os anticorpos não reagentes serão eliminados através da lavagem. Os complexos anticorpo-antígeno estáveis serão identificados através da adição sucessiva de antígenos biotinilados e estreptavidina conjugada com peroxidase de rabanete (HRP). Estes complexos anticorpo-antígeno são quantificados através da

atividade catalítica da peroxidase de rabanete. Em seguida, é agregada uma solução de substrato de peroxidase e se forma um produto de cor azul. Uma amostra positiva gera uma cor azul escura, enquanto uma cor azul muito clara, ou ausência de cor, indica que temos uma amostra negativa. Uma vez que a solução de bloqueio tenha sido agregada, a cor da solução mudará de azul para amarelo. A densidade ótica (OD) é medida em um espectrofotômetro (leitor ELISA) a 450 nm com um filtro de referência 600-650 nm e será proporcional à quantidade de anticorpos anti-HIV-1/2 e de p24 do HIV-1 presente na amostra.

D. COMPONENTES

Cada kit contém reagentes suficientes para realizar 96 testes (código 081311), 192 testes (código 081312) ou 480 testes (código 081315).

Microplaca	1
Controle Negativo	1x2 mL/frasco
Controle Positivo para HIV-1	1x2 mL/frasco
Controle Positivo para HIV-2	1x2 mL/frasco
Controle Positivo para HIV p-24	1x2 mL/frasco
Conjugado # 1	1x25 mL/frasco
Conjugado # 2 Concentrado 100x	1x0.25 mL/ frasco
Diluyente do Conjugado # 2	1x25 mL/frasco
Diluyente de Amostras	1x12.5 mL/frasco
Substrato TMB	1x40 mL/frasco
Solução de Paragem	1x15 mL/frasco
Tampão de Lavagem Conc. 25x	1x50 mL/frasco
Adesivos para a placa	2
Número de testes	96
Código	081311

Microplaca	2
Controle Negativo	1x2 mL/frasco
Controle Positivo para HIV-1	1x2 mL/frasco
Controle Positivo para HIV-2	1x2 mL/frasco
Controle Positivo para HIV p-24	1x2 mL/frasco
Conjugado # 1	2x25 mL/frascos
Conjugado # 2 Concentrado 100x	2x0.25 mL/frascos
Diluyente do Conjugado # 2	2x25 mL/frascos
Diluyente de Amostras	2x12.5 mL/frascos
Substrato TMB	2x40 mL/frascos
Solução de Paragem	2x40 mL/frasco
Tampão de Lavagem Conc. 25x	2x50 mL/frascos
Adesivos para a placa	4
Número de testes	192
Código	081312

Microplaca	5
Controle Negativo	1x4 mL/frasco
Controle Positivo para HIV-1	1x4 mL/frasco
Controle Positivo para HIV-2	1x4 mL/frasco
Controle Positivo para HIV p-24	1x4 mL/frasco
Conjugado # 1	5x25 mL/frascos
Conjugado # 2 Concentrado 100x	5x0.25 mL/frascos
Diluyente do Conjugado # 2	5x25 mL/frascos
Diluyente de Amostras	5x12.5 mL/frascos
Substrato TMB	3x40 mL/frasco
Solução de Paragem	2x40 mL/frasco
Tampão de Lavagem Conc. 25x	5x50 mL/frasco
Adesivos para a placa	10
Número de testes	480
Código	081315

1. Microplaca:

12 x 8 12 tiras de 8 cavidades rompíveis revestidas com peptídeos de HIV específicos do gp36 e gp41 e proteína do gp41 junto com anticorpos monoclonais específicos contra o Antígeno p24 do HIV-1.

As microplacas estarão seladas dentro de uma bolsa de alumínio com dessecante.

Leve a microplaca à temperatura ambiente (+18...24°C) antes de abrir a bolsa. As tiras que não tenham sido usadas devem ser depositadas novamente dentro da bolsa, que deve ser selada para ser guardada a uma temperatura de +2...8°C, em presença do dessecante.

2. Controle Negativo

Controle pronto para usar. Contém soro humano negativo para anticorpos contra o HIV e para antígeno p24 e 0,05% de Proclin 300 como conservante.

3. Controle Positivo para HIV-1

Controle pronto para usar. Contém soro humano positivo para anticorpos contra o HIV-1 e 0,05% de Proclin 300 como conservante.

Observação importante: Não se pode assegurar totalmente a ausência de patógenos viáveis no controle positivo, portanto o controle deveria ser manipulado como sendo de potencial risco biológico, de acordo com as práticas recomendadas do laboratório.

4. Controle Positivo para HIV-2

Controle pronto para usar. Contém soro humano positivo para anticorpos contra o HIV-2 e 0,05% de Proclin 300 como conservante.

Observação importante: Não se pode assegurar totalmente a ausência de patógenos viáveis no controle positivo, portanto o controle deveria ser manipulado como sendo de potencial risco biológico, de acordo com as práticas recomendadas do laboratório.

5. Controle Positivo para HIV p-24

Controle pronto para usar. Contém proteína recombinante do HIV-1 p24 e 0,05% de Proclin 300 como conservante.

6. Conjugado # 1

Pronto para usar. Reagente codificado na cor azul. Contém uma mistura de antígenos biotinilados em um tampão de fosfato e 0,05% de Proclin 300 como conservante.

7. Conjugado # 2 Concentrado 100x

Solução concentrada a 100x. Este contém peroxidase de rabanete conjugada com Estreptavidina em um tampão estabilizador com conservante.

Reagente para ser diluído com o Diluente do Conjugado # 2.

Observação Importante: Porções não utilizadas do Conjugado # 2 diluído podem ser guardadas por um máximo de 6 dias a +2...8°C.

8. Diluente do Conjugado # 2

Pronto para usar. Reagente codificado na cor laranja. O reagente é usado para a diluição do Conjugado # 2. Concentrado 100x. Contém tampão fosfato e 0,05% de Proclin 300 como conservante.

9. Diluente de Amostras

Pronto para usar. Reagente codificado na cor vermelha. Contém componentes ativos, 1,0% v/v de proteínas agregadas de soro de camundongo, 0,1% w/v de IgG humana agregada e 0,05% de Proclin 300 como conservante.

10. Substrato TMB

Pronto para usar. Contém 0,26 mg/mL de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) e 0,01% w/v de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em um tampão citrato.

Misture suavemente antes de usar.

OBSERVAÇÃO:

É altamente sensível à luz. Armazenar ao abrigo da luz.

11. Solução de Paragem

Pronta para usar.

Contém uma solução 0,3 M de H₂SO₄.

Misture suavemente antes de usar.

A MSDS (folha de segurança) está disponível para o pessoal do laboratório mediante solicitação prévia.

12. Tampão de Lavagem Conc. 25x

Contém 0,2% de Proclin 300 como conservante. Uma vez diluída, a solução de lavagem (tampão de lavagem diluído) contém tampão fosfato salino, Proclin 300 e Tween 20 como conservantes.

Uma vez diluída, a solução de lavagem se manterá estável durante 6 dias a +2...8°C

E. MATERIAL NECESSÁRIO NÃO INCLUÍDO

1. Micropipetas calibradas de 200 µL, 50 µL e 10 µL e ponteiros descartáveis de plástico.
2. Água de grau EIA (água duplamente destilada ou de-ionizada, tratada com carvão vegetal para eliminar substâncias oxidantes usadas como desinfetantes).
3. Cronômetro com um intervalo de 60 minutos ou mais.
4. Papel absorvente
5. Incubador termostático calibrado para microplacas de ELISA (seco ou úmido) configurado a +37°C (±0,5°C de tolerância)
6. Leitor calibrado de microplacas de ELISA com 450 nm (leitura) e, se possível, com filtros de 600-650 nm (branco).
7. Lavador calibrado para microplacas de ELISA.
8. Vortex ou dispositivo de mistura similar.

F. ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

1. O kit só deve ser utilizado por pessoal técnico especializado e devidamente treinado, sob a supervisão de um médico responsável do laboratório.

Estas instruções de utilização têm de ser lidas atentamente antes da utilização do produto.

2. Todo o pessoal envolvido na execução do ensaio deve usar vestuário de protecção, luvas sem talco e óculos. Evite a utilização de material pontiagudo (agulhas) ou cortante (lâminas). Todo o pessoal envolvido deve receber formação em procedimentos de biosegurança, conforme recomendado pelo Centro para o Controlo de Doenças, Atlanta, EUA, e indicado na publicação do Instituto Nacional de Saúde: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.

3. Todo o pessoal envolvido no manuseamento de amostras deve estar vacinado contra o HBV e HAV, agentes para os quais existe uma vacina segura e eficaz.
4. O ambiente do laboratório deve estar controlado para evitar toda e qualquer contaminação causada pelo pó ou por micróbios transportados pelo ar aquando da abertura dos frascos e das microplacas e da execução do ensaio. Mantenha o Cromogénio (TMB) ao abrigo da luz forte e evite vibrações na bancada de trabalho aquando da execução do ensaio.
5. Aquando da recepção, conserve o kit num frigorífico ou numa câmara fria à temperatura controlada de 2...8°C.
6. Não utilize componentes de lotes diferentes. Recomendamos que não utilize componentes de dois kits do mesmo lote.
7. Certifique-se de que os reagentes estão límpidos e não contêm partículas ou agregados pesados e visíveis. Caso contrário, alerte o supervisor do laboratório de forma a iniciar os procedimentos necessários para a substituição do kit.
8. Evite contaminações cruzadas entre amostras de soro/plasma utilizando pontas descartáveis e mudando-as depois de cada utilização.
9. Evite contaminações cruzadas entre os reagentes do kit utilizando pontas descartáveis e mudando-as entre cada utilização.
10. Não utilize o kit após o prazo de validade indicado na embalagem externa e nos rótulos internos (frascos).
11. Manuseie as amostras como sendo potencialmente infecciosas. Todas as amostras de soro humano devem ser manuseadas no Nível 2 de Bio-Segurança, conforme recomendado pelo Centro para o Controlo de Doenças, Atlanta, EUA, de acordo com as indicações da publicação do Instituto de Saúde: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
12. Recomendamos a utilização de materiais de plástico descartáveis na preparação dos componentes líquidos ou na transferência dos componentes para estações de trabalho automáticas, para evitar contaminações cruzadas.
13. Os desperdícios produzidos durante o uso do kit devem ser eliminados de acordo com as normas nacionais relativas à eliminação de substâncias químicas e biológicas. De referir, em particular, os desperdícios líquidos gerados pelos procedimentos de lavagem e os resíduos dos controlos e das amostras, os quais devem ser tratados como materiais potencialmente infecciosos e, logo, inactivados antes de serem eliminados. Sugerimos, como processos de inactivação, o tratamento com uma solução de lixívia doméstica com uma concentração final de 10% durante 16-18 horas ou a inactivação pelo calor, por autoclave, a 121°C durante 20 minutos.
14. Eventuais derrames acidentais das amostras durante as operações devem ser limpos com papel absorvente embebido em lixívia doméstica e, depois, com água. O papel utilizado deve, depois, ser depositado nos contentores próprios para resíduos laboratoriais/hospitalares.
15. A solução de paragem contém 0,3 M de ácido sulfúrico. Evite o contacto com a pele e com os olhos. Em caso de contacto, enxagúe imediatamente a área afectada com uma quantidade abundante de água.
16. Elimine as soluções de reagentes que contenham azida de sódio e timerosal como conservantes de acordo com todas as regulamentações locais, distritais e nacionais. Para eliminar os reagentes que contêm azida, efectue as descargas com grandes quantidades de água. Elimine-os com a devida cautela, pois a azida de sódio pode formar compostos explosivos após um contacto prolongado com o cobre ou o chumbo das canalizações.
17. Não fume, coma ou aplique cosméticos nas áreas destinadas ao manuseamento de amostras ou reagentes.
18. Os restantes desperdícios gerados pela utilização do kit (exemplo: as pontas utilizadas para as amostras e os controlos, as microplacas usadas, etc.) devem ser manuseados como sendo potencialmente infecciosos e eliminados segundo as directivas nacionais e a legislação em vigor relativa à eliminação de resíduos laboratoriais.
19. Não efectue a pipetagem com a boca.

G. AMOSTRAS: PREPARAÇÃO E ADVERTÊNCIAS

1. O sangue deve ser extraído asépticamente por punção venosa e o plasma ou soro preparado segundo as técnicas padrão para a preparação de amostras de laboratório. Não foi observado nenhum efeito na preparação da amostra com citrato, EDTA e heparina.
2. Evite qualquer adição de conservantes às amostras, especialmente azida sódica, porque esta substância afeta a atividade enzimática do conjugado e gera falsos negativos.
3. As amostras devem estar claramente identificadas com códigos ou nomes, para evitar a má interpretação dos resultados. Quando o kit for utilizado para analisar unidades de sangue, recomenda-se enfaticamente a utilização de etiquetas de códigos de barras.
4. As amostras hemolisadas (vermelhas) e as visivelmente hiperlipidémicas (leitosas) devem ser descartadas porque poderiam gerar resultados falsos. As amostras que contêm resíduos de fibrina ou partículas grossas ou filamentos microbianos e outro tipo de corpos estranhos devem ser descartadas porque poderiam ocasionar resultados falsos.
5. O soro e o plasma podem ser guardados a +2...8°C por até cinco dias após a sua obtenção. Para períodos maiores, as amostras podem ser guardadas congeladas a -20°C por vários meses. Nenhuma amostra congelada deve ser congelada/descongelada mais de uma vez, porque isso poderia afetar o resultado final do teste.
6. Se houver partículas presentes, centrifugue a 2.000 rpm durante 20 minutos ou filtre usando filtros de 0,2-0,8 µ para limpar a amostra.
7. Não use amostras inativadas por calor, porque elas podem originar uma falsa reatividade.

8. Não é aconselhável guardar as amostras diluídas, o que pode afetar negativamente o desempenho do teste.
9. Misture as amostras antes de usá-las.

H. PREPARAÇÃO DE COMPONENTES E ADVERTÊNCIAS

Um estudo realizado com um kit aberto não detectou nenhuma perda relevante de atividade até os 2 meses. Permita que os reagentes alcancem a temperatura ambiente (+18...24°C) pelo menos 30 minutos antes do uso. Utilize apenas o volume necessário para o teste. Volte a guardar o resto a +2...8°C.

1. Microplaca

Permita que a microplaca alcance a temperatura ambiente (1 hora) antes de abrir o recipiente.

As tiras não usadas devem ser devolvidas ao envelope de alumínio firmemente fechado, para serem guardadas a +2...8°C.

Quando abrir o kit pela primeira vez, as tiras restantes permanecerão estáveis por até dois meses ou até que o indicador de umidade que está no interior do envelope dessecante passe de amarelo a verde.

2. Controle negativo

Pronto para usar. Misture bem antes de usar o vortex.

3. Controles positivos

Prontos para usar. Misture bem no Vortex antes de usar. Manipule este componente como potencialmente infeccioso.

4. Conjugado # 1:

Pronto para usar. Misture bem antes de usar.

Seja cuidadoso e não contamine o líquido com químicos oxidantes, pó ou micro-organismos que pairam no ar.

Se este componente tiver que ser transferido, use apenas plástico; se possível, recipientes descartáveis estéreis.

5. Conjugado # 2 Concentrado 100x

O reagente concentrado 100x deve ser diluído no Diluente do Conjugado # 2.

Exemplo: Adicione 250 µL de Conjugado Concentrado # 2 a 24,75 mL de Diluente do Conjugado # 2.

Uma vez diluído, misture cuidadosamente antes de usar.

Uma vez diluído, procure não contaminar o líquido com substâncias oxidantes, poeira ou micro-organismos presentes no ar. Se o componente tiver que ser transferido, use apenas plástico; se possível, recipientes descartáveis estéreis.

6. Diluente do Conjugado # 2:

Pronto para usar. Misture bem no Vortex antes de usar.

O reagente é usado para a diluição do Conjugado # 2.

7. Diluente de amostras

Reagente pronto para ser usado. Misture bem no Vortex antes de usar.

8. Substrato TMB

Componente pronto para ser usado.

Misture bem no Vortex antes de usar.

Seja cuidadoso para não contaminar o líquido com agentes oxidantes, pó ou micróbios presentes no ar.

Não exponha o TMB a fontes de iluminação intensa, agentes oxidantes ou superfícies metálicas.

Se o componente tiver que ser transferido, use apenas plástico; se possível, recipientes descartáveis estéreis.

9. Solução de Paragem

Pronta para usar. Misture bem no Vortex antes de usar.

10. Tampão de lavagem concentrado 25x.

A solução concentrada 25x deve ser diluída em água grau EIA e misturada cuidadosamente antes de usar. Exemplo: Adicione 50 mL de solução de lavagem 25x a 1200 mL de água deionizada.

Talvez apareçam alguns cristais de sal no frasco; tenha o cuidado de dissolver todo o conteúdo durante a preparação da solução. Evite a formação de espuma durante a preparação, já que esta poderia ocasionar uma lavagem ruim. Uma vez diluída, a solução de lavagem se manterá estável até 6 dias a 2...8°C.

I. INSTRUMENTOS E MATERIAIS A USAR EM COMBINAÇÃO COM O KIT

1. As micropipetas devem estar calibradas para proporcionar o volume correto requerido pelo ensaio e as partes da pipeta que podem entrar acidentalmente em contato com as amostras devem ser submetidas regularmente a um processo de descontaminação (álcool doméstico a 10%, solução de hipoclorito, desinfetantes de grau hospitalar). Elas também deveriam ser regularmente submetidas a manutenção. Também deve ser realizada regularmente a descontaminação de derrames ou resíduos nos componentes do equipamento. A manutenção deve ser regular, de forma que a precisão dos resultados seja de 1%, com uma confiabilidade de $\pm 2\%$.
2. A temperatura da incubadora de ELISA deve ser fixada em +37°C (tolerância de $\pm 0,5^\circ\text{C}$) e deve ser revisada regularmente para garantir que a temperatura correta seja mantida. Tanto a incubadora quanto os banhos de água são adequados para a incubação dos testes de ELISA.
3. A lavadora de ELISA é extremamente importante para o desempenho de todo o teste em geral. A lavadora deve ser cuidadosamente validada e corretamente otimizada, utilizando os controles do equipamento e os painéis de referência antes de usá-la nos exames de laboratório de rotina.
5-3-5 ciclos de lavagem (aspiração +dispensação de 400 µL/cavidade de solução de lavagem = 1 ciclo) são suficientes para garantir que o ensaio funcione como esperado. Para estabelecer seus ajustes corretamente, recomenda-se realizar um teste com os controles do equipamento e amostras de referência que estejam bem identificadas como negativa e positiva. Verifique os valores informados abaixo, na seção "Controle de qualidade interno". De acordo com as instruções do fabricante, deve ser realizada uma calibração regular da lavadora, dos volumes dispensados e sua manutenção (descontaminação e limpeza das agulhas).
4. O tempo de incubação tem uma tolerância de $\pm 5\%$ (ou, para a primeira incubação a tolerância vai de 57

minutos a 63 minutos; para a 2ª, 3ª e 4ª incubações, a tolerância está entre 29 e 31 minutos).

5. A leitora de ELISA deve estar equipada com um filtro de leitura de 450 nm e, idealmente, com um segundo filtro (600-650 nm), caso seja necessário um branco. Seu comportamento padrão deveria ser (a) largura de banda ≤ 10 nm; (b) intervalo de absorvância de 0 a $\geq 2,0$ (c) linearidade a $\geq 2,0$; confiabilidade $\geq 1\%$. O branco é realizado na cavidade identificada na seção "Procedimento do ensaio". O sistema ótico da leitora deve ser calibrado regularmente para garantir que a densidade ótica obtida seja a correta. A manutenção deve ser feita regularmente, de acordo com as instruções do fabricante.

L. CONTROLOS E OPERAÇÕES PRÉ-ENSAIO

1. Verifique a data de validade do kit, impressa na etiqueta externa. Não use o kit se a data estiver vencida.
2. Verifique se os componentes líquidos estão contaminados com partículas visíveis ou agregadas. Certifique-se de que o substrato não tenha cor, ou tenha uma cor azul muito pálida. Para fazer isso, basta aspirar uma pequena quantidade com uma pipeta de plástico estéril. Assegure-se de que não tenha sofrido nenhum dano durante o transporte e que não haja derramamento de líquidos na caixa. Também verifique se o envelope de alumínio que contém a microplaca não está amassado ou danificado.
3. Dilua o Conjugado # 2 como foi descrito acima.
4. Dilua o conteúdo do tampão de lavagem concentrado 25x como descrito acima.
5. Deixe que todos os outros componentes alcancem a temperatura ambiente (aproximadamente 1 hora) e, então, misture suavemente todos os reagentes líquidos usando o Vortex, como descrito.
6. Ajuste a incubadora de ELISA a $+37^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ e prepare a lavadora de ELISA purificando-o com a solução de lavagem diluída tal como indica o fabricante. Estabeleça o número correto de ciclos, como encontrado na validação do instrumento para a utilização com o equipamento.
7. Verifique se a leitora de ELISA está ligada ou assegure-se de que estará ligada pelos menos 20 minutos antes da leitura.
8. Se estiver usando um equipamento automático, ligue-o e verifique se sua configuração está correta para o protocolo do ensaio.
9. Verifique se as micropipetas são adequadas ao volume que vai manipular.
10. Verifique se o resto do equipamento está disponível e pronto para usar.
11. Caso haja problemas, não prossiga com o teste e avise o seu supervisor.

M. PROCEDIMENTO DO ENSAIO (Manual)

O ensaio deve ser realizado de acordo com o estabelecido mais abaixo, tendo o cuidado de manter o mesmo tempo de incubação para todas as amostras do teste.

1. Coloque o número necessário de cavidades na moldura da microplaca. Deixe a primeira cavidade vazia para o branco (opcional).
2. Distribua 100 μL de diluente de amostras em cada cavidade exceto a cavidade de branco.
3. Adicione 100 μL de amostra. Adicione 100 μL de Controles Positivo e Negativo por duplicata. Aspirar e expirar para cima e para baixo para homogeneizar. Pipete suavemente para evitar derramamentos e a contaminação das cavidades adjacentes. Sele as tiras com a lâmina adesiva.
4. Incube a microplaca durante **60 minutos a $+37^{\circ}\text{C}$** .
5. Depois da incubação, elimine a solução das cavidades invertendo a microplaca e batendo-a contra uma folha de papel absorvente. Lave a placa de microtitulação por 5 ciclos, de acordo com o procedimento de lavagem.
6. Adicione 200 μL de Conjugado # 1 dentro de cada cavidade, exceto a primeira que é para o branco, e cubra com a lâmina adesiva.
Observação importante: Tenha cuidado para não tocar o plástico interior das cavidades com a ponta cheia do conjugado. Poderia ocorrer uma contaminação.
7. Incube a microplaca durante **30 minutos a $+37^{\circ}\text{C}$** .
8. Depois da incubação, elimine a solução das cavidades invertendo a microplaca e batendo-a contra uma folha de papel absorvente. Lave a placa de microtitulação por 3 ciclos, de acordo com o procedimento de lavagem.
9. Distribua 200 μL de Conjugado # 2 diluído em cada cavidade, exceto a primeira, que é para o branco, e cubra com a lâmina adesiva.
Observação importante: Tenha cuidado para não tocar o plástico interior das cavidades com a ponta cheia do conjugado. Poderia ocorrer uma contaminação.
10. Incube a microplaca durante **30 minutos a $+37^{\circ}\text{C}$** .
11. Depois da incubação, remova a solução das cavidades invertendo a microplaca e batendo-a contra uma folha de papel absorvente. Lave a placa de microtitulação por 5 ciclos, de acordo com o procedimento de lavagem.
12. Distribua 150 μL de Substrato TMB dentro de cada cavidade, incluindo a do branco.
13. Incube a microplaca durante **30 minutos a $+18...25^{\circ}\text{C}$** .
Observação importante: Não exponha diretamente a fontes de iluminação. Poderia ser gerado um ruído de fundo alto.
14. Distribua 100 μL de solução de bloqueio nas cavidades usando a mesma frequência de pipetamento do passo 12 para interromper a reação enzimática. A adição de ácido fará com que o controle positivo e as amostras positivas passem de azul a amarelo.
15. Meça a intensidade da cor da solução em cada cavidade, como descrito no procedimento de leitura com filtro de 450 nm (leitura) e, se possível, de 600-650 nm (subtração de fundo), realizando o branco do instrumento em A1.
A leitura deve ser feita logo depois da adição da solução de bloqueio e, em qualquer caso, nunca depois de 30 minutos após a adição. É possível que

ocorra uma auto-oxidação do cromógeno, que ocasione um ruído de fundo alto.

Observações importantes:

1. Se o segundo filtro não estiver disponível, assegure-se de que não haja impressões digitais no fundo da cavidade antes da leitura em 450 nm. As impressões digitais podem gerar resultados falsos positivos na leitura.
2. Idealmente, a leitura deveria ser feita imediatamente após a adição da solução de bloqueio, mas definitivamente não mais do que 20 minutos depois. É possível que ocorra uma auto-oxidação do cromógeno, que ocasione um ruído de fundo alto.

N. ESQUEMA DO ENSAIO

PASSO	PROCEDIMENTO
Amostra	Adicionar 100 µL de diluente de amostras. Adicionar 100 µL de amostra/controle ao diluente e pipetar para cima e para baixo para misturar. Distribua os controles positivo e negativo em duplicata. Incube por 60 minutos a 37°C.
Lavagem	Realize o passo de lavagem 5x.
Conjugado 1	Adicionar 200 µL de Conjugado 1 pronto para usar às cavidades da placa de microtitulação. Incube durante 30 minutos a 37°C.
Lavagem	Realize o passo de lavagem 3x.
Conjugado 2	Adicionar 200 µL de Conjugado 2 às cavidades da placa de microtitulação. Incube durante 30 minutos a 37°C.
Lavagem	Realize o passo de lavagem 5x.
Substrato TMB	Adicionar 150 µL de substrato TMB às cavidades da placa de microtitulação.
Desenvolvimento da cor	Incube por 30 minutos a 18...25°C.
Bloqueio	Adicionar 100 µL de solução de bloqueio e ler a DO DO a 450 nm, com comprimento de onda de referência a 600-650 nm, em uma leitora de ELISA.

Um exemplo de esquema de dispensação está descrito na tabela abaixo:

Microplaca

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	PC3	S8									
B	NC	S1	S9									
C	NC	S2										
D	PC1	S3										
E	PC1	S4										
F	PC2	S5										
G	PC2	S6										
H	PC3	S7										

Legenda: BLK = Branco NC = Controle Negativo
PC1 = Controle Positivo HIV-1 PC2 = Controle Positivo HIV-2
PC3 = Controle Positivo HIV p-24 S = Amostra

O. CONTROLE DE QUALIDADE INTERNO

Sempre é necessário realizar um exame dos controles e/ou calibradores para verificar se os valores esperados de Densidade Ótica a 450 nm foram atingidos no ensaio.

Assegure-se de que os seguintes parâmetros tenham sido cumpridos:

Verificar	Requisito
Branco	OD 450 nm < 0.100
Controle Negativo (NC)	OD média 450 nm depois de subtrair o branco <0,100
Controle Positivo HIV-1	OD 450 nm > 0.500
Controle Positivo HIV-2	OD 450 nm > 0.500
Controle Positivo HIV p-24	OD 450 nm > 0.500

Se os resultados do exame estiverem de acordo com os requisitos estabelecidos acima, prossiga para a próxima seção.

Se os resultados não estiverem de acordo, não prossiga e faça as seguintes verificações:

Problema	Verificar
Branco OD450 nm >0.100	1. Se a solução do substrato se contaminou durante o ensaio.
Controle Negativo (NC) OD450 nm > 0.100 depois de subtrair o branco	1. Se o procedimento de lavagem e a configuração da lavadora foram validados no estudo de pré-qualificação. 2. Se foi usada a solução de lavagem correta e se a lavadora foi purgada com ela antes do uso. 3. Se não foi cometido algum erro no procedimento do ensaio (dispensação de um controle positivo em vez de um controle negativo). 4. Se não ocorreu contaminação do controle negativo ou das cavidades nas quais foi distribuído o controle, devido a derramamentos de amostras positivas ou conjugado enzimático. 5. Que as micropipetas não se hajam contaminado com amostras positivas ou conjugado enzimático. 6. Que as agulhas da lavadora não estejam bloqueadas ou parcialmente obstruídas.
Controles Positivos OD4500 nm < 0.500	1. Se o ensaio foi realizado corretamente. 2. Se não ocorreram erros durante a distribuição do controle (distribuir controle negativo, em vez de positivo). 3. Se o procedimento de lavagem e a configuração da lavadora foram validados no estudo de pré-qualificação. 4. Se não houve uma contaminação externa do controle positivo.

Se ocorreu algum dos problemas mencionados acima, informe-o ao supervisor para que as medidas corretivas sejam tomadas.

P. CÁLCULO DE RESULTADOS

P.1. Validação

Em cada ensaio, devem ser incluídos dois controles negativos (NC), dois controles positivos (PC1) HIV-1, dois controles positivos (PC2) HIV-2 e dois controles p24 (PC3) HIV-1. Os resultados dos controles devem estar dentro do critério de aceitação antes que qualquer resultado de amostra possa ser interpretado.

Cálculo da média do Controle Negativo NC_{Média}:

Exemplo: Absorbância do NC

0,021
0,025

0,046

$$NC_{Média} = 0,046 / 2 = 0,023$$

A média da absorbância do controle negativo, depois de subtrair o branco, deve ser menor do que 0,100. Se o valor da média for igual ou maior do que 0,100, o ensaio deverá ser repetido.

Cálculo da média do Controle Positivo HIV-1 PC_{Média}:

Exemplo: Absorbância do HIV-1 PC

1,545
1,239

2,784

$$HIV-1 PC_{Média} = 2,784 / 2 = 1,392$$

A média da absorbância do controle positivo HIV-1 deve ser maior do que 0,500. Se o valor for igual ou menor do que 0,500, o ensaio deverá ser repetido.

Cálculo da média do Controle Positivo HIV-2 PC_{Média}:

Exemplo: Absorbância do HIV-2 PC

1,459
1,343

2,802

$$HIV-2 PC_{Média} = 2,802 / 2 = 1,401$$

A média da absorbância do controle positivo HIV-2 deve ser maior do que 0,500. Se o valor da média for igual ou menor do que 0,500, o ensaio deverá ser repetido.

O cálculo da média do Controle Positivo p24 HIV-1 p24PC_{Média}:

Exemplo: Absorbância do HIV-1 p24 PC

2,223
2,172

4,395

$$HIV-1 p24 PC_{Média} = 4,395 / 2 = 2,198$$

A média da absorbância do Controle Positivo HIV-1 p24 deve ser maior do que 0,500. Se o valor da média for

igual ou menor do que 0,500, o ensaio deverá ser repetido.

P.2. Cálculo do valor de corte

Os resultados do teste são calculados por meio do valor de corte determinado pela seguinte fórmula baseada na média OD_{450nm} do controle negativo (NC) - OD_{450nm} Branco:

$$(NC_{Média} - \text{branco}) + 0,170 = \text{Valor de corte(Cut-Off)}$$

O valor encontrado para o teste é usado para a interpretação dos resultados, como descrito no próximo parágrafo.

Observação importante: Quando o cálculo dos resultados for feito por um sistema operacional de um instrumento automático de ELISA, assegure-se de usar a fórmula correta para calcular o valor de corte e gerar a interpretação correta dos resultados.

Q. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

1. As amostras com valores de absorbância menores do que o valor de corte são consideradas não reagentes sob o critério deste imunoensaio, e poderiam ser consideradas negativas para anticorpos para o HIV-1+2 e HIV-1 p24. Não são necessários testes adicionais.
2. As amostras com valores de absorbância iguais ou maiores do que o valor de corte são consideradas reagentes ou positivas para anticorpos para o HIV-1 e/ou HIV-2 ou HIV-1 p24. Estas amostras (usando as amostras originais) devem ser reexaminadas em duplicata antes de confirmar o resultado final.
3. As amostras inicialmente reagentes que não reagem em nenhum dos testes repetidos são consideradas negativas para anticorpos para de HIV1+2 e HIV-1 p24. Não são necessários testes adicionais.
4. Se um dos valores reexaminados for igual ou maior do que o valor de corte, a amostra é considerada repetidamente reagente. As amostras que se revelaram repetidamente reagentes são interpretadas como positivas para a presença de anticorpos para o HIV-1 e/ou HIV-2 ou HIV-1 p24. Na maioria dos casos, é melhor investigar amostras repetidamente reagentes com testes adicionais mais específicos.

Observações importantes:

1. A interpretação dos resultados deveria ser feita sob a supervisão do responsável do laboratório, para reduzir o risco de erros de julgamento e más interpretações.
2. As amostras que forem repetidamente reagentes deveriam ser submetidas a um Ensaio de Confirmação antes da entrega de um resultado positivo de infecção por HIV.
3. Quando o resultado do teste for transmitido do laboratório ao centro de informática, deve-se prestar muita atenção para evitar erros na transferência de dados.
4. O diagnóstico de HIV deve ser realizado e comunicado ao paciente por um médico qualificado.

R. CARACTERÍSTICAS FUNCIONAIS

A Avaliação do Desempenho foi realizada de acordo com o que está descrito nas Especificações Técnicas Comuns (CTS) e como exigido pelo art. 5 capítulo 3 da Diretriz IVD 98/79/EC. A Avaliação do Desempenho foi realizada em dois centros externos.

A avaliação foi realizada desempenhos tanto em um centro externo e em laboratórios Adaltis, bem como para completar o estudo.

R.1. ESPECIFICIDADE E SENSIBILIDADE

R.1.1 Especificidade

A especificidade avaliada com:

- ❖ 5014 doadores de sangue europeus não selecionados, de dois centros, incluindo 40 amostras de doadores pela primeira vez.
- ❖ 201 pacientes hospitalizados
- ❖ 116 amostras potencialmente conflitantes:
 - ✓ 27 amostras de mulheres grávidas (5 primíparas, 17 multíparas e 4 sem informação).
 - ✓ 27 amostras positivas de Fator Reumatóide (RF)
 - ✓ 25 amostras hemolisadas incluindo fortemente hemolisadas.
 - ✓ 27 com outras infecções (4 HBV, 5 EBV, 5 HCV, 4 HSV, 5 rubéola, 4 toxoplasmose).
 - ✓ 5 amostras com hiperbilirrubinemia.
 - ✓ 5 amostras com hiperlipidemia.
- ❖ 50 amostras [25 positivas (HIV-1, HIV-2 e HIV-1 p24) e 25 amostras negativas] foram examinadas e não foi observada nenhuma diferença devida ao método utilizado na preparação da amostra (plasma-soro, citrato, EDTA e Heparina).

Dos 5014 doadores europeus selecionados, dezenove (19) amostras foram inicialmente reagentes (IR) e examinadas em duplicata. Isso resultou em dezessete (17) amostras Repetidamente Reagentes (RR). Estas amostras foram examinadas com um teste de confirmação. Uma amostra permaneceu indeterminada.

Estado atual	Resultados do teste			
	IR	RR	NEG	Total
Negativo	18	16	4997	5013
Positivo	0	0	0	0
Indeterminado	1	1	0	1
Total	19	17	4997	5014

Foi encontrada uma especificidade final de 99,7%.

R.1.2 Sensibilidade analítica (limite de detecção)

A sensibilidade analítica foi determinada por meio do padrão internacional da OMS para antígeno p24 de HIV-1, First Internacional Reference Reagent, NIBSC código 90/636.

Foi preparada uma diluição dentro de uma matriz negativa (0,1-10 IU/mL). Esta diluição foi testada em três séries de ensaios diferentes (três microplacas), em dois testes (dois dias). Para cada série individual, foi preparada uma nova diluição.

O resumo dos resultados é mostrado na tabela a seguir:

Ensaio	1	2	3
HIV-1 p24 (IU/mL)	OD/CO		
10	11.9	12.6	12.3
5	8.0	10.7	9.8
2.5	4.3	6.2	5.7
1	1.8	2.8	2.6
0.5	1.0	1.6	1.4
0.25	0.6	1.0	0.8
0.1	0.4	0.5	0.5
0	0.2	0.3	0.3

O limite de sensibilidade foi estimado em < 1,0 IU/mL

R.1.3 Sensibilidade Diagnóstica

A sensibilidade diagnóstica do **bioelisa HIV 1+2 4.0** foi baseada no teste de um painel de 500 amostras positivas de HIV 1/2, 31 painéis de soroconversão (fornecidos por BBI-Seracare/ZeptoMetrix) e 40 amostras de soroconversão precoce.

Detalhadamente:

- ❖ 500 amostras positivas (400 HIV-1 y 100 HIV-2 incluindo subtipos A, B, C, D, F, G, H, J, K, CRF);
- ❖ 50 sobrenadantes de cultivo celular incluindo diferentes subtipos de HIV-1 (grupo M subtipo A a K, CRF01_AE, CRF02_AG, grupo N, grupo O) e HIV-2;
- ❖ 50 amostras positivas de antígeno p24 de HIV-1;
- ❖ 31 painéis de soroconversão (ver próxima tabela)

Painel de Soroconversão	Adaltis EIAGEN	Ensaio de 4 ^a gen.	Ensaio de 3 ^a gen.	Antígeno HIV -1 p24	NAT
	Primeira amostra positiva detectada no painel				
Y-PRB925	5		5	5	5
AB/PRB927	2	2	2	2	2
AC/PRB928	2	2	2	2	2
AD/PRB929	3	3	6	3	3
AE PRB930	1		3	1	1
PRB933	2	2	2	2	2
PRB934	1	1	1	1	1
AP/PRB940	1	2	3	2	1
AQ/PRB941	3	4	4	3	2
AS/PRB943	3	3	6	3	2
AU PRB945	3		4	3	1
AW/PRB947	2	2	2	2	1
AX PRB948	3	4	4+	3	3
AZPRB950	2		4	2	2
BA PRB 951	3	3	5	3	3
PRB952	3	3	4	3	2
BE/PRB955	2	2	4	2	1
BF PRB 956	4	4	5	4	2
BI/PRB959	1	1	3	1	1
PRB960	7	8	9+	8	8
PRB962	5	5	6+	5	3
PRB963	6	6	7	6	5
PRB964	6+	6	ND	6	4
PRB965	4	2	4	2	1
PRB967	4	4	4	4	2
PRB968	7	7	7	7	5
6240	7	8	9	8	6
9028	6	6	ND	6	6
9077	12	12	14	12	12
9079	9	9	11	9	8
12007	4	4	5	ND	4

- ❖ 42 amostras de soroconversão precoce (positivas para HIV-1 de antígeno nuclear de p24 e anticorpos

para o HIV estão ausentes ou debilmente presentes e resultados indeterminados no teste Western Blot).

A sensibilidade final encontrada foi de 100%.

R.2. PRECISÃO

A precisão do ensaio foi avaliada determinando-se seus valores intra-ensaio e entre ensaios. Nas tabelas seguintes são apresentados os resultados para amostras negativas e para amostras positivas.

R.2.1 Resultados dentro do lote:

ElAgen Detect HIV 4 Total Screening código: 081311
1° Lote

Amostra	S/Co Média	Precisão - %CV		
		Intra-ensaio	Inter-ensaios	Total
Negativa	0.37	23.2	4.5	23.6
Pos A-HIV 1	1.80	10.6	9.4	14.1
Pos A-HIV 2	1.91	10.7	7.7	13.1
Pos HIV-1 p24	2.14	10.9	4.6	11.8

ElAgen Detect HIV 4 Total Screening código: 081311
2° Lote

Amostra	S/Co Média	Precisão - %CV		
		Intra-ensaio	Inter-ensaios	Total
Negativs	0.40	12.6	10.8	16.6
Pos A-HIV 1	1.47	6.9	7.4	10.3
Pos A-HIV 2	1.53	7.6	8.1	11.1
Pos HIV-1 p24	1.78	4.6	4.9	6.7

ElAgen Detect HIV 4 Total Screening código: 081311
3° Lote

Amostra	S/Co Média	Precisão - %CV		
		Intra-ensaio	Inter-ensaios	Total
Negativa	0.52	18.7	5.4	19.5
Pos A-HIV 1	1.65	8.6	4.6	9.8
Pos A-HIV 2	1.78	9.7	4.9	10.9
Pos HIV-1 p24	2.05	7.4	4.6	8.7

ElAgen Detect HIV 4 Total Screening código: 081311
4° Lote

Amostra	S/Co Média	Precisão - %CV		
		Intra-ensaio	Inter-ensaios	Total
Negativa	0.58	19.6	3.0	19.8
Pos A-HIV 1	1.59	9.4	1.4	9.5
Pos A-HIV 2	1.66	11.4	2.64	11.7
Pos HIV-1 p24	2.17	9.1	2.0	9.3

R.2.2 Resultados entre lotes:

Amostra	S/Co Média	Precisão - %CV	
		Inter-ensaios	Total
Negativa	0.48	18.4	26.5
Pos A-HIV 1	1.63	9.7	13.3
Pos A-HIV 2	1.72	9.9	14.2
Pos HIV-1 p24	2.03	8.6	12.1

R.2.3 Especificações

Intra-lote

Intra-ensaio:

%CV em amostras positivas < 15%

%CV em amostras positivas < 25%

Inter-ensaios:

%CV em amostras positivas < 15%

%CV em amostras positivas < 25%

Inter-lotes:

%CV em amostras positivas < 15%

%CV em amostras positivas < 25%

Precisão total:

%CV em amostras positivas < 20%

%CV em amostras positivas < 30%

S. SUGESTÕES PARA A SOLUÇÃO DE PROBLEMAS

Respeitar as especificações e o procedimento do ensaio, assim como usar os reagentes corretamente e a pipetagem adequada pode ajudar a evitar os seguintes tipos de erro:

ERRO	POSSÍVEIS CAUSAS/SUGESTÕES
DO muito diferente (± 50%) da DO relatada no CC	<ul style="list-style-type: none"> - Distribuir o volume incorreto de reagente (sugestão: verifique se o volume distribuído corresponde ao volume dispensado pela pipeta e ao requerido pelo ensaio; volte a calibrar as pipetas). - Temperatura incorreta ou tempo de incubação incorreto (sugestão: tenha mais cuidado com a manutenção da incubadora; anote o começo da incubação) - Erro na lavagem ou na leitura do fotômetro (sugestão: verifique a operação ou a configuração dos respectivos instrumentos). - Contaminação do substrato ou do conjugado (sugestão: utilize somente recipientes descartáveis plásticos e limpos).

ERRO	POSSÍVEIS CAUSAS/SUGESTÕES
Baixa precisão nos resultados	<ul style="list-style-type: none"> -Não distribuir o volume constante de reagentes ou de amostras (sugestão: verifique a precisão das pipetas e se o volume dispensado pela pipeta corresponde ao indicado pelo ensaio; volte a calibrar as pipetas). -Erro na lavagem ou na leitura (sugestão: verifique a operação ou a configuração dos respectivos instrumentos). -Erro na lavagem ou na leitura do fotômetro (sugestão: verifique a operação ou a configuração dos respectivos instrumentos). -Contaminação do substrato (sugestão: utilize somente recipientes descartáveis plásticos e limpos). - Poluição ou degradação dos reagentes (sugestão: use as ponteiras adequadas, recipientes descartáveis de plástico e limpos para os reagentes e água destilada de alta qualidade ou equivalente).
Sem reação colorimétrica depois da adição do substrato	<ul style="list-style-type: none"> -Alguns reagentes não pipetados. -Forte contaminação dos reagentes ou substrato. -Erro ao executar o procedimento do ensaio (por ex., pipetar os reagentes na sequência equivocada ou do tubo equivocado, etc.)
Reação muito baixa (DOs muito baixas)	<ul style="list-style-type: none"> -Tempo de incubação muito curto, temperatura de incubação muito baixa. -Diluição incorreta do conjugado.
Reação muito alta (DOs muito altas)	<ul style="list-style-type: none"> -Diluição incorreta do conjugado. -Tempo de incubação muito longo, temperatura de incubação muito alta. -Qualidade da água insuficiente para o tampão de lavagem (baixo grau de ionização). -Lavagem insuficiente (o conjugado não foi eliminado corretamente).
Valores atípicos inexplicáveis	<ul style="list-style-type: none"> -Contaminação das pipetas, ponteiras ou recipientes. -Lavagem inconstante e insuficiente (o conjugado não foi eliminado corretamente).
%CV muito alto dentro do ensaio	<ul style="list-style-type: none"> -Reagentes e/ou tiras não foram pré-aquecidos à temperatura ambiente antes do uso. - A lavadora não está lavando corretamente (sugestão: limpar o cabeçote de lavagem).
%CV muito alto entre ensaios	<ul style="list-style-type: none"> -As condições de incubação não são constantes (tempo, temperatura). -Controles e amostras não distribuídos ao mesmo tempo (com os mesmos intervalos) (verifique a ordem de pipetagem). -Variação relacionada com o pessoal.

T. AUTOMATIZAÇÃO

O procedimento descrito nestas instruções de uso é apenas para testes manuais. Ao utilizar instrumentos automatizados, siga os procedimentos contidos no manual do operador fornecido pelo fabricante. Os laboratórios devem seguir seus procedimentos aprovados de validação para demonstrar a compatibilidade deste produto em sistemas automatizados.

U. LIMITAÇÕES

- Advertência: o usuário deste kit deve ler cuidadosamente suas instruções de uso e entendê-las completamente. É necessário seguir estritamente o protocolo para obter resultados confiáveis nos testes. Particularmente, é essencial uma amostragem e pipetamento correto do reagente, assim como uma lavagem cuidadosa e sincronização do tempo de incubação, para que se obtenha uma detecção confiável e exata de anticorpos para o HIV-1 e HIV-2 e antígenos p24.
- Se possível, use amostras frescas de soro e plasma. Amostras degradadas, assim como vários ciclos de congelamento e descongelamento, podem causar resultados errados. **Não use amostras inativadas por calor.**
- Com o uso de um ensaio desta natureza, podem-se esperar resultados falsamente reagentes. A proporção de reagentes dependerá da sensibilidade e especificidade do kit utilizado e da prevalência de anticorpos para HIV-1 e HIV-2 na população que vai ser examinada.
- Depois de usar o EIAgen Detect HIV 4 Total Screening Kit as amostras que sejam repetidamente reativas devem ser submetidas a exames adicionais usando o Western Blot (WB), Ensaio Imunofluorescente Indireto (IFA) ou Ensaio de Radioimunoprecipitação (RIPA). A determinação de que as amostras de um pessoa contêm anticorpos para o HIV e/ou antígenos HIV tem implicações tanto médicas como sociais, psicológicas e econômicas. Recomenda-se que a confidencialidade, o assessoramento apropriado e a avaliação médica sejam considerados aspectos essenciais da sequência dos testes.
- A AIDS e as condições relacionadas à AIDS são enfermidades clínicas e seu diagnóstico só pode ser estabelecido clinicamente. O exame de EIA exclusivamente não pode ser usado para diagnosticar a AIDS. Um resultado não reagente em qualquer ponto da sequência do teste não exclui a possibilidade de exposição ao HIV ou infecção por ele. O risco de uma pessoa assintomática, que seja repetidamente reagente desenvolver a AIDS e/ou condições relacionada à AIDS não é conhecido.
- O resultado do teste deveria ser usado em conjunto com todos os outros dados clínicos e de diagnóstico.
- Os anticorpos para o HIV podem estar presentes devido à participação voluntária em um estudo para encontrar uma vacina contra a AIDS. A interpretação deste teste de diagnóstico depende do tipo de vacina que tenha sido administrada. Poderiam ser necessários histórico médico e testes adicionais para diagnosticar com exatidão os voluntários na busca de uma vacina contra a AIDS.

BIBLIOGRAPHY

1. Alizon, M., Sonigo, P., Barré-Sinoussi, F., Chermann, J.-C., Tiollais, P., Montagnier, L. and Wain-Hobson, S., 1984. Molecular Cloning of Lymphadenopathy-Associated Virus. *Nature* 312:757-760.
2. Barré-Sinoussi, F., Chermann, J.-C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbrum, W. and Montagnier, L. 1983. Isolation of a T-lymphotropic Retrovirus from a Patient at Risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). *Science* 220:868-871.
3. Clavel, F., Mansinho, K., Chamaret, S. et al. 1987. Human Immunodeficiency Virus Type 2 Infection Associated with AIDS in West Africa. *N. Engl. J. Med.* 316:1180-1185.
4. Gallo, R.C., Salahuddin, S.Z., Popovic, M., Shearer, G.M., Kaplan, M., Haynes, B.F., Palker, T.J., Redfield, R., Oleske, J., Safal, B., White, G., Foster, P. and Markham, P.D. 1984. Frequent Detection and Isolation of Cytopathic Retroviruses (HTLV-III) from Patients with AIDS and at Risk for AIDS. *Science* 224:500-503.
5. Gold, J. and Dwyer, J., 1994. A Short History of AIDS. *Med. J. Aust.* 160:251-252.
6. Hahn, B.N., Shaw, G.M., Arya, S.K., Popovic, M., Gallo, R.C. and Wong-Staal, F., 1984. Molecular Cloning and Characterization of the HTLV-III Virus Associated with AIDS. *Nature* 312:166-169.
7. IVD Directive 98/79/CE, Common Technical Specifications (CTS) – Annex II, List A.
8. Lin, H.J. 1995. Laboratory Tests for Human Immunodeficiency Viruses. *J. Int. Fed. Clin. Chem.* 7:61-65.
9. Luciw, P.A., Potter, S.J., Steimer, K., Dina, D. and Levy, J.A., 1984. Molecular Cloning of AIDS-Associated Retrovirus. *Nature* 312:760-763.
10. Ly, T.D., Laperche, S., Brennan, C., Vallari, A., Ebel, A., Hunt, J., Martin, L., Daghfal, D., Schochetman, G. And Devare, S. 2004. Evaluation of the sensitivity and specificity of six HIV combined p24 antigen and antibody assays. *J. Virol. Meth.* 122: 185-194.
11. Popovic, M., Sarngadharan, M.G, Read, E., and Gallo, R.C., 1984. Detection, Isolation, and Continuous Production of Cytopathic Retrovirus (HTLV-III) from Patient with AIDS and Pre-AIDS. *Science* 224:497-500.
12. Sarngadharan, M.G., Popovic, M., Bruch, L., Schüpbach, J. and Gallo, R.C., 1984. Antibodies Reactive with Human T-Lymphotropic Retroviruses (HTLV-III) in the Serum of Patients with AIDS. *Science* 224:506-508.
13. Saville, R.D., Constantine, N.T., Cleghorn, F.R., Jack, N., Bartholomew, C., Edwards, J., Gomez, P. and Blattner, W.A. 2001. Fourth-generation enzyme-linked immunosorbent assay for the simultaneous detection of human immunodeficiency virus antigen and antibody. *J. Clin. Microbiol.* 39 (7): 2518-2524.
14. Sehulster, L.M., Hollinger, F.B., Dreesman, G.R. and Melnick, J.L., 1981. Immunological and Biophysical Alteration of Hepatitis B Virus Antigens by Sodium Hypochlorite Disinfection, *App. and Environ. Microbiol.* 42:762-767.
15. Sinicco, A., For a, R., Scalandra, M., Lucchini, A., Caramello, P. and Giovanni, P. 1993. Risk of Developing AIDS after Primary Acute HIV-1 Infection. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 6:575-581.
16. Spire, B., Montagnier, L., Barré-Sinoussi, F. and Chermann, J.-C., 1984. Inactivation of Lymphadenopathy Associated Virus by Chemical Disinfectants. *Lancet*: 889-901, Oct. 20.
17. Vézinet-Brun, F., Barré-Sinoussi, F., Salmot, A.G., Christol, D. Montagnier, L., Rouzioux, C., Klatzmann, D., Rozenbaum, W., Gluckmann, J.C. and Chermann, J.-C., 1984. Detection of IgG Antibodies to Lymphadenopathy-Associated Virus in Patients with AIDS or Lymphadenopathy Syndrome. *Lancet*: 1253-1256, June 9.
18. Weber, B., Thorstensson, R., Tanprasert, S., Schmitt, U. And Melchior, W. 2003. Reduction of the diagnostic window in three cases of human immunodeficiency-1 subtype E primary infection with fourth-generation HIV screening assays. *Vox Sanguinis* 85: 73-79.
19. World Health Organization. 2004. HIV assays: operational characteristics (Phase 1): report 15 antigen/antibody ELISAs. www.who.int/diagnostics_laboratory/publications/en/HIV_Report15.pdf.