

HIV Ab/Ag combo ELISA

REF: KAPDHIV96,
KAPDHIV192,
KAPDHIV480



DIA.PRO DIAGNOSTIC BIOPROBES S.r.l.
Via G. Carducci n°27
20099 Sesto San Giovanni (Milano)-Italy
Phone +39 02 27007161
e-mail: info@diapro.it

CE
0318



DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2 - B-1348 Louvain-la-Neuve - Belgium

HIV Ab/Ag combo ELISA

A. INTENDED USE

The kit is a solid phase enzyme immunoassay for the in-vitro diagnostic screening of antibodies to all subtypes of HIV-1 and HIV-2 and HIV-1 antigen (p24) in human serum or plasma.

This kit is intended exclusively for *In vitro* diagnostic use in an authorized clinical laboratory and the test has to be carried out by specifically trained health-care professional personnel.

B. INTRODUCTION

Epidemiological evidence indicates that an infectious agent transmitted through intimate contact, intravenous drug use or use of infected blood or blood products leads to Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS).

This disease affects T-cell mediated immunity, resulting in severe lymphopenia and a reduced subpopulation of helper T-lymphocytes. Destruction of this T-lymphocyte population by the virus causes an immune deficiency, resulting in a reduced or deficient response to subsequent infections. Consequently, infections become more severe and may cause death. At present, there is no successful treatment for AIDS.

The etiological agent has been identified as a retrovirus, human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1).

A closely related, but distinct type of immunodeficiency virus, designated HIV-2, has also been isolated. This virus causes a disease that is indistinguishable from AIDS.

Serological cross-reactivity between HIV-1 and HIV-2 has been shown to be highly variable from sample to sample.

This variability requires the inclusion of antigens to both HIV-1 and HIV-2 for the screening of antibodies to HIV-1 and HIV-2.

The presence of anti-HIV-1 and/or anti-HIV-2 and/or HIV p24 antigen 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

Chimeric recombinant antigen representing immunodominant epitopes of HIV-1 and HIV-2, a HIV-1 group O peptide together with two monoclonal antibody to p24 HIV-1 antigen are coated onto wells of a microplate.

Immunodominant epitopes and the antibody have been carefully selected to ensure the screening of antibody and p24 antigen to all HIV-1 subtypes, including subtype O and HIV-2. Serum or plasma samples are added to these wells and, if antibodies specific to HIV-1 and/or HIV-2 (IgG, IgM or IgA) are present in the sample, they will form stable complexes with the HIV chimeric recombinant antigen or HIV-1 group O peptide. In case HIV-1 p24 is present in the sample, the antigen will be captured by the specific monoclonal antibody and Fab fragment of a second complementary monoclonal antibody to p24 antigen.

Antigen-antibody complexes are then identified through the successive addition of: (1) biotinylated chimeric recombinant antigen, HIV-1 group O peptide, monoclonal antibody to HIV-1 p24, and Fab fragment of a second complementary monoclonal antibody to p24 antigen and (2) horseradish peroxidase HRP Streptavidin conjugate.

The hydrolytic activity of horseradish peroxidase allows for the quantification of these antibody-antigen complexes.

Peroxidase substrate solution is then added.

During incubation, a blue color will develop in proportion to the amount of anti-HIV-1/2 antibodies or HIV-1 p24 antigen bound to the well, thus establishing their presence or absence in the sample. Wells containing samples negative for anti-HIV antibody and/or p24 antigen remain colorless.

A stop solution is added to each well and the resulting yellow color is read on a microplate reader at 450 nm.

D. COMPONENTS

The device is available in the commercial formats described in the table below:

	n°1	n°2	n°5
1. Microplate			
2. Negative Control	1x2.0ml/vial	1x4ml/vial	1x10ml/vial
3. Positive Control 1	1x2.0ml/vial	1x4ml/vial	1x10ml/vial
4. Positive Control 2	1x2.0ml/vial	1x4ml/vial	1x10ml/vial
5. HIV p24 Calibrator	n°1 vial	n°2 vials	n°5 vials
6. Wash buff conc	1x60ml/bottle	2x60ml/bottles	5x60ml/bottles
7. Conjugate # 1	n°4 vials	n°8 vials	n°20 vials
8. Conjugate 1 Diluent	1x30ml/vial	1x60ml/bottles	3x50ml/bottles
9. Conjugate # 2	1x15ml/vial	1x25ml/bottle	2x38ml/bottle
10. Chrom/Substrate	1x25ml/vial	1x45ml/bottles	3x42ml/bottle
11. Sulphuric Acid	1x15ml/vial	1x25ml/bottles	2x40ml/bottles
12. Sample Diluent	1x7ml/vial	1x14ml/bottle	1x35ml/bottle
Plate seal foils	n°2	n°4	n°10
Pack. insert	n°1	n°1	n°1
Number of tests	96	192	480
Code	KAPDHIV96	KAPDHIV192	KAPDHIV480

1. Microplate

12 strips of 8 breakable wells coated with chimeric recombinant antigen bearing gp36, gp41 and gp120 sequences and with two Monoclonal Antibody specific to the HIV-1 p24 Ag and HIV-1 group O peptide. Plates are sealed into a bag with desiccant.

2. Negative Control

Ready to use control. It contains human plasma defibrinated negative for HIV antibodies and for p24 antigen, and 0.045% ProClin 300 as preservatives. The negative control is yellow-brown color coded.

3. Positive Control HIV-1 Ab

Ready to use control. It contains inactivated HIV 1 antibody positive serum, filtered HIV Ab&Ag negative animal serum and 0.045% ProClin 300 as preservative. The Positive Control is light green color coded.

Important Note: *The positive control has been inactivated using B-propionolactone BPL/UV. This does not fully ensure the absence of viable pathogens, and therefore, the control should be*

handled as potentially biohazardous, in accordance with good laboratory practices.

4. Positive Control HIV-2 Ab

Ready to use control. It contains inactivated HIV2 antibody positive serum, filtered HIV Ab&Ag negative animal serum and 0.045% ProClin 300 as preservatives. The Positive Control is dark green color coded.

Important Note: *The positive control has been inactivated using B-propionolactone BPL/UV. This does not fully ensure the absence of viable pathogens, and therefore, the control should be handled as potentially biohazardous, in accordance with good laboratory practices.*

5. HIV-1 P24 Ag Calibrator

Lyophilized. It contains not infectious recombinant p24 antigen in a 10 mM phosphate buffer pH 7.0+/-0.2 with 0.3 mg/ml Gentamicine Sulphate and 0.045% ProClin 300 as stabilizers.

This component is calibrated against the Biorad HIV-1 Antigen Standard code 72217 diluted to obtain a concentration of about 100pg/ml ±20%.

Important Notes:

- 1) The Calibrator contains p24 recombinant Ag with a concentration of about 100 pg/ml, corresponding to 4 IU/ml ±20%.
- 2) The volume necessary to dissolve the content of the vial may vary from lot to lot. Please use the right volume reported on the label.

6. Wash buffer concentrate

2x60ml/bottle. 20x concentrated solution.

It contains 0.045% ProClin 300 Once diluted, the wash solution contains 10 mM phosphate buffer saline pH 7.0+/-0.2 and 0.05% Tween 20.

7. Conjugate # 1

The vial contains lyophilized biotinylated HIV1&2&O gp36, gp41 and gp120 peptides, biotinylated HIV1 O peptide, biotinylated Fab fragment of a second complementary monoclonal antibody to p24 antigen and a biotinylated monoclonal antibody specific for HIV 1 p24 antigen. Vials are to be resuspended with 6 ml of the Conjugate # 1 diluent.

8. Conjugate 1 Diluent

Used to dissolve the lyophilized powder of Conjugate # 1, it contains Tris saline Buffer supplemented with 0.045% ProClin 300, Tween 20 and BSA.

9. Conjugate # 2

The solution contains HRP conjugated with streptavidin in Tris saline Buffer supplemented with 0.045% ProClin 300, Tween 20 and BSA. This component is color coded in pink/red.

10. Chromogen/Substrate

Ready-to-use component. It contains 50 mM citrate buffer pH 3.5-3.8, 4% dimethylsulphoxide, 0.03% tetra-methyl-benzidine or TMB and 0.02% hydrogen peroxide or H2O2.

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

11. Sulphuric Acid

It contains 0.3 M H2SO4 solution.

Attention: Irritant (H315, H319; P280, P302+P352, 332+P313, P305+ P351+P338, P337+P313, P362+P363)

12. Sample Diluent:

Contains Tris saline buffer supplemented with 0.045% ProClin 300, anti HAMA blocker, and Tween 20; used for specimen dilution. This component is color coded in light blue.

13. Plate sealing foils

14. Package insert

E. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

1. Calibrated Micropipettes (200ul and 10ul) and disposable plastic tips.
2. EIA grade water (bidistilled or deionised, charcoal treated to remove oxidizing chemicals used as disinfectants).
3. Timer with 60 minute range or higher.
4. Absorbent paper tissues.
5. Calibrated ELISA microplate thermostatic incubator capable to provide a temperature of +37°C.
6. Calibrated ELISA microwell reader with 450nm (reading) and with 620-630nm (blinking) 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.
2. When the kit is used for the screening of blood units and blood components, it has to be used in a laboratory certified and qualified by the national authority in that field (Ministry of Health or similar entity) to carry out this type of analysis.
3. All the personnel involved in performing the assay have to wear protective laboratory clothes, talc-free gloves and glasses. The use of any sharp (needles) or cutting (blades) devices should be avoided. All the personnel involved should be trained in biosafety procedures, as recommended by the Center for Disease Control, Atlanta, U.S. and reported in the National Institute of Health's publication: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
4. All the personnel involved in sample handling should be vaccinated for HBV and HAV, for which vaccines are available, safe and effective.
5. The laboratory environment should be controlled so as to avoid contaminants such as dust or air-born microbial agents, when opening kit vials and microplates and when performing the test. Protect the Chromogen/Substrate 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. Do not reuse disposable tips.
10. Avoid cross-contamination between kit reagents by using disposable tips and changing them between the use of each one. Do not reuse disposable tips.
11. Do not use the kit after the expiration date stated on the external container and internal (vials) labels.
12. Treat all specimens as potentially infective. All human serum specimens should be handled at Biosafety Level 2, as recommended by the Center for Disease Control, Atlanta, U.S. in compliance with what reported in the Institutes of Health's publication: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
13. The use of disposable plastic-ware is recommended in the preparation of the liquid components or in transferring components into automated workstations, in order to avoid cross contamination.
14. Waste produced during the use of the kit has to be discarded in compliance with national directives and laws concerning laboratory waste of chemical and biological substances. In particular, liquid waste generated from the

washing procedure, from residuals of controls and from samples has to be treated as potentially infective material and inactivated before waste. Suggested procedures of inactivation are treatment with a 10% final concentration of household bleach for 16-18 hrs or heat inactivation by autoclave at 121°C for 20 min..

15. Accidental spills from samples and operations have to be adsorbed with paper tissues soaked with household bleach and then with water. Tissues should then be discarded in proper containers designated for laboratory/hospital waste.
16. The Sulphuric Acid is irritant. In case of spills, wash the surface with plenty of water.
17. 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.

G. SPECIMEN: PREPARATION AND RECOMMENDATIONS

1. Blood is drawn aseptically by venipuncture and plasma or serum is prepared using standard techniques of preparation of samples for clinical laboratory analysis. No influence has been observed in the preparation of the sample with citrate, EDTA and heparin.
2. Avoid any addition of preservatives to samples; especially sodium azide as this chemical would affect the enzymatic activity of the conjugate, generating false negative results.
3. Samples have to be clearly identified with codes or names in order to avoid misinterpretation of results. When the kit is used for the screening of blood units, bar code labeling and electronic reading is strongly recommended.
4. Haemolysed (red) and visibly hyperlipemic ("milky") samples have to be discarded as they could generate false results. Samples containing residues of fibrin or heavy particles or microbial filaments and bodies should be discarded as they could give rise to false results.
5. Sera and plasma can be stored at +2°...+8°C in primary collection tubes for up to five days after collection. Do not freeze primary tubes of collection. For longer storage periods, sera and plasma samples, carefully removed from the primary collection tube, can be stored frozen at -20°C for at least 12 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 filter using 0.2-0.8u filters to clean up the sample for testing.
7. Do not use heat inactivated samples as they could give origin to false reactivity.

H. PREPARATION OF COMPONENTS AND WARNINGS

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

Microplates:

Allow the microplate to reach room temperature (about 1 hr) before opening the container. Check that the pouch is not broken or that some defect is present indicating a problem of storage. In this case call Dia.Pro's customer service. Unused strips have to be placed back into the aluminum pouch, in presence of desiccant supplied, firmly zipped and stored at +2°..8°C. When opened the first time, residual strips are stable up to two months.

Negative Control:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Positive Controls Ab:

Positive controls are ready to use. Handle Positive Controls Ab as potentially infective, even if HIV, if present in the control, has been chemically inactivated.

Calibrator Ag

The Lyophilized Calibrator Ag contains a non-infectious recombinant p24 antigen. The volume of EIA grade water to be used for its dissolution and to reach the appropriate p24 concentration (about 100 pg/ml) is written on the vial label. To help dissolve the lyophilized pellet, vortex a few times, at regular intervals. Complete dissolution should be achieved within 2-5 minutes.

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

Wash buffer concentrate:

The 20x concentrated solution has to be diluted with EIA grade water up to 1200 ml and mixed gently end-over-end before use. As some salt crystals may be present into the vial, take care to dissolve all the content when preparing the solution.

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

Important Note: Once diluted, the wash solution is stable for 1 week at $+2..8^{\circ}\text{C}$.

Conjugate # 1:

The Conjugate # 1 mix solution must be prepared immediately before starting the test. Add 6 ml of Conjugate 1 diluent directly to one Conjugate # 1 vial to dissolve the lyophilized powder. This preparation (a total of 6 ml in one vial) is sufficient for 32 tests, or 4 complete vertical strips of the microplate. To help dissolve the lyophilized powder, vortex a few times, at regular intervals.

Important Note: Any unused portion of this reconstituted Conjugate # 1 Solution may be stored at $+2..8^{\circ}\text{C}$ for no more than 12 hours. After this time it has to be discarded and the empty, used container has to be washed with EIA grade water and kept dry for any following re-use.

Conjugate # 2:

Ready to use reagent. Mix well end-over-end before use.

Chromogen/Substrate:

Ready to use. Mix well end-over-end 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.

Sulphuric Acid:

Ready to use. Mix well end-over-end before use.

Attention: Irritant (H315, H319; P280, P302+P352, 332+P313, P305+ P351+P338, P337+P313, P362+P364).

Legenda:

Warning H statements:

H315 – Causes skin irritation.

H319 – Causes serious eye irritation.

Precautionary P statements:

P280 – Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.

P302 + P352 – IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.

P332 + P313 – If skin irritation occurs: Get medical advice/attention.

P305 + P351 + P338 – IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

P337 + P313 – If eye irritation persists: Get medical advice/attention.

P362 + P363 - Take off contaminated clothing and wash it before reuse.

Sample Diluent:

Ready to use. Mix well end-over-end before use.

I. INSTRUMENTS AND TOOLS USED IN COMBINATION WITH THE KIT

- 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 in order to show a precision of 1% and a trueness of $\pm 2\%$. Decontamination of spills or residues of kit components should also be carried out regularly.
- The **ELISA incubator** has to be set at $+37^{\circ}\text{C}$ (tolerance of $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$) and regularly checked to ensure the correct temperature is maintained. Both dry incubators and water baths are suitable for the incubations, provided that the instrument is validated for the incubation of ELISA tests.
- The **ELISA washer** is extremely important to the overall performances of the assay. The washer must be carefully validated in advance, checked for the delivery of the right dispensation volume and regularly submitted to maintenance according to the manufacturer's instructions for use. In particular the washer, at the end of the daily workload, has to be extensively cleaned out of salts with deionized water. Before use, the washer has to be extensively primed with the diluted Washing Solution. The instrument weekly has to be submitted to decontamination according to its manual (NaOH 0.1 M decontamination suggested). 5 washing cycles (aspiration + dispensation of 350ul/well of washing solution + 20 sec soaking = 1 cycle) are sufficient to ensure the assay with the declared performances. If soaking is not possible add one more cycle of washing. An incorrect washing cycle or salt-blocked needles are the major cause of false positive reactions.
- Incubation times have a tolerance of $\pm 5\%$.
- The **ELISA microplate reader** has to be equipped with a reading filter of 450nm and with a second filter of 620-630nm, mandatory 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 ; (d) 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.
- When using an **ELISA automated work station**, all critical steps (dispensation, incubation, washing, reading, data handling) have to be carefully set, calibrated, controlled and regularly serviced in order to match the values reported in the sections "Internal Quality Control". The assay protocol has to be installed in the operating system of the unit and validated as for the washer and the reader. In addition, the liquid handling part of the station (dispensation and washing) has to be validated and correctly set. Particular attention must be paid to avoid carry over by the needles used for dispensing and for washing. This must be studied and controlled to minimize the possibility of contamination of adjacent wells. The use of ELISA automated work stations is recommended for blood screening when the number of samples to be tested exceed 20-30 units per run.
- When using automatic devices, in case the vial holder of the instrument does not fit with the vials supplied in the kit, transfer the solution into appropriate containers and label them with the same label peeled out from the original vial. This operation is important in order to avoid mismatching contents of vials, when transferring them. When the test is over, return the secondary labeled containers to $2..8^{\circ}\text{C}$, firmly capped.

8. Dia.Pro's customer service offers support to the user in the setting and checking of instruments used in combination with the kit, in order to assure compliance with the requirements described. Support is also provided for the installation of new instruments to be used with the kit.

L. PRE ASSAY CONTROLS AND OPERATIONS

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

M. ASSAY PROCEDURE

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

1. Automated assay:

In case the test is carried out automatically with an ELISA system, we suggest to make the instrument dispense 50 ul Sample Diluent first and then 150 ul controls and samples.

Before the next sample is aspirated, needles have to be duly washed to avoid any cross-contamination among samples or tips have to be changed.

For the next operations follow the operative instructions reported below for the Manual Assay.

It is strongly recommended to check that the time lap between the dispensation of the first and the last sample will be calculated by the instrument and taken into consideration by delaying the first washing operation accordingly.

The correct number of lyophilized Conjugate # 1 must be dissolved each with 6 ml Conjugate # 1 Diluent. Once the lyophilized powders are dissolved and mixed well, they are to be mixed together into a plastic container and the assay may begin.

2. Manual assay:

1. Dissolve the right number of lyophilized Conjugate # 1 with Conjugate # 1 Diluent before starting to dispense the samples and controls of the test.
2. Place the required number of strips in the microwell holder. Leave the 1st well empty for the operation of blanking.

3. Dispense 50 ul Sample Diluent in all the wells, except A1 used for blanking.
4. Dispense 150 ul of Negative Control in triplicate, 150 ul HIV1 Positive Control, 150 ul HIV2 Positive Control and 150 ul of Calibrator Ag in duplicate in proper wells.
5. Dispense 150 ul of Sample in each properly identified well. Mix gently the plate on the work surface, avoiding overflowing and contaminating adjacent wells, in order to fully disperse the sample into the diluent.
6. Incubate the microplate for **60 min at +37°C**.

Important note: *Strips have to be sealed with the adhesive sealing foil, supplied, only when the test is carried out manually. Do not cover strips when using ELISA automatic instruments.*

7. Wash the microplate with an automatic washer by delivering and aspirating 350ul/well of diluted washing solution as reported previously (section I.3).
8. Pipette 150 ul Conjugate # 1 mix, prepared as described before, 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.*

9. Incubate the microplate for **30 min at +37°C**.
10. Pipette 100 ul of Conjugate # 2 in all the wells, except A1, and gently agitate the microplate to mix the two conjugates.

Important Note: *This solution must be added to the bottom of each well to ensure proper performance. Inadequate mixing of the two solutions (Conjugate 1 and Conjugate 2) may reduce the binding of streptavidin HRP (Conjugate 2) to the biotinylated reagents and consequently affect the performance of the assay. Be sure to provide an adequate mixing when the Conjugate # 2 is added, both in the manual and in the automated procedures.*

11. Incubate the microplate sealed for **30 min at +37°C**.
12. Wash as in section 7.
13. Dispense 200 ul of Chromogen/Substrate mixture into each well, the blank well included. Then incubate the microplate at **room temperature (18-25°C) for 30 minutes**. Start the timing immediately after addition of this component to the first well.

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

14. Pipette 100 ul Sulphuric Acid into all the wells using the same pipetting sequence as in step 13 to stop the enzymatic reaction. Addition of acid will turn the positive controls and positive samples from blue to yellow/brown.
15. Measure the color intensity of the solution in each well, as described in section I.5, at 450nm filter (reading) and at 620-630nm (background subtraction, mandatory), blanking the instrument on A1.

Important notes:

1. *Ensure that no finger prints are present on the bottom of the microwell before reading. Finger prints could generate false positive results on reading.*
2. *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.*
3. *The Calibrator (CAL) does not affect the cut-off calculation and therefore the test results calculation. The Calibrator may be used only when a laboratory internal quality control is required by the management.*

N. ASSAY SCHEME

Method	Operations
Sample Diluent	50 ul
Controls and calibrator	150 ul
Samples	150 ul
1st incubation	60 min
Temperature	+37°C
Wash step	n° 5 cycles with 20" of soaking OR n° 6 cycles without soaking
Conjugate # 1	150 ul
2nd incubation	30 min
Temperature	+37°C
Conjugate # 2	100 ul
3rd incubation	30 min
Temperature	+37°C
Wash step	n° 5 cycles with 20" of soaking OR n° 6 cycles without soaking
TMB/H2O2	200 ul
4th incubation	30 min
Temperature	r.t.
Sulphuric Acid	100 ul
Reading OD	450nm / 620-630nm

An example of dispensation scheme is reported below:

Microplate

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

Legenda: BLK = Blank NC = Negative Control POS 1 Ab = HIV -1 Ab Positive Control, POS 2 Ab = HIV -2 Ab Positive, CAL Ag = HIV p24 Ag Calibrator, S = Sample

O. INTERNAL QUALITY CONTROL

A check is carried out on the controls and the calibrator any time the kit is used in order to verify whether their OD450nm / 620-630nm values are as expected and reported in the table below.

Check	Requirements
Blank well	< 0.100 OD450nm / 620-630nm value
Negative Control (NC)	≤ 0.200 mean OD450nm / 620-630nm value after blanking Absorbance of individual negative control values must be less than or equal to 0.200. If one value is outside this range, discard this value and recalculate mean. If two values are outside this range the run should be repeated.
HIV-1 Ab Positive Control	S/Co ≥ 3.5
HIV-2 Ab Positive Control	S/Co ≥ 7.5
HIV Ag Calibrator	S/Co > 1.5

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 operate as follows:

Problem	Check
Blank well > 0.100 OD450nm / 620-630nm	1. that the Chromogen/Sustrate solution has not got contaminated during the assay
Negative Control (NC) > 0.200 OD450nm / 620-630nm 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 their wells has occurred due to positive samples, to spills or to the enzyme conjugate; 5. that micropipettes haven't got contaminated with positive samples or with the enzyme conjugate 6. that the washer needles are not blocked or partially obstructed.
Positive Controls: CP1 < 3.5 CP2 < 7.5	1. that the procedure has been correctly executed; 2. that no mistake has been done in the distribution of controls (dispensation of negative control instead of positive control. In this case, the negative control will have an OD450nm / 620-630nm value > 0.200, too. 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.
HIV Ag Calibrator S/Co < 1.5	1. that the procedure has been correctly executed; 2. that no mistake has been done in the distribution of controls (dispensation of negative control instead of Calibrator Ag. In this case, the negative control will have an OD450nm / 620-630nm value > 0.200, too. 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. 5.that the lyophilize powder was dissolved correctly with the correct volume of water written on the vial label.

Should these problems happen, after checking, report any residual problem to the supervisor for further actions.

P. CALCULATION OF THE CUT-OFF

The tests results are calculated by means of a cut-off value determined with the following formula on the mean OD450nm/620-630nm value of the Negative Control (NC):

$$NC + 0.125 = \text{Cut-Off (Co)}$$

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 done by the operative system of an ELISA automated work station be sure that the proper formulation is used to calculate the cut-off value and generate the right interpretations of results.

Q. INTERPRETATION OF RESULTS

Test results are interpreted as ratio of the sample OD450nm/620-630nm and the Cut-Off value (or S/Co) according to the following table:

S/Co	Interpretation
< 1	Negative
> 1	Positive

A negative result indicates that the patient has not been infected by HIV.

If the initial absorbance value is equal to or greater than the cut-off value, retest the sample in duplicate. If both retest values are less than the cut-off, the interpretation is not reactive for HIV antibody and/or antigen (negative).

If one or both retest values are equal to or greater than the cut-off the interpretation of the test results is repeatedly reactive. The sample should be considered reactive or positive for HIV antibody and/or antigen according to the criteria of this HIV ELISA test.

A positive result is indicative of HIV infection and therefore the patient should be treated accordingly.

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.

An example of calculation is reported below:

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

Negative Control: 0.110 – 0.120 - 0.115
 OD450nm / 620-630nm Mean Value: 0.115 OD450nm / 620-630nm
 Lower than 0.200 – Accepted

HIV 1 Ab Positive Control: 2.000 OD450nm / 620-630nm mean value
 Higher than 0.700 – Accepted

HIV 2 Ab Positive Control: 2.100 OD450nm / 620-630nm mean value
 Higher than 0.700 – Accepted

Calibrator Ag: 0.322 OD450nm / 620-630nm mean value
 S/Co > 1 - Accepted

Cut-Off = 0.115 + 0.125 = 0.240
 Sample 1: 0.070 OD450nm / 620-630nm
 Sample 2: 1.690 OD450nm / 620-630nm
 Sample 1 S/Co < 1 = negative
 Sample 2 S/Co > 1 = positive

R. PERFORMANCES

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

The performance evaluation was carried out in DiaPro's laboratories to validate the HIV Ab&Ag device.

R.1 ANALYTICAL SENSITIVITY

The limit of detection (or analytical sensitivity) of the assay has been calculated by means of preparations specific for HIV-1 and HIV-2 antibody and HIV-1 p24 Ag detection, supplied by NIBSC Blanche Lane South Mimms Potters Bar Hertfordshire EN6 3QG, UK.

Samples were diluted in HIV Ab&Ag negative plasma to generate limiting dilution curves and examined in duplicate.

The tables below reports the mean OD450nm values and the S/Co index:

NIBSC anti-HIV 2 monitor sample code 99/674 – 019

Sample	Lot # 3		Lot # 4		Lot # PS	
	OD	S/Co	OD	S/Co	OD	S/Co
1x	3.982	22.37	3.982	22.25	3.737	20.99
2x	3.982	22.37	3.982	22.25	3.582	20.12
4x	3.947	22.17	3.961	22.13	3.478	19.54
8x	3.871	21.74	3.849	21.50	3.275	18.40
16x	2.969	16.68	2.962	16.55	2.997	16.83
32x	1.670	9.38	1.660	9.27	1.684	9.46
64x	0.953	5.35	0.949	5.30	0.959	5.38
128x	0.527	2.96	0.524	2.92	0.525	2.95
256x	0.313	1.76	0.313	1.75	0.315	1.77
512x	0.187	1.05	0.187	1.04	0.190	1.06
1024x	0.133	0.75	0.133	0.74	0.135	0.76
Negative Control	0.058	0.32	0.057	0.32	0.06	0.33

mean OD450nm Negative = 0.058

Std. Deviation (SD) = 0.025

Analytical Sensitivity = mean OD450nm Negative + 5 SD = 0.183

The device shows a limiting dilution value at 512x.

NIBSC British working standard for anti HIV 1 code 99/750 –024

Sample	Lot # 3		Lot # 4		Lot # PS	
	OD	S/Co	OD	S/Co	OD	S/Co
1x	3.882	21.81	3.894	21.75	3.680	20.67
2x	2.742	15.40	2.722	15.20	2.766	15.54
4x	1.679	9.43	1.676	9.36	1.688	9.48
8x	1.018	5.72	1.010	5.64	1.018	5.72
16x	0.486	2.73	0.485	2.71	0.492	2.76
32x	0.289	1.62	0.290	1.62	0.293	1.64
64x	0.177	0.99	0.178	0.99	0.178	1.00
128x	0.120	0.67	0.120	0.67	0.122	0.69
256x	0.088	0.49	0.088	0.49	0.088	0.49
512x	0.073	0.41	0.073	0.41	0.073	0.41
1024x	0.065	0.36	0.065	0.36	0.065	0.36
Negative Control	0.051	0.29	0.052	0.29	0.054	0.30

mean OD450nm Negative = 0.052

Std. Deviation (SD) = 0.028

Analytical Sensitivity = mean OD450nm Negative + 5 SD = 0.192

The device shows a limiting dilution value at 32x.

NIBSC 1st International reference Reagent for HIV 1 Ag code 90/636 – (Version 4, 12 May 2009)

Sample	Lot # 3		Lot # 4		Lot # PS	
	OD	S/Co	OD	S/Co	OD	S/Co
16	2.734	15.36	2.720	15.19	2.759	15.50
8	1.451	8.15	1.442	8.05	1.466	8.23
4	0.776	4.36	0.777	4.34	0.783	4.40
2	0.446	2.51	0.447	2.50	0.452	2.54
1	0.261	1.47	0.261	1.46	0.263	1.48
0.5	0.160	0.90	0.159	0.89	0.162	0.91
0.25	0.104	0.58	0.104	0.58	0.104	0.58
Negative Control	0.052	0.29	0.052	0.29	0.054	0.30

The device shows a sensitivity ≤ 2 IU/ml as required by CTS:2009.

R.2 DIAGNOSTIC SPECIFICITY AND SENSITIVITY

R.2.1 Diagnostic Specificity:

It is defined as the probability of the assay of scoring negative in the absence of specific analyte.

About 1800 samples negative, were examined, providing a specificity of 100%.

All the most common potential interfering substances including correlated hepatitis viruses antibodies, HTLV I&II, anti E.coli and pregnancy samples were assayed.

No crossreactions or false positive results were found.

R.2.2 Diagnostic Sensitivity

It is defined as the probability of the assay of scoring positive in the presence of specific analyte.

The diagnostic sensitivity has been assessed internally on a total number of 92 positive samples including HIV-2, HIV-1 group O, HIV-1 group M mixed subtypes, HIV-1 p24 Antigen, and cell culture supernatants were evaluated.

The diagnostic sensitivity of 100% was found.

A series of performance panels have been tested. Results are reported in the tables below.

**Etablissement Francais du Sang
Panel Ac anti-HIV Ab (1-6) Lot # 49**

ID	Composition	Lot # 2 S/Co
1	HIV1(1/700)	22.04
2	HIV1(1/160)	25.05
3	HIV1(1/200)	17.91
4	HIV2(1/500)	25.05
5	HIV2(1/500)	25.05
6	negative	0.33

**Etablissement Francais du Sang
Panel Ac anti-HIV Ab (1-6) Lot # 56**

ID	Lot # 3 S/Co	Lot # 4 S/Co
1	17.56	17.85
2	22.43	23.63
3	10.97	12.76
4	22.43	23.63
5	22.43	23.63
6	0.29	0.24

**WHO International Standard HIV (antibody), 1st International
Reference Panel (NIBSC code 02/210)
(Version 5.0, dated 11/12/2012)**

ID	Lot # PS S/Co
1	21.65
2	21.65
3	21.65
4	21.65
5	17.81
6	21.65
7	0.33

**HIV 1/2/O/p24 Qualification Panel
(code 0158)**

ID	Lot # PS S/Co
1	19.98
2	0.35
3	21.65
4	20.42
5	3.96
6	21.65

Finally, 6 seroconversion panels containing samples of HIV 1/2/O Antibodies and/or HIV-1 p24 Antigen positive, obtained from BBI, USA and Zeptomatrix, were evaluated using HIV

Ab/Ag combo ELISA lot # 2 and 4. In the table below results are reported.

Seroconversion Panel	KAPDHIV192 Lot 2	KAPDHIV192 Lot 4
ID	First specimen detected positive in the panel	
PRB 914 (N)	1	1
PRB 930 (AE)	na	1
PRB 950 (AZ)	2	na
PRB 955 (BE)	2	na
PRB 956 (BF)	4	na
HIV9089-65376	4	na

R.3 PRECISION

The precision of the device was assessed by determining its values in a within and between runs. In the table below results are reported for a negative sample and a low positive sample.

Average values N = 72	Negative Sample	Low Positive
S/Co	0.29	9.18
Std.Deviation	0.02	0.283
CV %	7.12	3.08

R4. Accuracy

Accuracy has been estimated through a dilution test.

For such study a high positive sample were first serially diluted in negative serum and then each dilution was tested in 3 replicates in 2 lots.

The following results were obtained:

LOT	IU/ml	Expected S/Co	Measured S/Co	Recovery %
P3	16		15.36	
	8	7.68	8.15	>100
	4	3.84	4.36	>100
	2	1.92	2.51	>100
	1	0.96	1.47	>100
	0.5	0.48	0.90	>100
PS	16		15.50	
	8	7.75	8.23	>100
	4	3.87	4.40	>100
	2	1.94	2.54	>100
	1	0.97	1.48	>100
	0.5	0.48	0.91	>100

R5. High Dose Saturation ("hook effect")

The "hook effect" - or underestimation/misinterpretation of a positive result due to a saturation effect of the analytical system caused by very high doses of analyte - was ruled out with a sample highly reactive for HIV Antibodies and HIV antigen. The undiluted sample showed a very high OD450nm / 620-630nm value and after several dilution in negative serum, both for HIV Antibody and HIV antigen, no saturation effect was observed.

S. LIMITATIONS

The user of this kit is advised to carefully read and understand this package insert. Strict adherence to the protocol is necessary in order to obtain reliable test results. In particular, accurate sample and reagent pipetting, along with careful washing and timing of incubation steps is essential for accurate and reproducible detection of HIV-1 and HIV-2 antibodies and HIV-1 p24 antigen. After the EIA test is performed, repeatedly reactive specimens should be submitted for additional testing using Western Blot (WB), Immunofluorescence Assay (IFA), Radioimmuno precipitation Assay (RIPA) tests and PCR for HIV nucleic acid.

The determination that a person's serum contains antibodies or p24 antigen to HIV 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, developing AIDS and/or AIDS-related conditions is not known.

Falsely reactive test results can be observed with a test kit of this nature. The proportion of reactive samples 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.

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

- 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.
- 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.
- 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.
- Popovic, M., Sarngadharan, M.G., Read, E. and Gallo, R.C., 1984. Detection, Isolation, and Continuous Production of Cytopathic Retroviruses (HTLV-III) from Patients with AIDS and Pre-AIDS. *Science* 224: 497-500.
- 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.
- Vézinet-Brun, F., Barré-Sinoussi, F., Saimot, 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.
- Spire, B., Montagnier, L., Barré-Sinoussi, F. and Chermann, J.-C., 1984. Inactivation of Lymphadenopathy Associated Virus by Chemical Disinfectants. *Lancet*: 899-901, Oct. 20.
- 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 Envir. Microbiol.* 42: 762-767.
- Barre-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. et Montagnier, L. 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220: 868-871.
- Gallo, R.C., Salahuddin, S.Z., Popovic, M., Shearer, G.M., Kaplan, M., Haynes, B.F., Palker, T.J., Redfield, R., Oleske, J., Safai, 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.
- Gold, J., Dwyer, J. 1994. A short history of AIDS. *Med. J. Aust.* 160:251-252.
- Saville R. D., Constantine N. T., Cleghorn F. R. and Al. Fourth-Generation Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the simultaneous Detection of Human Immunodeficiency Virus Antigen and Antibody. *J. of Clin Microbiology*, July 2001, p.2518-2524.
- Bernard Weber, El Hadij Mbargane Fall, Annemarie Berger, Hans Wilhelm Doerr. Reduction of diagnostic Window by New Fourth-Generation Human Immunodeficiency Virus Screening Assays. *J. of Clin. Microb.* Aug. 1998, p. 2235-2239.
- Clark J., Coates T. J., Lescano A. G., et Al. Different Positive Predictive Values of commercially available Human Immunodeficiency Virus Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. *Clin. And Vacc. Immunology.* Feb 2006 p.302-303.
- Novack L., Galai N., Yaari A., Orgel M., Shinar E., Sarov B. Use of Seroconversion Panels to estimate Delay in the detection of Anti-Human Immunodeficiency Virus Antibodies by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of pooled Compared to Singleton Serum Samples. *J. of Clin Microbiol.* Aug. 2006 p.2909-2913.
- Apetrei C, Buzdugan I, Mitroi I, Duca M. The clinical and immunological correlations between the p24 antigenemia levels and those of anti-p24 antibodies in HIV-seropositive

- children. *Bacteriol. Virusol. Parazitol. Epidemiol.* 1995 Apr-Jun;40(2):141-4. Romanian.
- Shumai EP, Vorob'ev SM, Makarova NE, Tugizov ShM, Zverev VV, Kushch AA. The immunoenzyme detection of the HIV-1 antigen by using monoclonal antibodies to protein p24. *Vopr. Virusol.* 1992 Sep-Dec;37(5-6):229-32. Russian.
- d'Arminio Monforte A, Novati R, Marchisio P, Zanchetta N, Uberti-Foppa C, Tornaghi R, Massironi E, Lazzarin A, Principi N. Early diagnosis of HIV infection in infants. *AIDS.* 1989 Jun;3(6):391-5.
- Borghi V, De Rienzo B, Pietrosemoli P, Pecorari M, Mongiardo N, Pellegrino F, Zanchetta GP, Lami G, Squadrini F. Detection of serum HIV-Ag related to the major core protein (p24) in persons at risk for AIDS. *Microbiologica.* 1989 Jan;12(1):81-3.
- Goudsmit J, Lange JM, Krone WJ, Teunissen MB, Epstein LG, Danner SA, van den Berg H, Breederveld C, Smit L, Bakker M, et al. Pathogenesis of HIV and its implications for serodiagnosis and monitoring of antiviral therapy. *J Virol Methods.* 1987 Aug;17(1-2):19-34.
- Lyamuya E, Bredberg-Raden U, Massawe A, Urassa E, Kawo G, Msemu G, Kazimoto T, Ostborn A, Karlsson K, Mhalu F, Biberfeld G. Performance of a modified HIV-1 p24 antigen assay for early diagnosis of HIV-1 infection in infants and prediction of mother-to-infant transmission of HIV-1 in Dar es Salaam, Tanzania. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retroviro.* 1996 Aug 1;12(4):421-6.
- 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.
- Sinico, A., Fora, R., Sciandra, M., Lucchini, A., Caramello, P. and Giannini, P. 1993. Risk of developing AIDS after primary acute HIV-1 infection. *J. of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 6:575-581.
- Ju Lin, Hsiang. 1995. Laboratory tests for human immunodeficiency viruses. *J. Intl. Fed. Clin. Chem.* 7(2):61-66.
- IVD Directive 98/79/CE, Common Technical Specifications (CTS) – Annex II, List A.

All the IVD Products manufactured by the company are under the control of a certified Quality Management System approved by an EC Notified Body. Each lot is submitted to a quality control and released into the market only if conforming with the EC technical specifications and acceptance criteria.

HIV Ab/Ag combo ELISA

RÉF. : KAPDHIV96,
KAPDHIV192,
KAPDHIV480



DIA.PRO DIAGNOSTIC BIOPROBES S.r.l.
Via G. Carducci n°27
20099 Sesto San Giovanni (Milan)-Italie
Téléphone +39 02 27007161
E-mail : info@diapro.it

CE
0318



DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2 - B-1348 Louvain-la-Neuve - Belgique

 **DiaSource**[®]

HIV Ab/Ag combo ELISA

A. UTILISATION PRÉVUE

Le kit est un immuno-essai enzymatique en phase solide pour le dépistage diagnostique *in vitro* des anticorps dirigés contre tous les sous-types du VIH-1 et du VIH-2 et contre l'antigène du VIH-1 (p24) dans le sérum ou le plasma humain.

Ce kit est destiné exclusivement au diagnostic *in vitro* dans un laboratoire clinique agréé et le test doit être effectué par du personnel professionnel de santé spécifiquement formé.

B. INTRODUCTION

Les données épidémiologiques indiquent qu'un agent infectieux transmis par contact intime, usage de drogues par voie intraveineuse ou utilisation de sang ou de produits sanguins infectés entraîne le syndrome d'immunodéficience acquise (sida).

Cette maladie affecte l'immunité médiée par les lymphocytes T, entraînant une lymphopénie sévère et une sous-population réduite de lymphocytes T auxiliaires. La destruction de cette population de lymphocytes T par le virus entraîne une déficience immunitaire qui se traduit par une réponse réduite ou déficiente aux infections ultérieures. Par conséquent, les infections deviennent plus graves et peuvent entraîner la mort. À l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement efficace contre le sida.

L'agent étiologique a été identifié comme étant un rétrovirus, le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1).

Un type de virus de l'immunodéficience étroitement apparenté, mais distinct, appelé VIH-2, a également été isolé. Ce virus est à l'origine d'une maladie qui ne se distingue pas du sida.

La réactivité sérologique croisée entre le VIH-1 et le VIH-2 s'est avérée très variable d'un échantillon à l'autre.

Cette variabilité nécessite l'inclusion d'antigènes du VIH-1 et du VIH-2 pour le dépistage des anticorps anti-VIH-1 et anti-VIH-2.

La présence d'anti-VIH-1 et/ou d'anti-VIH-2 et/ou d'antigène VIH p24 dans le sang indique une infection potentielle par le VIH-1 et/ou le VIH-2 et, par conséquent, ce sang ne doit pas être utilisé pour la transfusion ou la fabrication de produits injectables.

C. PRINCIPE DU TEST

Des antigènes recombinants chimériques représentant des épitopes immunodominants du VIH-1 et du VIH-2, un peptide du groupe O du VIH-1, ainsi que deux anticorps monoclonaux dirigés contre l'antigène p24 du VIH-1, sont déposés dans les puits d'une microplaque.

Les épitopes immunodominants et l'anticorps ont été soigneusement sélectionnés pour garantir le dépistage de l'anticorps et de l'antigène p24 pour tous les sous-types du VIH-1, y compris le sous-type O et le VIH-2. Des échantillons de sérum ou de plasma sont ajoutés à ces puits et, si des anticorps spécifiques du VIH-1 et/ou du VIH-2 (IgG, IgM ou IgA) sont présents dans l'échantillon, ils formeront des complexes stables avec l'antigène recombinant chimérique du VIH ou le peptide du groupe O du VIH-1. Si le p24 du VIH-1 est présent dans l'échantillon, l'antigène sera capturé par l'anticorps monoclonal spécifique et le fragment Fab d'un second anticorps monoclonal complémentaire de l'antigène p24.

Les complexes antigène-anticorps sont ensuite identifiés par l'ajout successif de : (1) un antigène recombinant chimérique biotinylé, peptide du groupe O du VIH-1, un anticorps monoclonal du p24 du VIH-1 et le fragment Fab d'un second anticorps monoclonal complémentaire de l'antigène p24, et (2) un conjugué de peroxydase de raifort (HRP) et de streptavidine. L'activité hydrolytique de la peroxydase de raifort permet de quantifier ces complexes anticorps-antigène.

Une solution de substrat de peroxydase est ensuite ajoutée. Pendant l'incubation, une couleur bleue se développe proportionnellement à la quantité d'anticorps anti-VIH-1/2 ou d'antigène p24 du VIH-1 liés au puits, établissant ainsi leur présence ou leur absence dans l'échantillon. Les puits contenant des échantillons négatifs pour les anticorps anti-VIH et/ou l'antigène p24 restent incolores.

Une solution d'arrêt est ajoutée à chaque puits et la couleur jaune obtenue est lue sur un lecteur de microplaques à 450 nm.

D. COMPOSANTS

Le dispositif est disponible dans les formats commerciaux décrits dans le tableau ci-dessous :

	n° 1	n°2	n°5
1. Microplaque	n° 1	n°2	n°5
2. Contrôle négatif	1x2.0 ml/flacon	1x4 ml/flacon	1x10 ml/flacon
3. Contrôle positif 1	1x2.0 ml/flacon	1x4 ml/flacon	1x10 ml/flacon
4. Contrôle positif 2	1x2.0 ml/flacon	1x4 ml/flacon	1x10 ml/flacon
5. Calibrateur du p24 du VIH.	flacon n°1	flacons n° 2	flacons n° 5
6. Conc. de tampon de lavage	1x60 ml/flacon	2X60 ml/flacon	5X60 ml/flacon
7. Conjugué n° 1	flacons n°4	flacons n° 8	flacons n° 20
8. Diluant du conjugué 1	1x30 ml/flacon	1x60 ml/flacon	3x50 ml/flacon
9. Conjugué n° 2	1x15 ml/flacon	1x25 ml/flacon	2x38 ml/flacon
10. Chrom/Substrat	1x25 ml/flacon	1x45 ml/flacon	3x42 ml/flacon
11. Acide sulfurique	1x15 ml/flacon	1x25 ml/flacon	2x40 ml/flacon
12. Diluant d'échantillon	1x7 ml/flacon	1x14 ml/flacon	1x35 ml/flacon
Films de scellement de plaques	n° 2	n° 4	n° 10
Notice	n° 1	n°1	n°1
Nombre de tests	96	192	480
Code	KAPDHIV96	KAPDHIV192	KAPDHIV480

1. Microplaque

12 barrettes de 8 puits sécables recouverts d'antigène chimérique recombinant portant les séquences gp36, gp41 et gp120 et de deux anticorps monoclonaux spécifiques de l'Ag p24 du VIH-1 et du peptide du groupe O du VIH-1. Les plaques sont scellées dans un sac avec un dessiccant.

2. Contrôle négatif

Contrôle prêt à l'emploi. Il contient du plasma humain défibriné négatif pour les anticorps du VIH et pour l'antigène p24, et 0,045 % de ProClin 300 en guise de conservateur. Le contrôle positif est codé en jaune-brun.

3. Contrôle Ac VIH-1 positif

Contrôle prêt à l'emploi. Il contient du sérum positif inactivé pour les anticorps anti-VIH-2, du sérum animal négatif filtré pour les anticorps anti-VIH et 0,045 % de ProClin 300 en guise de conservateur. Le contrôle positif est codé en vert clair.

Remarque importante : Le contrôle positif a été inactivé à l'aide de B-propionolactone BPL/UV. Cela ne garantit pas totalement l'absence de pathogènes viables et, par conséquent, le contrôle doit être manipulé comme un produit potentiellement dangereux, conformément aux bonnes pratiques de laboratoire.

4. Contrôle Ac VIH-2 positif

Contrôle prêt à l'emploi. Il contient du sérum inactivé positif aux anticorps du VIH-2, du sérum animal filtré négatif aux anticorps du VIH et 0,045 % de ProClin 300 en guise de conservateurs. Le contrôle positif est codé en vert foncé.

Remarque importante : Le contrôle positif a été inactivé à l'aide de B-propionolactone BPL/UV. Cela ne garantit pas totalement l'absence de pathogènes viables et, par conséquent, le contrôle doit être manipulé comme un produit potentiellement dangereux, conformément aux bonnes pratiques de laboratoire.

5. Calibrateur de l'Ag p24 du VIH-1

Lyophilisé. Il contient de l'antigène p24 recombinant non infectieux dans un tampon phosphate 10 mM pH 7,0+/-0,2 avec 0,3 mg/ml de sulfate de gentamicine et 0,045 % de ProClin 300 en guise de stabilisateurs. Ce composant est calibré par rapport à l'antigène standard du VIH-1 de Biorad, code 72217, dilué pour obtenir une concentration d'environ 100 pg/ml ± 20 %.

Remarques importantes :

- 1) Le calibrateur contient de l'Ag recombinant p24 à une concentration d'environ 100 pg/ml, ce qui correspond à 4 UI/ml ± 20 %.
- 2) Le volume nécessaire pour dissoudre le contenu du flacon peut varier d'un lot à l'autre. Veuillez utiliser le volume correct indiqué sur l'étiquette.

6. Concentré de tampon de lavage

2X60 ml/flacon. Solution concentrée 20x. Il contient 0,045 % de ProClin 300. Une fois diluée, la solution de lavage contient 10 mM de solution tampon phosphate pH 7,0+/-0,2 et 0,05 % de Tween 20.

7. Conjugué n° 1

Le flacon contient des peptides gp36, gp41 et gp120 biotinylés lyophilisés du VIH-1, -2 et O, du peptide O du VIH-1 biotinylé, le fragment FAb biotinylé d'un second anticorps monoclonal complémentaire de l'antigène p24 et un anticorps monoclonal biotinylé spécifique de l'antigène p24 du VIH-1. Les flacons doivent être remis en suspension avec 6 ml du diluant du conjugué n° 1.

8. Diluant du conjugué 1

Utilisé pour dissoudre la poudre lyophilisée du conjugué n° 1, il contient un tampon Tris salin additionné de 0,045 % de ProClin 300, de Tween 20 et de BSA.

9. Conjugué n° 2

La solution contient un conjugué streptavidine-HRP dans un tampon Tris salin additionné de 0,045 % de ProClin 300, de Tween 20 et de BSA. Ce composant est codé en rose/rouge.

10. Chromogène / substrat

Composant prêt à l'emploi. Il contient 50 mM de tampon citrate pH 3,5-3,8, 4 % de diméthylsulfoxyde, 0,03 % de tétra-méthylbenzidine ou TMB et 0,02 % de peroxyde d'hydrogène ou H2O2.

Remarque : À conserver à l'abri de la lumière car sensible à un fort éclairage.

11. Acide sulfurique :

Il contient 0,3 M de solution de H₂SO₄. Attention : Irritant (H315, H319; P280, P302+P352, 332+P313, P305+ P351+P338, P337+P313, P362+P363)

12. Diluant de l'échantillon :

Contient un tampon Tris salin complété par 0,045 % de ProClin 300, un bloqueur HAMA, et du Tween 20 ; utilisé pour la dilution de l'échantillon. Ce composant est codé en bleu clair.

13. Films de scellement des plaques

14. Notice

E. MATÉRIEL NÉCESSAIRE, MAIS NON FOURNI

1. Micropipettes calibrées (200 µl et 10 µl) et embouts en plastique jetables.
2. Eau de qualité EIE (bidistillée ou désionisée, traitée au charbon pour éliminer les produits chimiques oxydants utilisés comme désinfectants).
3. Minuterie d'une durée de 60 minutes ou plus.
4. Mouchoirs en papier absorbants.
5. Incubateur thermostatique calibré pour microplaques ELISA, capable de fournir une température de +37 °C.
6. Lecteur de micropuits ELISA calibré avec des filtres de 450 nm (lecture) et de 620-630 nm (suppression).
7. Laveur de microplaques ELISA calibré.
8. Vortex ou outils de mélange similaires.

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.
2. Lorsque le kit est utilisé pour le dépistage des unités de sang et des composants sanguins, il doit être utilisé dans un laboratoire certifié et qualifié par l'autorité nationale dans ce domaine (ministère de la santé ou entité similaire) pour effectuer ce type d'analyse.
3. Tout le personnel impliqué dans la réalisation de l'analyse doit porter des vêtements de laboratoire protecteurs, des gants sans talc et des lunettes. L'utilisation de tout dispositif tranchant (aiguilles) ou coupant (lames) doit être évitée. Tout le personnel impliqué doit être formé aux procédures de biosécurité, comme le recommande le Center for Disease Control, Atlanta, États-Unis, et comme l'indique la publication de l'Institut national de la santé : « Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories », éd. 1984.
4. Tout le personnel impliqué dans la manipulation des échantillons doit être vacciné contre le VHB et le VHA, pour lesquels il existe des vaccins sûrs et efficaces.
5. L'environnement du laboratoire doit être contrôlé de manière à éviter les contaminants tels que la poussière ou les agents microbiens présents dans l'air, lors de l'ouverture des flacons du kit et des microplaques et lors de la réalisation du test. Protégez le chromogène / substrat d'une forte lumière et évitez les vibrations de la surface de la paillasse où le test est effectué.
6. Dès réception, conservez le kit à une température comprise entre 2 et 8 °C dans un réfrigérateur ou une chambre froide à température contrôlée.
7. N'intervertissez pas les composants entre les différents lots du kit. Il est recommandé de ne pas intervertir les composants entre deux kits d'un même lot.
8. Vérifiez que les réactifs sont clairs et ne contiennent pas de particules lourdes ou d'agrégats visibles. Si ce n'est pas le cas, demandez au superviseur du laboratoire d'entamer les procédures nécessaires au remplacement du kit.
9. Évitez la contamination croisée entre les échantillons de sérum / plasma en utilisant des embouts jetables et en les changeant après chaque échantillon. Ne réutilisez pas les embouts jetables.
10. Évitez la contamination croisée entre les réactifs du kit en utilisant des embouts jetables et en les changeant entre chaque utilisation. Ne réutilisez pas les embouts jetables.
11. N'utilisez pas le kit après la date de péremption indiquée sur les étiquettes du contenant externe et du contenant interne (flacons).
12. Traitez tous les échantillons comme potentiellement infectieux. Tous les échantillons de sérum humain doivent être manipulés au niveau de biosécurité 2, comme le recommande le Center for Disease Control, Atlanta, États-Unis, comme l'indique la publication de l'Institut national de la santé : « Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories », éd. 1984.
13. L'utilisation d'ustensiles en plastique jetables est recommandée pour la préparation des composants liquides ou pour le transfert des composants dans les stations de travail automatisées, afin d'éviter toute contamination croisée.
14. Les déchets produits lors de l'utilisation du kit doivent être éliminés conformément aux directives et lois nationales concernant les déchets de laboratoire de substances chimiques et biologiques. En particulier, les déchets liquides générés par la procédure de lavage, les résidus des contrôles et les échantillons doivent être traités comme du matériel

potentiellement infectieux et inactivé

avant d'être jetés. Les procédures d'inactivation suggérées sont le traitement avec une concentration finale de 10 % d'eau de Javel pendant 16 à 18 heures ou l'inactivation par la chaleur dans un autoclave à 121 °C pendant 20 minutes.

15. Les renversements accidentels provenant d'échantillons et d'opérations doivent être absorbés avec des mouchoirs en papier imbibés d'eau de Javel, puis d'eau. Les mouchoirs doivent ensuite être jetés dans des conteneurs appropriés destinés aux déchets biologiques / d'hôpital.

16. L'acide sulfurique est irritant. En cas de renversement, lavez abondamment à l'eau.

17. Les autres déchets générés par l'utilisation du kit (exemple : embouts utilisés pour les échantillons et les contrôles, microplaques usagées) doivent être traités comme des déchets potentiellement infectieux et éliminés conformément aux directives et lois nationales concernant les déchets biologiques.

G. ÉCHANTILLON : PRÉPARATION ET RECOMMANDATIONS

1. Le sang est prélevé aseptiquement par ponction veineuse et le plasma ou le sérum est préparé selon les techniques standard de préparation des échantillons pour l'analyse de biologie clinique. Aucune influence n'a été observée dans la préparation de l'échantillon avec du citrate, de l'EDTA et de l'héparine.

2. Évitez d'ajouter des conservateurs aux échantillons, en particulier de l'azide de sodium, car ce produit chimique affecterait l'activité enzymatique du conjugué, ce qui entraînerait des résultats faussement négatifs.

3. Les échantillons doivent être clairement identifiés par des codes ou des noms afin d'éviter toute erreur d'interprétation des résultats. Lorsque le kit est utilisé pour le dépistage des unités de sang, il est fortement recommandé d'apposer un code-barres et de procéder à une lecture électronique.

4. Les échantillons hémolysés (rouges) et visiblement hyperlipémiques (« laiteux ») doivent être éliminés car ils peuvent générer des résultats erronés. Les échantillons contenant des résidus de fibrine ou des particules lourdes ou des filaments et corps microbiens doivent être écartés car ils peuvent donner lieu à des résultats erronés.

5. Les sérums et le plasma peuvent être conservés à une température de +2 à +8 °C dans les tubes de prélèvement primaires jusqu'à cinq jours après le prélèvement.

Ne congelez pas les tubes de prélèvement primaires. Pour des périodes de conservation plus longues, les échantillons de sérum et de plasma, soigneusement retirés du tube de de prélèvement primaire, peuvent être conservés congelés à -20 °C pendant au moins 12 mois. Les échantillons congelés ne doivent pas être congelés / décongelés plus d'une fois, car cela pourrait générer des particules susceptibles d'affecter le résultat du test.

6. Si des particules sont présentes, filtrez en utilisant des filtres de 0,2 à 0,8 µ pour nettoyer l'échantillon pour le test.

7. N'utilisez pas d'échantillons inactivés par la chaleur, car ils pourraient donner lieu à une fausse réactivité.

H. PRÉPARATION DES COMPOSANTS ET MISES EN GARDE

Une étude réalisée sur un kit ouvert n'a pas montré de perte d'activité significative jusqu'à 2 mois.

Microplaques :

Laissez la microplaque atteindre la température ambiante (environ 1 heure) avant d'ouvrir le contenant. Vérifiez que la pochette n'est pas cassée ou qu'il n'y a pas de défaut indiquant un problème de conservation. Dans pareil cas, contactez le service clientèle de Dia.Pro.

Les barrettes non utilisées doivent être replacées dans la pochette en aluminium, en présence du dessiccant fourni, correctement scellée et conservée à une température comprise entre

+2 et 8 °C. Lors de la première ouverture, les barrettes résiduelles restent stables jusqu'à deux mois.

Contrôle négatif :

Prêt à l'emploi. Bien mélanger au vortex avant utilisation.

Contrôles Ac positifs :

Les contrôles positifs sont prêts à l'emploi. Manipuler les contrôles Ac positifs comme potentiellement infectieux, même si le VIH, s'il est présent dans le contrôle, a été chimiquement inactivé.

Calibrateur Ag

Le calibrateur Ag lyophilisé contient un antigène p24 recombinant non infectieux. Le volume d'eau de qualité EIE à utiliser pour sa dissolution et pour atteindre la concentration de p24 appropriée (environ 100 pg/ml) est indiqué sur l'étiquette du flacon. Pour faciliter la dissolution du culot lyophilisé, mélanger plusieurs fois au vortex, à intervalles réguliers. La dissolution complète devrait être obtenue en 2 à 5 minutes.

Remarque : *Lorsqu'il est dissous, le calibrateur n'est pas stable. Conservez en parties aliquotées à -20 °C.*

Concentré de tampon de lavage :

La solution concentrée 20x doit être diluée avec de l'eau de qualité EIE jusqu'à 1 200 ml et retournée délicatement pour la mélanger avant utilisation. Comme des cristaux de sel peuvent être présents dans le flacon, veillez à dissoudre tout le contenu lors de la préparation de la solution.

Lors de la préparation, évitez de faire mousser la solution, car la présence de bulles pourrait nuire à l'efficacité du lavage.

Remarque importante : *Une fois diluée, la solution de lavage est stable pendant 1 semaine à une température comprise entre +2 et 8 °C.*

Conjugué n° 1 :

La solution de mélange du conjugué n° 1 doit être préparée immédiatement avant de commencer le test. Ajoutez 6 ml de diluant du conjugué n° 1 directement dans un flacon de conjugué n° 1 pour dissoudre la poudre lyophilisée. Cette préparation (un total de 6 ml dans un flacon) est suffisante pour 32 tests, ou 4 barrettes verticales complètes de la microplaque. Pour faciliter la dissolution de la poudre lyophilisée, mélangez plusieurs fois au vortex, à intervalles réguliers.

Remarque importante : *Toute portion non utilisée de cette solution reconstituée de conjugué n° 1 peut être conservée à une température comprise entre +2 et 8 °C pendant 12 heures au maximum. Après ce délai, elle doit être jetée et le récipient vide utilisé doit être lavé avec de l'eau de qualité EIE et conservé au sec en vue d'une éventuelle réutilisation.*

Conjugué n° 2 :

Réactif prêt à l'emploi. Retournez pour bien mélanger avant utilisation.

Chromogène / substrat :

Prêt à l'emploi Retournez pour bien mélanger avant utilisation. Veillez à ne pas contaminer le liquide avec des produits chimiques oxydants, des poussières présentes dans l'air ou des microbes.

N'exposez pas le produit à une forte lumière, à des agents oxydants ou à des surfaces métalliques.

Si ce composant doit être transféré, n'utilisez que des récipients en plastique, si possible stériles et jetables.

Acide sulfurique :

Prêt à l'emploi Retournez pour bien mélanger avant utilisation. Attention : Irritant (H315, H319; P280, P302+P352, 332+P313, P305+ P351+P338, P337+P313, P362+P364).

Légende :

Mentions de danger (H) :

H315 – Provoque une irritation cutanée

H319 – Provoque une grave irritation oculaire.

Mentions de précaution (P) :

P280 – Porter des gants de protection / des vêtements de protection / un équipement de protection des yeux/du visage.

P302 + P352 – EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU : Laver abondamment à l'eau et au savon.

P332 + P313 – En cas d'irritation cutanée : consulter un médecin

P305 + P351 + P338 – EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : Rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et

si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.

P337 + P313 – Si l'irritation oculaire persiste : consulter un médecin

P362 + P363 – Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation.

Diluant de l'échantillon :

prêt à l'emploi Retournez pour bien mélanger avant utilisation.

I. INSTRUMENTS ET OUTILS UTILISÉS EN COMBINAISON AVEC LE KIT

- Les micropipettes** doivent être calibrées pour délivrer le volume correct requis par le test et doivent être soumises à une décontamination régulière (alcool ménager, solution d'eau de Javel à 10 %, désinfectants de qualité hospitalière) des parties qui pourraient accidentellement entrer en contact avec l'échantillon. Elles doivent également être régulièrement entretenues afin de présenter une précision de 1 % et une justesse de +/-2 %. La décontamination des déversements ou des résidus des composants du kit doit également être effectuée régulièrement.
- L'incubateur ELISA** doit être réglé à +37 °C (tolérance de +/-0,5 °C) et être régulièrement contrôlé pour s'assurer que la température correcte est maintenue. Les incubateurs secs et les bains-marie conviennent aux incubations, à condition que l'instrument soit validé pour l'incubation des tests ELISA.
- Le laveur ELISA** est extrêmement important pour les performances globales du test. Le laveur doit être soigneusement validé à l'avance, vérifié pour la délivrance du bon volume de distribution et régulièrement soumis à l'entretien selon les instructions d'utilisation du fabricant. En particulier, à la fin de la charge de travail quotidienne, le laveur doit être soigneusement nettoyé des sels avec de l'eau désionisée. Avant utilisation, le laveur doit être largement amorcé avec la solution de lavage diluée. L'instrument doit être décontaminé chaque semaine conformément à son manuel (décontamination au NaOH 0,1 M suggérée).
5 cycles de lavage (aspiration + distribution de 350 ul/puits de solution de lavage + 20 secondes de trempage = 1 cycle) sont suffisants pour garantir le test avec les performances déclarées. Si le trempage n'est pas possible, ajoutez un cycle de lavage supplémentaire.
Un cycle de lavage incorrect ou des aiguilles bloquées par le sel sont les principales causes de réactions faussement positives.
- Les temps d'incubation ont une tolérance de ±5 %.
- Le lecteur de microplaques ELISA** doit être équipé d'un filtre de lecture de 450 nm et d'un second filtre de 620-630 nm, obligatoire à des fins de suppression. Ses performances standard doivent être les suivantes : a) largeur de bande ≤ 10 nm ; b) plage d'absorbance de 0 à ≥ 2,0 ; c) linéarité à ≥ 2,0 ; d) répétabilité ≥ 1 %. La suppression est effectuée sur le puits identifié dans la section « Procédure de test ». Le système optique du lecteur doit être calibré régulièrement pour garantir que la densité optique mesurée est correcte. Il doit être régulièrement entretenu conformément aux instructions du fabricant.
- Lors de l'utilisation d'une **station de travail automatisée ELISA**, toutes les étapes critiques (distribution, incubation, lavage, lecture, traitement des données) doivent être soigneusement réglées, calibrées, contrôlées et régulièrement entretenues afin de correspondre aux valeurs indiquées dans les sections « Contrôle interne de la qualité ». Le protocole de test doit être installé dans le système d'exploitation de l'unité et validé comme pour le laveur et le lecteur. En outre, la partie de la station relative à la manipulation des liquides (distribution et lavage) doit être validée et correctement réglée. Une attention particulière doit être accordée à la prévention de l'entraînement par les aiguilles utilisées pour la distribution et le lavage. Ce phénomène doit être étudié et contrôlé afin de minimiser le risque de contamination des puits adjacents. L'utilisation de stations de travail automatisées ELISA est recommandée pour le dépistage sanguin lorsque le nombre d'échantillons à tester est supérieur à 20-30 unités par série.
- Lors de l'utilisation d'appareils automatiques, si le porte-flacon de l'instrument ne convient pas aux flacons fournis dans le kit, transférez la solution dans des récipients appropriés et étiquetez-les avec la même étiquette que celle décollée du flacon d'origine. Cette opération est importante pour éviter de confondre le contenu des flacons lors de leur transfert. Une fois le test terminé, remettez les récipients réétiquetés à une température comprise entre 2 et 8 °C,

Doc. :	INS KAPDHIV/fra	Page	6 sur 11	Rév. : 0	Date : 2021/11c
--------	-----------------	------	----------	----------	-----------------

bien fermés.

- Le service clientèle de Dia.Pro offre une assistance à l'utilisateur pour le réglage et la vérification des instruments utilisés en combinaison avec le kit, afin d'assurer la conformité avec les exigences décrites. Une assistance est également fournie pour l'installation de nouveaux instruments à utiliser avec le kit.

correctement identifié. Mélangez doucement la plaque sur la surface de travail, en évitant de déborder et de contaminer les puits adjacents, afin de disperser complètement l'échantillon dans le diluant.

- Incubez la microplaque pendant **60 minutes à +37 °C**.

Remarque importante : les bandelettes doivent être scellées à l'aide du film adhésif fourni uniquement lorsque le test est effectué manuellement. Ne pas recouvrir les barrettes lors de l'utilisation d'instruments automatiques ELISA.

L. CONTRÔLES ET OPÉRATIONS PRÉALABLES AUX TESTS

- Vérifiez la date de péremption du kit imprimée sur l'étiquette extérieure de la boîte du kit. Ne l'utilisez pas s'il est périmé.
- Vérifiez que les composants liquides ne sont pas contaminés par des particules ou des agrégats visibles à l'œil nu. Vérifier que le chromogène / substrat est incolore ou bleu pâle en aspirant un petit volume à l'aide d'une pipette stérile en plastique transparent. Vérifiez qu'il n'y a pas eu de rupture pendant le transport et qu'aucun liquide ne s'est répandu à l'intérieur de la boîte. Vérifiez que la pochette en aluminium contenant la microplaque n'est pas percée ou endommagée.
- Diluez tout le contenu de la solution de lavage concentrée 20x comme décrit ci-dessus.
- Dissolvez le calibrateur Ag.
- Dissolvez le flacon de conjugué n° 1 contenant la poudre lyophilisée avec le diluant du conjugué n° 1 (1 conjugué n° 1 lyophilisé + 6 ml de diluant du conjugué n° 1) pour obtenir le mélange de conjugué n° 1 comme décrit dans la section appropriée.
- Laissez tous les autres composants atteindre la température ambiante (environ 1 heure), puis mélangez comme décrit.
- Régalez l'incubateur ELISA à +37 °C et préparez le laveur ELISA en l'amorçant avec la solution de lavage diluée, selon les instructions du fabricant. Régalez le bon nombre de cycles de lavage comme indiqué dans la section spécifique.
- Vérifiez que le lecteur ELISA a été allumé au moins 20 minutes avant la lecture.
- Si vous utilisez une station de travail automatisée, mettez-la en marche, vérifiez les réglages et assurez-vous d'utiliser le bon protocole de dosage.
- Vérifiez que les micropipettes sont réglées sur le volume requis.
- Vérifiez que tous les autres équipements sont disponibles et prêts à l'emploi.
- En cas de problème, ne poursuivez pas le test et informez le superviseur.

- Lavez la microplaque à l'aide d'un laveur automatique en délivrant et en aspirant 350 ul/puits de solution de lavage diluée comme indiqué précédemment (section I.3).
- Pipetez 150 ul de mélange de conjugué n° 1, préparé comme décrit précédemment, dans chaque puits, à l'exception du 1^{er} puits de suppression, et couvrez avec le scellant.

Remarque importante : veillez à ne pas toucher la surface intérieure en plastique du puits avec l'embout rempli de conjugué. Une contamination pourrait se produire.

- Incubez la microplaque pendant **30 minutes à +37 °C**.
- Pipetez 100 ul de conjugué n° 2 dans tous les puits, sauf le A1, et agitez doucement la microplaque pour mélanger les deux conjugués.

Remarque importante : cette solution doit être ajoutée au fond de chaque puits pour garantir une bonne performance. Un mélange inadéquat des deux solutions (conjugué 1 et conjugué 2) peut réduire la liaison du conjugué streptavidine-HRP (conjugué 2) aux réactifs biotinylés et, par conséquent, affecter la performance du test. Veillez à ce que le mélange soit adéquat lors de l'ajout du conjugué n° 2, aussi bien dans les procédures manuelles qu'automatisées.

- Incubez la microplaque scellée pendant **30 minutes à +37 °C**.
- Lavez comme indiqué à la section 7.
- Distribuer 200 ul du mélange chromogène / substrat dans chaque puits, y compris le puits blanc. Incubez ensuite la microplaque à **température ambiante (18 à 25 °C) pendant 30 minutes**. Démarrez le chronométrage immédiatement après l'ajout de ce composant dans le premier puits.

Remarque importante : ne pas exposer à une forte lumière directe. Un bruit de fond élevé pourrait être généré.

- Pipetez 100 ul d'acide sulfurique dans tous les puits en utilisant la même séquence de pipetage qu'à l'étape 13 pour arrêter la réaction enzymatique. L'ajout d'acide fera passer les contrôles positifs et les échantillons positifs du bleu au jaune/brun.
- Mesurez l'intensité de la couleur de la solution dans chaque puits, comme décrit dans la section I.5, au filtre 450 nm (lecture) et à 620-630 nm (soustraction du fond, obligatoire), en mettant l'instrument à blanc sur A1

Remarques importantes :

- assurez-vous qu'aucune empreinte digitale n'est présente au fond du micropuits avant la lecture. Les empreintes digitales peuvent générer des résultats faussement positifs lors de la lecture.
- La lecture doit être effectuée juste après l'ajout de la solution d'arrêt et de toute façon pas plus de 30 minutes après son ajout. Une certaine auto-oxydation du chromogène peut se produire et entraîner un bruit de fond élevé.
- Le calibrateur (CAL) n'affecte pas le calcul du seuil et donc le calcul des résultats du test. Le calibrateur ne peut être utilisé que lorsqu'un contrôle de qualité interne au laboratoire est exigé par la direction.

M. PROCÉDURE DE TEST

Le test doit être réalisé conformément à ce qui est indiqué ci-dessous, en veillant à respecter le même temps d'incubation pour tous les échantillons testés.

1. Test automatisé :

Si le test est effectué automatiquement avec un système ELISA, nous suggérons que l'instrument distribue d'abord 50 ul de diluant d'échantillon, puis 150 ul de contrôles et d'échantillons. Avant d'aspirer l'échantillon suivant, les aiguilles doivent être dûment lavées pour éviter toute contamination croisée entre les échantillons ou les embouts doivent être changés. Pour les opérations suivantes, suivez les instructions indiquées ci-dessous pour le test manuel. Il est fortement recommandé de vérifier que le temps écoulé entre la distribution du premier et du dernier échantillon sera calculé par l'instrument et pris en considération en retardant la première opération de lavage en conséquence. Le nombre correct de conjugué n° 1 lyophilisé doit être dissous, pour chaque conjugué, avec 6 ml de diluant du conjugué n° 1. Une fois que les poudres lyophilisées sont dissoutes et bien mélangées, elles doivent être mélangées ensemble dans un récipient en plastique et le test peut commencer.

2. Test manuel :

- Dissolvez le bon nombre de conjugué n° 1 lyophilisé avec le diluant du conjugué n° 1 avant de commencer à distribuer les échantillons et les contrôles du test.
- Placez le nombre requis de barrettes dans le support de micropuits. Laissez le 1^{er} puits vide pour l'opération de suppression.
- Distribuez 50 ul de diluant pour échantillon dans tous les puits, à l'exception du puits A1 utilisé pour la suppression.
- Distribuez 150 ul de contrôle négatif en trois exemplaires, 150 ul de contrôle positif VIH-1, 150 ul de contrôle positif VIH-2 et 150 ul de calibrateur Ag en deux exemplaires dans les puits appropriés.
- Distribuez 150 ul d'échantillon dans chaque puits

N. SCHÉMA DE TEST

Méthode	Opérations
Diluant de l'échantillon	50 ul
Échantillons de contrôles et de calibrateur	150 ul 150 ul
1^{re} incubation	60 min
Température	+37 °C
Étape de lavage	Cycles n° 5 avec 20" de trempage OU Cycles n° 6 sans trempage
Conjugué n° 1	150 ul
2^e incubation	30 min
Température	+37 °C
Conjugué n° 2	100 ul
3^e incubation	30 min
Température	+37 °C
Étape de lavage	Cycles n° 5 avec 20" de trempage OU Cycles n° 6 sans trempage
TMB/H ₂ O ₂	200 ul
4^e incubation	30 min
Température	t. amb.
Acide sulfurique	100 ul
Lecture OD	450 nm / 620-630 nm

Vous trouverez ci-dessous un exemple de schéma de distribution:

Microplaque

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

Légende : BLK = blanc (suppression) NC = contrôle négatif POS 1 Ab = contrôle positif de l'Ac du VIH-1, POS 2 Ab = Ac du VIH-2 positif, CAL Ag = calibrateur de l'Ag p24 du VIH, S = échantillon

O. CONTRÔLE QUALITÉ INTERNE

Une vérification est effectuée sur les contrôles et le calibrateur à chaque utilisation du kit afin de vérifier si leurs valeurs OD450 nm / 620-630 nm sont conformes à celles attendues et reportées dans le tableau ci-dessous.

Vérification	Exigences
Puits blanc	Valeur < 0,100 OD450 nm / 620-630 nm
Contrôle négatif (NC)	≤ 0,200 valeur moyenne OD450 nm / 620-630 nm après suppression L'absorbance des valeurs individuelles du contrôle négatif doit être inférieure ou égale à 0,200. Si une valeur se situe en dehors de cette plage, écartez-la et recalculz la moyenne. Si deux valeurs se situent en dehors de cette plage, il convient de répéter l'opération.
Contrôle positif de l'Ac du VIH-1	S/Co ≥ 3,5
Contrôle positif de l'Ac du VIH-2	S/Co ≥ 7,5
Calibrateur de l'Ag du VIH	S/Co > 1,5

Si les résultats du test correspondent aux exigences énoncées ci-dessus, passez à la section suivante.

Si ce n'est pas le cas, n'allez pas plus loin et procédez comme suit :

Si ces problèmes surviennent, après vérification, signalez tout problème résiduel au superviseur pour qu'il prenne les mesures qui s'imposent.

Problème	Vérifiez
Puits blanc > 0,100 OD450 nm / 620-630 nm	1. que la solution de chromogène /substrat n'a pas été contaminée pendant le test
Contrôle négatif (NC) > 0,200 OD450 nm / 620-630 nm après suppression	1. que la procédure de lavage et les réglages du laveur sont conformes à ce qui a été validé dans l'étude de préqualification ; 2. que la solution de lavage appropriée a été utilisée et que le laveur a été amorcé avec cette solution avant l'utilisation ; 3. qu'aucune erreur n'a été commise dans la procédure de dosage (distribution du contrôle positif au lieu du contrôle négatif) ; 4. qu'aucune contamination du contrôle négatif ou de ses puits n'a eu lieu en raison d'échantillons positifs, de renversements ou du conjugué enzymatique ; 5. que les micropipettes n'ont pas été contaminées par des échantillons positifs ou par le conjugué enzymatique ; 6. que les aiguilles du laveur ne sont pas bloquées ou partiellement obstruées.
Contrôles positifs : CP1 < 3,5 CP2 < 7,5	1. que la procédure a été correctement exécutée ; 2. qu'aucune erreur n'a été commise dans la distribution des contrôles (distribution du contrôle négatif au lieu du contrôle positif). Dans ce cas, le contrôle négatif aura également une valeur OD450 nm / 620-630 nm > 0,200 ; 3. que la procédure de lavage et les réglages du laveur sont conformes à ce qui a été validé dans l'étude de préqualification ; 4. qu'il n'y a pas eu de contamination externe du contrôle positif.
Calibrateur de l'Ag du VIH S/Co < 1,5	1. que la procédure a été correctement exécutée ; 2. qu'aucune erreur n'a été commise dans la distribution des contrôles (distribution du contrôle négatif au lieu du calibrateur de l'Ag). Dans ce cas, le contrôle négatif aura également une valeur OD450 nm / 620-630 nm > 0,200 ; 3. que la procédure de lavage et les réglages du laveur sont conformes à ce qui a été validé dans l'étude de préqualification ; 4. qu'il n'y a pas eu de contamination externe du contrôle positif ; 5. que la poudre lyophilisée a été dissoute correctement avec le volume d'eau indiqué sur l'étiquette du flacon.

P. CALCUL DU SEUIL

Les résultats des tests sont calculés à l'aide d'une valeur seuil déterminée par la formule suivante sur la valeur moyenne OD450 nm / 620-630 nm du contrôle négatif (NC) :

$$NC + 0,125 = \text{seuil (Co)}$$

La valeur trouvée pour le test est utilisée pour l'interprétation des résultats comme décrit dans le paragraphe suivant.

Remarque importante : lorsque le calcul des résultats est effectué par le système opérationnel d'une station de travail automatisé ELISA, assurez-vous que la formulation appropriée est utilisée pour calculer la valeur limite et générer les interprétations correctes des résultats.

Q. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les résultats du test sont interprétés comme le rapport entre la densité optique de l'échantillon (OD450 nm / 620-630 nm) et la valeur de seuil (ou S/Co), conformément au tableau suivant :

S/Co	Interprétation
< 1	Négatif
> 1	Positif

Un résultat négatif indique que le patient n'a pas été infecté par le VIH.

Si la valeur d'absorbance initiale est égale ou supérieure à la valeur seuil, retestez l'échantillon en double. Si les deux valeurs du nouveau test sont inférieures au seuil, l'interprétation n'est pas réactive pour l'anticorps et/ou l'antigène du VIH (négatif).

Si l'une des valeurs de retest ou les deux sont égales ou supérieures à la valeur seuil, l'interprétation des résultats du test est « positif répétable ». L'échantillon doit être considéré comme réactif ou positif pour l'anticorps et/ou l'antigène du VIH selon les critères de ce test ELISA VIH.

Un résultat positif indique une infection par le VIH et le patient doit donc être traité en conséquence.

Remarques importantes :

1. L'interprétation des résultats doit se faire sous la supervision du responsable du laboratoire afin de réduire le risque d'erreurs de jugement et d'interprétations erronées.
2. Les échantillons positifs répétables doivent être soumis à un test de confirmation avant que le diagnostic d'infection par le VIH ne soit posé.
3. Lorsque les résultats des tests sont transmis du laboratoire à un centre informatique, il convient de veiller à éviter tout transfert de données erroné.
4. Le diagnostic de l'infection par le VIH ne doit être posé et communiqué au patient que par un médecin qualifié.

Vous trouverez ci-dessous un exemple de calcul :

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

Contrôle négatif : (0,110) – 0,120 – 0,115
OD450 nm / 620-630 nm Valeur moyenne : 0,115 OD450 nm / 620-630 nm Inférieur à 0,200 – Accepté

Contrôle positif de l'Ac du VIH-1 : 2,000 OD450 nm / 620-630 nm valeur moyenne Supérieur à 0,700 – Accepté

Contrôle positif de l'Ac du VIH-2 : 2,100 OD450 nm / 620-630 nm valeur moyenne Supérieur à 0,700 – Accepté

Calibrateur Ag : 0,322 OD450 nm / 620-630 nm valeur moyenne S/Co > 1 – Accepté

Seuil = 0,115 + 0,125 = 0,240
Échantillon 1 : 0,070 OD450 nm / 620-630 nm
Échantillon 2 : 1,690 OD450 nm / 620-630 nm Échantillon 1 S/Co < 1 = négatif
Échantillon 2 S/Co > 1 = positif

R. PERFORMANCES

L'évaluation des performances a été effectuée à l'origine conformément aux spécifications techniques communes (STC) (art. 5, chapitre 3 de la directive 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro).

L'évaluation des performances a été réalisée dans les laboratoires de DiaPro afin de valider le dispositif HIV Ab&Ag.

R.1 SENSIBILITÉ ANALYTIQUE

La limite de détection (ou sensibilité analytique) du test a été calculée à l'aide de préparations spécifiques pour la détection des anticorps VIH-1 et VIH-2 et de l'Ag p24 du VIH-1, fournies par NIBSC Blanche Lane South Mimms Potters Bar Hertfordshire EN6 3QG, Royaume-Uni.

Les échantillons ont été dilués dans du plasma négatif pour l'Ac et l'Ag du VIH afin de générer des courbes de dilution limitante, et ont été examinés en double.

Les tableaux ci-dessous indiquent les valeurs moyennes de OD450 nm et l'indice S/Co :

Échantillon de contrôle anti-VIH-2 Code NIBSC 99/674 – 019

Echantillon	Lot n° 3		Lot n° 4		Lot PS	
	OD	S/Co	OD	S/Co	OD	S/Co
1x	3,982	22,37	3,982	22,25	3,737	20,99
2x	3,982	22,37	3,982	22,25	3,582	20,12
4x	3,947	22,17	3,961	22,13	3,478	19,54
8x	3,871	21,74	3,849	21,50	3,275	18,40
16x	2,969	16,68	2,962	16,55	2,997	16,83
32x	1,670	9,38	1,660	9,27	1,684	9,46
64x	0,953	5,35	0,949	5,30	0,959	5,38
128x	0,527	2,96	0,524	2,92	0,525	2,95
256x	0,313	1,76	0,313	1,75	0,315	1,77
512x	0,187	1,05	0,187	1,04	0,190	1,06
1024x	0,133	0,75	0,133	0,74	0,135	0,76
Contrôle négatif	0,058	0,32	0,057	0,32	0,06	0,33

moyenne OD450 nm négative = 0,058

écart- type (SD) = 0,025

Sensibilité analytique = moyenne OD450 nm négative + 5 SD = 0,183

L'appareil indique une valeur limite de dilution à 512x.

Standard de travail britannique pour le VIH-1 (anticorps)

Code NIBSC : 99/750 –024

Echantillon	Lot n° 3		Lot n° 4		Lot PS	
	OD	S/Co	OD	S/Co	OD	S/Co
1x	3,882	21,81	3,894	21,75	3,680	20,67
2x	2,742	15,40	2,722	15,20	2,766	15,54
4x	1,679	9,43	1,676	9,36	1,688	9,48
8x	1,018	5,72	1,010	5,64	1,018	5,72
16x	0,486	2,73	0,485	2,71	0,492	2,76
32x	0,289	1,62	0,290	1,62	0,293	1,64
64x	0,177	0,99	0,178	0,99	0,178	1,00
128x	0,120	0,67	0,120	0,67	0,122	0,69
256x	0,088	0,49	0,088	0,49	0,088	0,49
512x	0,073	0,41	0,073	0,41	0,073	0,41
1024x	0,065	0,36	0,065	0,36	0,065	0,36
Contrôle négatif	0,051	0,29	0,052	0,29	0,054	0,30

moyenne OD450 nm négative = 0,052

écart- type (SD) = 0,028

Sensibilité analytique = moyenne OD450 nm négative + 5 SD = 0,192

L'appareil indique une valeur limite de dilution à 32x.

Premier réactif de référence international, antigène p24 du VIH-1, code NIBSC 90/636 – (Version 4, 12 mai 2009)

Echantillon (UI/ml)	Lot n° 3		Lot n° 4		Lot PS	
	OD	S/Co	OD	S/Co	OD	S/Co
16	2,734	15,36	2,720	15,19	2,759	15,50
8	1,451	8,15	1,442	8,05	1,466	8,23
4	0,776	4,36	0,777	4,34	0,783	4,40
2	0,446	2,51	0,447	2,50	0,452	2,54
1	0,261	1,47	0,261	1,46	0,263	1,48
0,5	0,160	0,90	0,159	0,89	0,162	0,91
0,25	0,104	0,58	0,104	0,58	0,104	0,58
Contrôle négatif	0,052	0,29	0,052	0,29	0,054	0,30

L'appareil présente une sensibilité ≤ 2 UI/ml comme l'exige la norme CTS:2009.

R.2 SPÉCIFICITÉ ET SENSIBILITÉ DIAGNOSTIQUES

R.2.1 Spécificité diagnostique :

Elle est définie comme la probabilité que le test donne un résultat négatif en l'absence de l'analyte spécifique.

Environ 1 800 échantillons négatifs ont été examinés, ce qui donne une spécificité de 100 %.

Toutes les substances interférentes potentielles les plus courantes, y compris les anticorps corrélés des virus de l'hépatite, du HTLV I et II, anti-E.coli et des échantillons de grossesse, ont été testées.

Aucune réaction croisée ni aucun résultat faussement positif n'a été constaté(e).

R.2.2 Sensibilité diagnostique

Elle est définie comme la probabilité que le test donne un résultat positif en présence d'un analyte spécifique.

La sensibilité diagnostique a été évaluée en interne sur un nombre total de 92 échantillons positifs comprenant le VIH-2, le VIH-1 groupe O, le VIH-1 groupe M sous-types mixtes, l'antigène p24 du VIH-1 et les surnageants de culture cellulaire. Une sensibilité diagnostique de 100 % a été observée.

Une série de panels de performance a été testée. Les résultats sont présentés dans les tableaux ci-dessous.

Établissement Français du Sang Panel Ac anti-VIH (1-6) Lot n° 49		
ID	Composition	Lot n° 2 S/Co
1	VIH-1(1/700)	22,04
2	VIH-1(1/160)	25,05
3	VIH-1(1/200)	17,91
4	VIH-2(1/500)	25,05
5	VIH-2(1/500)	25,05
6	négatif	0,33

Établissement Français du Sang Panel Ac anti-VIH (1-6) Lot n° 56		
ID	Lot n° 3 S/Co	Lot n° 4 S/Co
1	17,56	17,85
2	22,43	23,63
3	10,97	12,76
4	22,43	23,63
5	22,43	23,63
6	0,29	0,24

Standard international de l'OMS pour le VIH (anticorps), 1er panel international de référence (code NIBSC 02/210) (Version 5.0 du 11/12/2012)

ID	Lot PS S/Co
1	21,65
2	21,65
3	21,65
4	21,65
5	17,81
6	21,65
7	0,33

Panel de qualification VIH-1/2/O/p24 (code 0158)

ID	Lot PS S/Co
1	19,98
2	0,35
3	21,65
4	20,42
5	3,96
6	21,65

Enfin, 6 panels de **séroconversion** contenant des échantillons d'anticorps du VIH-1/2/0 et/ou d'antigène p24 du VIH-1 positifs, obtenus auprès de BBI, États-Unis et Zeptometrix, ont été évalués à l'aide du test ELISA Ac/Ag combo lots n° 2 et 4. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Panel de séroconversion	KAPDHIV192 Lot 2	KAPDHIV192 Lot 4
ID	Premier échantillon détecté positif dans le panel	
PRB 914 (N)	1	1
PRB 930 (AE)	S.O.	1
PRB 950 (AZ)	2	S.O.
PRB 955 (BE)	2	S.O.
PRB 956 (BF)	4	S.O.
HIV9089-65376	4	S.O.

R.3 PRÉCISION

La précision de l'appareil a été évaluée en déterminant ses valeurs à l'intérieur d'une série et entre deux séries. Dans le tableau ci-dessous, les résultats sont rapportés pour un échantillon négatif et un échantillon faiblement positif.

Valeurs moyennes N = 72	Échantillon négatif	Faible Positif
S/Co	0,29	9,18
Écart-type	0,02	0,283
%CV	7,12	3,08

R4. Précision

La précision a été estimée par un test de dilution.

Pour cette étude, un échantillon fortement positif a d'abord été dilué en série dans du sérum négatif, puis chaque dilution a été testée en 3 répétitions dans 2 lots.

Les résultats suivants ont été obtenus :

LOT	(UI/ml)	S/Co attendu	S/Co mesuré	Récupération %
P3	16		15,36	
	8	7,68	8,15	>100
	4	3,84	4,36	>100
	2	1,92	2,51	>100
	1	0,96	1,47	>100
	0,5	0,48	0,90	>100
PS	16		15,50	
	8	7,75	8,23	>100
	4	3,87	4,40	>100
	2	1,94	2,54	>100
	1	0,97	1,48	>100
	0,5	0,48	0,91	>100

R5. Saturation à dose élevée (« effet crochet »)

L'« effet crochet » - ou sous-estimation / mauvaise interprétation d'un résultat positif dû à un effet de saturation du système analytique causé par des doses très élevées d'analytes - a été exclu avec un échantillon hautement réactif pour les anticorps et l'antigène du VIH. L'échantillon non dilué a montré une valeur OD450 nm / 620-630 nm très élevée et après plusieurs dilutions dans du sérum négatif, à la fois pour les anticorps du VIH et l'antigène du VIH, aucun effet de saturation n'a été observé.

S. LIMITATIONS

Il est conseillé à l'utilisateur de ce kit de lire attentivement et de comprendre cette notice. Le respect strict du protocole est nécessaire pour obtenir des résultats de test fiables. En particulier, un pipetage précis de l'échantillon et des réactifs, ainsi qu'un lavage soigneux et une synchronisation des étapes d'incubation sont essentiels pour une détection précise et reproductible des anticorps anti-VIH-1 et anti-VIH-2 et de l'antigène p24 du VIH-1.

Après la réalisation du test EIA, les échantillons réagissant de manière répétée doivent être soumis à des tests supplémentaires par Western Blot (WB), test d'immunofluorescence (IFA), test de radio-immunoprécipitation (RIPA) et PCR pour la détection de l'acide nucléique du VIH.

La détermination que le sérum d'une personne contient des anticorps ou l'antigène p24 du VIH a des implications médicales, sociales, psychologiques et économiques considérables.

Il est recommandé que la confidentialité, des conseils appropriés et une évaluation médicale soient considérés comme un aspect essentiel de la séquence de test. Le sida et les affections liées au sida sont des maladies cliniques et leur diagnostic ne peut être établi que cliniquement.

Le test EIA ne permet pas à lui seul de diagnostiquer le sida.

Un résultat de test non réactif à n'importe quel moment de la séquence de test n'exclut pas la possibilité d'une exposition au VIH ou d'une infection par le VIH. Le risque qu'une personne asymptomatique, dont la réactivité est répétée, développe le sida et/ou des pathologies liées au sida n'est pas connu.

Des résultats faussement réactifs peuvent être observés avec un kit de test de cette nature. La proportion d'échantillons réactifs dépend de la sensibilité et de la spécificité du kit de test et de la prévalence des anticorps anti-VIH-1 et anti-VIH-2 dans la population à dépister.

La présence d'anticorps anti-VIH peut être due à la participation volontaire à une étude sur le vaccin anti-VIH.

L'interprétation de ce test diagnostique dépendra du type de vaccin administré. Une corrélation avec les antécédents médicaux et des tests supplémentaires peuvent être nécessaires pour diagnostiquer avec précision le VIH chez les volontaires vaccinés.

BIBLIOGRAPHIE

- 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.
- 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.
- 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.
- Popovic, M., Sarngadharan, M.G., Read, E. and Gallo, R.C., 1984. Detection, Isolation, and Continuous Production of Cytopathic Retroviruses (HTLV-III) from Patients with AIDS and Pre-AIDS. *Science* 224: 497-500.
- 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.
- Vézinet-Brun, F., Barré-Sinoussi, F., Saimot, 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.
- Spire, B., Montagnier, L., Barré-Sinoussi, F. and Chermann, J.-C., 1984. Inactivation of Lymphadenopathy Associated Virus by Chemical Disinfectants. *Lancet*: 899-901, Oct. 20.
- 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 Envir. Microbiol.* 42: 762-767.
- Barre-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. et Montagnier, L. 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220: 868-871.
- Gallo, R.C., Salahuddin, S.Z., Popovic, M., Shearer, G.M., Kaplan, M., Haynes, B.F., Palker, T.J., Redfield, R., Oleske, J., Safai, 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.
- Gold, J., Dwyer, J. 1994. A short history of AIDS. *Med. J. Aust.* 160:251-252.
- Saville R. D., Constantine N. T., Cleghorn F. R. and Al. Fourth-Generation Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the simultaneous Detection of Human Immunodeficiency Virus Antigen and Antibody. *J. of Clin Microbiology*, July 2001, p.2518-2524.
- Bernard Weber, El Hadij Mbargane Fall, Annemarie Berger, Hans Wilhelm Doerr. Reduction of diagnostic Window by New Fourth-Generation Human Immunodeficiency Virus Screening Assays. *J. of Clin. Microb.* Aug. 1998, p. 2235-2239.
- Clark J., Coates T. J., Lescano A. G., et Al. Different Positive Predictive Values of commercially available Human Immunodeficiency Virus Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. *Clin. And Vacc. Immunology.* Feb 2006 p.302-303.
- Novack L., Galai N., Yaari A., Orgel M., Shinar E., Sarov B. Use of Seroconversion Panels to estimate Delay in the detection of Anti-Human Immunodeficiency Virus Antibodies by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of pooled Compared to Singleton Serum Samples. *J. of Clin Microbiol.* Aug. 2006 p.2909-2913.
- Apetrei C, Buzdugan I, Mitroi I, Duca M. The clinical and immunological correlations between the p24 antigenemia levels and those of anti-p24 antibodies in HIV-seropositive children. *Bacteriol. Virusol. Parazitol. Epidemiol.* 1995 Apr-Jun;40(2):141-4. Romanian.
- Shumai EP, Vorob'ev SM, Makarova NE, Tugizov ShM, Zverev VV, Kushch AA. The immunoenzyme detection of the HIV-1 antigen by using monoclonal antibodies to protein p24. *Vopr. Virusol.* 1992 Sep-Dec;37(5-6):229-32. Russian.
- d'Arminio Monforte A, Novati R, Marchisio P, Zanchetta N, Uberti-Foppa C, Tornaghi R, Massironi E, Lazzarin A, Principi N. Early diagnosis of HIV infection in infants. *AIDS.* 1989 Jun;3(6):391-5.
- Borghi V, De Rienzo B, Pietrosomoli P, Pecorari M, Mongiardo N, Pellegrino F, Zanchetta GP, Lami G, Squadrini F. Detection of serum HIV-Ag related to the major core protein (p24) in persons at risk for AIDS. *Microbiologica.* 1989 Jan;12(1):81-3.
- Goudsmit J, Lange JM, Krone WJ, Teunissen MB, Epstein LG, Danner SA, van den Berg H, Breederveld C, Smit L, Bakker M, et al. Pathogenesis of HIV and its implications for serodiagnosis and monitoring of antiviral therapy. *J Virol Methods.* 1987 Aug;17(1-2):19-34.
- Lyamuya E, Bredberg-Raden U, Massawe A, Urassa E, Kawo G, Msemu G, Kazimoto T, Ostborn A, Karlsson K, Mhalu F, Biberfeld G. Performance of a modified HIV-1 p24 antigen assay for early diagnosis of HIV-1 infection in infants and prediction of mother-to-infant transmission of HIV-1 in Dar es Salaam, Tanzania. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 1996 Aug 1;12(4):421-6.
- 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.
- Sinicco, A., Fora, R., Sciandra, M., Lucchini, A., Caramello, P. and Giannini, P. 1993. Risk of developing AIDS after primary acute HIV-1 infection. *J. of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 6:575-581.
- Ju Lin, Hsiang. 1995. Laboratory tests for human immunodeficiency viruses. *J. Intl. Fed. Clin. Chem.* 7(2):61-66.
- IVD Directive 98/79/CE, Common Technical Specifications (CTS) – Annex II, List A.

All the IVD Products manufactured by the company are under the control of a certified Quality Management System approved by an EC Notified Body. Each lot is submitted to a quality control and released into the market only if conforming with the EC technical specifications and acceptance criteria.