

IVD

CE

# Sclavo-EIA HIV 1/2 Ab/Ag

Ref ELI902001

Istruzioni d'uso

Rev. E ELI902001-05-2022



**Sclavo Diagnostics International**  
Loc. Pian dei Mori, via Po n° 26-28 • 53018 (SI) (Italy)  
Phone +39 0577 390 41 • Fax +39 0577 390 444  
[www.sclavodiagnostics.com](http://www.sclavodiagnostics.com)

## A. USO CONSIGLIATO

Slavo-EIA HIV 1/2 Ab / Ag è un kit ELISA di 4° generazione per lo screening simultaneo degli anticorpi totali contro tutti i sottotipi di HIV-1, HIV-2, HIV-O e per il rilevamento della proteina p24 dell'HIV-1 nel plasma e nel siero umani. Questo kit può essere utilizzato per lo screening di campioni di donatori di sangue nelle banche del sangue e per il follow-up di pazienti con infezione da virus dell'immunodeficienza umana (HIV) nei laboratori diagnostici, esclusivamente da personale tecnico specializzato.

## B. INTRODUZIONE

I due virus dell'immunodeficienza umana, HIV-1 e HIV-2, sono membri della famiglia dei Retrovirus, nel genere dei Lentivirus. L'infezione da HIV è bifasica. La fase iniziale, che può essere così lieve da passare inosservata, si verifica subito dopo l'infezione. Questa sindrome acuta si risolve spontaneamente e la maggior parte dei casi rimane asintomatica per un periodo di alcuni anni. Alla fine, tuttavia, si sviluppa un'immunodisfunzione progressiva, associata alla deplezione dei linfociti T4 (CD4 +), che predispone questi individui a una serie di infezioni opportunistiche, tumori e altre condizioni note come sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS). Il principale agente mondiale dell'AIDS è l'HIV-1, mentre l'HIV-2 è limitato ad alcune regioni dell'Africa occidentale e centrale.

L'HIV solitamente viene trasmesso per contatto con sangue, derivati del sangue, sperma, secrezioni vaginali o latte materno di una persona infetta.

La reattività crociata sierologica tra HIV-1 e HIV-2 ha dimostrato di essere altamente variabile da campione a campione.

Questa variabilità richiede l'inclusione di antigeni sia dell'HIV-1 che dell'HIV-2 per lo screening degli anticorpi contro l'HIV-1 e l'HIV-2.

La presenza di anti-HIV-1 e/o anti-HIV-2 e/o antigene HIV p24 nel sangue indica una potenziale infezione da HIV-1 e/o HIV-2 e di conseguenza questo sangue non deve essere usato per trasfusioni o per la fabbricazione di prodotti iniettabili.

## C. PRINCIPIO DEL METODO

La fase solida (pozzetti per microtitolazione) è sensibilizzata con epitopi immunodominanti chimerici di antigeni ricombinanti dell'HIV-1 e dell'HIV-2, un peptide del gruppo O dell'HIV-1 e da due anticorpi monoclonali contro l'antigene p24 dell'HIV-1. Gli epitopi immunodominanti e gli anticorpi anti-p24 sono stati accuratamente selezionati per la loro reattività a tutti i sottotipi di HIV-1, incluso il sottotipo O, e l'HIV-2.

I campioni diluiti vengono aggiunti nei pozzetti da microtitolazione e, se nel campione sono presenti anticorpi specifici per HIV-1 e / o HIV-2 (IgG, IgM o IgA), formeranno complessi stabili con l'antigene chimerico ricombinante dell'HIV o col peptide gruppo O dell'HIV-1. Nel caso in cui l'antigene p24 di HIV-1 sia presente nel campione, questo sarà catturato dall'anticorpo monoclonale specifico e dal frammento Fab di un secondo anticorpo monoclonale complementare all'antigene p24.

Dopo una fase di lavaggio per rimuovere le proteine non legate, i complessi antigene-anticorpo vengono rilevati mediante l'aggiunta, in due fasi separate, di:

Fase 1: antigene chimerico ricombinante biotinilato, peptide del gruppo O dell'HIV-1, anticorpo monoclonale contro l'HIV-1 p24 e frammento Fab di un secondo anticorpo monoclonale complementare contro l'antigene p24;

Fase 2: coniugato di perossidasi (HRP) - Streptavidina.

La presenza di anticorpi anti-HIV1 e anti-HIV2 e della proteina p24 viene rivelata aggiungendo il substrato incolore TMB per avviare la reazione colorimetrica. Il colore blu che si sviluppa è proporzionale alla quantità di anticorpo/antigene legato alla fase solida. La reazione enzimatica viene bloccata con una soluzione acida e il colore della miscela di reazione passa dal blu al giallo.

## D. COMPONENTI DEL KIT E LORO PREPARAZIONE

Il kit è per 96 test e contiene i seguenti materiali.

### Micropiastra

### **MICROPLATE**

12 strisce x 8 pozzetti rivestiti con antigene chimerico ricombinante recante sequenze gp36, gp41 e gp120 e con due anticorpi monoclonali specifici per il peptide HIV-1 p24 Ag e HIV-1 gruppo O in una busta richiudibile con sacchetto essiccante.

Equilibrare la micropiastra a temperatura ambiente (1 ora) prima di aprire la busta. Se l'indicatore di umidità (sacchetto essiccante) è diventato verde scuro, non utilizzare la micropiastra.

Riporre le strisce inutilizzate nella busta richiudibile con l'indicatore di umidità, premere per rimuovere l'aria, chiudere saldamente la busta e conservare a 2-8°C. Dopo la prima apertura, le strisce possono essere utilizzate fino a quando l'indicatore di umidità non è virato da giallo a verde.

**Controllo negativo****CONTROL -****GHS07**

1 flacone x 2 ml. Pronto all'uso. Codice colore: giallo-marrone. Agitare accuratamente su vortex prima dell'uso. Plasma umano defibrinato negativo per gli anticorpi anti-HIV e per l'antigene p24. Conservanti: sodio azide (0,09%) e Proclin™ 300 (0,045%).

**Avvertenza:** ATTENZIONE – Sensibilizzante (H317; P261; P280; P362+P364; P333+P313; P321:P501).

*Contiene reaction mass of 5-chloro-2-methyl-4-iso-thiazolin-3-one and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1) (CAS 55965-84-9)*

**Controllo positivo HIV-1 Ab****CONTROL 1+****GHS07**

1 flacone x 2 ml. Pronto all'uso. Codice colore: verde chiaro. Agitare accuratamente su vortex prima dell'uso. Contiene siero inattivato positivo per anticorpi HIV-1, siero animale filtrato HIV Ab e Ag negativo. Conservanti: Proclin™ 300 (0,045%).

**Nota importante:** *Trattare come potenzialmente infetto. Il siero umano è stato inattivato con beta-propiolattone/ irradiazione ultravioletta, ma ciò non garantisce completamente che non siano presenti particelle virali vitali nel siero.*

**Avvertenza:** ATTENZIONE - Sensibilizzante (H317; P261; P280; P362+P364; P333+P313; P321:P501).

*Contiene reaction mass of 5-chloro-2-methyl-4-iso-thiazolin-3-one and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1) (CAS 55965-84-9)*

**Controllo positivo HIV-2 Ab****CONTROL 2+****GHS07**

1 flacone x 2 ml. Pronto all'uso. Codice colore: verde scuro. Agitare accuratamente su vortex prima dell'uso. Contiene siero inattivato positivo per anticorpi HIV-2, siero animale filtrato HIV Ab e Ag negativo. Conservanti: Proclin™ 300 (0,045%).

**Nota importante.** *Trattare come potenzialmente infetto. Il siero umano è stato inattivato con beta-propiolattone / irradiazione ultravioletta, ma ciò non garantisce completamente che non siano presenti particelle virali vitali nel siero.*

**Avvertenza:** ATTENZIONE - Sensibilizzante (H317; P261; P280; P362+P364; P333+P313; P321:P501).

*Contiene reaction mass of 5-chloro-2-methyl-4-iso-thiazolin-3-one and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1) (CAS 55965-84-9)*

**Calibratore Cal Ag****CAL Ag****GHS07**

1 flacone. Liofilizzato. Da ricostituire con il volume di acqua di grado EIA riportato in etichetta. Agitare delicatamente su vortex prima dell'uso fino a completa dissoluzione (da 2 a 5 minuti sono generalmente sufficienti). p24 ricombinante non infettivo in tampone fosfato 10 mM pH 7.0 Questo componente è calibrato contro lo standard Bio-Rad HIV-1 Antigen Standard codice 72217, diluito per ottenere una concentrazione di circa 100 pg/ml ±20%. Conservanti: gentamicina solfato (0,02%) e Proclin™ 300 (0,045%).

**Nota importante.** *Una volta ricostituito, il calibratore non è stabile. Preparare aliquote e conservare a -20°C per un massimo di 6 mesi.*

**Avvertenza:** ATTENZIONE - Sensibilizzante (H317; P261; P280; P362+P364; P333+P313; P321:P501).

*Contiene reaction mass of 5-chloro-2-methyl-4-iso-thiazolin-3-one and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1) (CAS 55965-84-9)*

**Tampone di lavaggio concentrato****WASHBUF 20X****GHS09****GHS07**

1 bottiglia x 60 ml. Concentrato 20 volte. Portare al volume finale di 1200 ml utilizzando acqua di grado EIA. Una volta diluito contiene 10 mM di tampone fosfato pH 7.0, 0,5% Tween 20, Na-azide (0,09%) e Proclin™ 300 (0,045%). Verificare attentamente che non vi siano cristalli di sale non disciolti, se necessario mescolare fino a completa dissoluzione.

**Importante:** evitare la formazione di schiuma durante la risospensione in quanto potrebbe dare origine a falsi risultati.

**Importante:** una volta ricostituito, il tampone pronto per l'uso è stabile 1 settimana a 2-8°C.

**Avvertenza:** ATTENZIONE - Sensibilizzante / Pericoloso per l'ambiente (H317; H411; P101; P102; P103; P261; P273; P280; P333+P313; P321; P501).

Contiene reaction mass of 5-chloro-2-methyl-4-iso-thiazolin-3-one and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1) (CAS 55965-84-9)

#### Coniugato 1

**CONJ 1**

4 flaconi. Liofilizzato. Da ricostituire con 6 ml di diluente coniugato 1. Agitare su vortex alcune volte con brevi intervalli per aiutare a sciogliere il materiale liofilizzato. Questo volume di coniugato n. 1 (un totale di 6 ml in una fiala) è sufficiente per 32 test o 4 strisce verticali complete della micropiastra. Peptidi HIV1 & 2 & O biotinilati gp36, gp41 e gp120, peptide HIV1 O biotinilato, frammento FAb biotinilato di un secondo anticorpo monoclonale complementare all'antigene p24 e un anticorpo monoclonale biotinilato specifico per l'antigene p24 dell'HIV 1.

**Nota importante:** la soluzione di coniugato n.1 ricostituito può essere conservata a +2-8°C per non più di 12 ore. Trascorso questo tempo, deve essere scartata.

#### Diluente Coniugato 1

**CONJ1 DIL**



GHS07

1 flacone x 30 ml. Da utilizzare per ricostituire diluente liofilizzato coniugato n.1HRP. Tampone Tris, Tween 20 e BSA. Conservanti: Proclin™ 300 (0,045%).

**Avvertenza:** ATTENZIONE - Sensibilizzante (H317; P261; P280; P362+P364; P333+P313; P321:P501).

Contiene reaction mass of 5-chloro-2-methyl-4-iso-thiazolin-3-one and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1) (CAS 55965-84-9)

#### Coniugato 2

**CONJ 2**



GHS07

1 flacone x 15 ml. Pronto all'uso. Codice colore: rosa / rosso. Mescolare per inversione prima dell'uso. HRP coniugato con streptavidina in tampone salino Tris integrato con Tween 20 e BSA. Conservanti: Proclin™ 300 (0,045%).

**Avvertenza:** ATTENZIONE – Sensibilizzante (H317; P101; P102; P103; P261; P280; P362+P364; P333+P313; P321+P501).

Contiene reaction mass of 5-chloro-2-methyl-4-iso-thiazolin-3-one and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1) (CAS 55965-84-9)

#### Substrato

**SUBS TMB**

1 flacone x 25 ml. Pronto all'uso. Agitare accuratamente su vortex prima dell'uso. 0,03% di tetrametilbenzidina (TMB), 4% di dimetilsolfossido e 0,02% di perossido di idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) stabilizzati in tampone citrato 50 mM (pH 3,8).

**Importante:** non esporre a forte illuminazione, agenti ossidanti (es. fumi di ipoclorito), superfici metalliche; conservare al riparo dalla luce.

#### Acido solforico

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3 M**



GHS05

1 flacone x 25 ml. Pronto all'uso. Mescolare per inversione prima dell'uso.

Soluzione 0.3 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

**Avvertenza:** PERICOLO - Corrosivo (H314; P303+P361+P353; P305+P351+P338; P310; P321; P405; P501).

Contiene Acido Solforico (CAS 7664-93-9)

Diluyente del campione

**DILSPE**



**GHS07**

1 flacone x 14 ml. Pronto all'uso. Codice colore: azzurro. Mescolare per inversione prima dell'uso. Da utilizzare per la diluizione dei campioni.

Tampone salino Tris integrato con bloccante anti-HAMA e Tween 20. Conservanti: Proclin™ 300 (0,045%).

**Avvertenza:** ATTENZIONE – Sensibilizzante (H317; P101, P102; P103; P261; P280; P362+P364; P333+P313; P321; P501  
Contiene reaction mass of 5-chloro-2-methyl-4-iso-thiazolin-3-one and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1) (CAS 55965-84-9)

### Legenda:

#### Dichiarazioni di avvertenza H:

H314 – Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari.

H317 – Può provocare una reazione allergica cutanea.

H411 – Tossico per gli organismi acquatici con effetti a lunga durata.

#### Dichiarazioni precauzionali P:

P101 – In caso di consultazione di un medico, tenere a disposizione il contenitore o l'etichetta del prodotto.

P102 – Tenere fuori dalla portata dei bambini.

P103 – Leggere attentamente e seguire tutte le istruzioni.

P261 – Evitare di respirare la polvere/ i fumi/ i gas/ la nebbia / i vapori/ gli aerosol.

P273 – Non disperdere nell'ambiente.

P280 – Indossare guanti di protezione.

P310 – Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico.

P321 – Trattamento specifico (vedere su questa etichetta)

P303+P361+P353 – IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE (o con i capelli): togliersi di dosso immediatamente tutti gli indumenti contaminati. Sciacquare la pelle/fare una doccia.

P305+P351+P338 – IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.

P333+P313 – In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico.

P362+P364 - Togliere gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente.

P405 – Conservare sotto chiave.

P501 – Smaltire il prodotto/ recipiente in conformità con le disposizioni locali / regionali / nazionali / internazionali.

**Pellicole adesive per coprire la micropiastra** 2

**Libretto istruzioni per l'uso** 1

### **E. Materiali necessari ma non forniti**

Vetreteria da laboratorio: cilindri graduati, pipette, ecc. di dimensioni adeguate.

Micropipette monocanale regolabili in grado di erogare 10 µL e 200 µL e puntali in plastica monouso.

Acqua distillata di grado EIA.

Letto di micropozzetti a doppia lunghezza d'onda in grado di leggere a 450 nm con un filtro di riferimento di 620 - 630 nm. Se il filtro di riferimento non è disponibile, assicurarsi che il fondo dei pozzetti da microtitolazione sia pulito (non toccare senza guanti).

Incubatore a 37°C ±1°C (a secco o umidificato).

Lavatore ELISA multicanale calibrato.

Agitatore a vortice o similare.

Timer.

Carta assorbente per asciugare la micropiastra.

## F. PRECAUZIONI E AVVERTENZE

ATTENZIONE: alcuni componenti di questo kit contengono materiali di origine umana (derivati del sangue) pertanto, devono essere trattati come potenzialmente infettivi. Si consiglia di manipolare questi reagenti e i campioni umani utilizzando buone pratiche di laboratorio consolidate.

1. Il kit deve essere utilizzato solo da personale tecnico qualificato e adeguatamente formato, sotto la supervisione di un medico responsabile del laboratorio.
2. Quando il kit è utilizzato per lo screening di unità ematiche ed emocomponenti, deve essere utilizzato in un laboratorio certificato e qualificato dall'autorità nazionale del settore (Ministero della Salute o entità simile) per effettuare questo tipo di analisi.
3. Tutto il personale coinvolto nell'esecuzione del test deve indossare indumenti protettivi da laboratorio, guanti privi di talco e occhiali. Evitare l'uso di dispositivi affilati (aghi) o taglienti (lame). Tutto il personale coinvolto deve essere formato nelle procedure di biosicurezza, come raccomandato dal Center for Disease Control, Atlanta, USA e riportato nella pubblicazione del National Institute of Health: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
4. Tutto il personale coinvolto nella manipolazione dei campioni deve essere vaccinato per HBV e HAV, i cui vaccini sono disponibili, sicuri ed efficaci.
5. L'ambiente del laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminanti come polvere o agenti microbici presenti nell'aria, quando si aprono le fiale del kit e le micropiastre e durante l'esecuzione del test. Proteggere il cromogeno / substrato dalla luce intensa ed evitare le vibrazioni della superficie del banco su cui viene eseguito il test.
6. Al ricevimento, conservare il kit a 2-8°C in un frigorifero o in una cella frigorifera a temperatura controllata.
7. Dopo apertura, la stabilità dei singoli reagenti è quella riportata nella sezione D
8. Non scambiare componenti tra lotti diversi dei kit. Si raccomanda di non scambiare i componenti tra due kit dello stesso lotto.
9. Verificare che i reagenti siano limpidi e non contengano particelle pesanti o aggregati visibili. In caso contrario, consigliare al supervisore del laboratorio di avviare le procedure necessarie per la sostituzione del kit.
10. Evitare la contaminazione incrociata tra campioni di siero / plasma utilizzando puntali monouso e sostituendoli dopo ogni campione. Non riutilizzare le punte usa e getta.
11. Evitare la contaminazione incrociata tra i reagenti del kit utilizzando puntali monouso e cambiandoli tra l'uso di ciascuno di essi. Non riutilizzare le punte usa e getta.
12. Non utilizzare il kit integro dopo la data di scadenza indicata sul contenitore esterno e sulle etichette interne (flaconcini).
13. Trattare tutti i campioni come potenzialmente infettivi. Tutti i campioni di siero umano devono essere manipolati al livello di biosicurezza 2, come raccomandato dal Center for Disease Control, Atlanta, Stati Uniti, in conformità a quanto riportato nella pubblicazione dell'Institutes of Health: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
14. Si raccomanda l'uso di utensili monouso in plastica nella preparazione dei componenti liquidi o nel trasferimento dei componenti in postazioni di lavoro automatizzate, al fine di evitare contaminazioni incrociate.
15. I rifiuti prodotti durante l'uso del kit devono essere smaltiti in conformità alle direttive e leggi nazionali relative ai rifiuti di laboratorio di sostanze chimiche e biologiche. In particolare, i rifiuti liquidi generati dalla procedura di lavaggio, dai residui dei controlli e dai campioni devono essere trattati come materiale potenzialmente infettivo e inattivati prima di essere smaltiti. Le procedure di inattivazione suggerite sono il trattamento con una concentrazione finale del 10% di candeggina per uso domestico per 16-18 ore o l'inattivazione termica in autoclave a 121°C per 20 minuti.
16. Fuoriuscite accidentali da campioni e operazioni devono essere adsorbite con fazzoletti di carta imbevuti di candeggina domestica e poi con acqua. I fazzoletti devono quindi essere eliminati in contenitori appropriati designati ai rifiuti di laboratorio/ospedale.
17. L'acido solforico è un irritante. In caso di fuoriuscite, lavare la superficie con abbondante acqua.
18. Altri materiali di scarto generati dall'uso del kit (esempio: puntali usati per campioni e controlli, micropiastre usate) devono essere trattati come potenzialmente infettivi e smaltiti secondo le direttive nazionali e le leggi relative ai rifiuti di laboratorio.

## G. CAMPIONE: TIPO, PREPARAZIONE E RACCOMANDAZIONI.

1. Il sangue viene prelevato in modo asettico mediante prelievo venoso e il plasma o il siero vengono preparati utilizzando tecniche standard di preparazione dei campioni per analisi cliniche di laboratorio. L'uso di anticoagulanti come citrato, EDTA ed eparina non interferisce con i test.
2. Evitare qualsiasi aggiunta di conservanti ai campioni; in particolare sodio azide poiché questa sostanza chimica influirebbe sull'attività enzimatica del coniugato, generando risultati falsi negativi.
3. I campioni devono essere chiaramente identificati con codici o nomi per evitare interpretazioni errate dei risultati. Quando il kit viene utilizzato per lo screening delle unità di sangue, l'etichettatura con codice a barre e la lettura elettronica sono fortemente raccomandate.
4. I campioni emolizzati (rossastri) e visibilmente fortemente lipemici ("lattiginosi") devono essere scartati in quanto potrebbero generare falsi risultati. I campioni contenenti residui di fibrina o particelle pesanti o filamenti e corpi microbici devono essere scartati in quanto potrebbero dare origine a falsi risultati.

5. I sieri e il plasma possono essere conservati a 2°-8°C in provette di raccolta primaria per un massimo di cinque giorni dopo la raccolta. Non congelare le provette primarie di raccolta. Per periodi di conservazione più lunghi, i campioni di siero e plasma, accuratamente rimossi dalla provetta di raccolta primaria, possono essere conservati congelati a -20 ° C secondo le procedure di conservazione dei campioni validate dal Laboratorio. I campioni congelati non devono essere congelati / scongelati più di una volta poiché ciò potrebbe generare particelle che potrebbero influenzare il risultato del test.
6. Se sono presenti particelle, centrifugare a 2.000 rpm per 20 minuti o filtrare utilizzando filtri da 0,2 - 0,8 micron per chiarificare il campione per il test.

#### **H. STRUMENTI UTILIZZATI IN ABBINAMENTO AL KIT**

1. Le micropipette devono essere calibrate per dispensare il volume corretto richiesto dal test e devono essere sottoposte a regolare decontaminazione (alcool domestico, soluzione di candeggina al 10%, disinfettanti di grado ospedaliero) di quelle parti che potrebbero entrare accidentalmente in contatto con il campione. Dovrebbero inoltre essere regolarmente mantenute per mostrare una precisione dell'1% e una veridicità del +/-2%. Anche la decontaminazione delle fuoriuscite o dei residui dei componenti del kit deve essere eseguita regolarmente.
2. L'incubatore ELISA deve essere impostato a +37°C (tolleranza di +/-0,5°C) e controllato regolarmente per garantire il mantenimento della temperatura corretta. Sia gli incubatori a secco che i bagnomaria sono adatti per le incubazioni, a condizione che lo strumento sia validato per l'incubazione dei test ELISA.
3. Il lavatore ELISA è estremamente importante per le prestazioni complessive del test. Il lavatore deve essere attentamente convalidato in anticipo, controllato per l'erogazione del giusto volume di erogazione e regolarmente sottoposto a manutenzione secondo le istruzioni per l'uso del produttore. In particolare il lavatore, al termine del carico di lavoro quotidiano, deve essere ampiamente ripulito dai sali con acqua deionizzata. Prima dell'uso, il lavatore deve essere ampiamente pretrattato con la soluzione di lavaggio diluita. Lo strumento deve essere sottoposto settimanalmente a decontaminazione secondo il suo manuale (suggerita decontaminazione NaOH 0,1 M). Cinque (5) cicli di lavaggio (aspirazione + dispensazione di 350 µl / pozzetto di soluzione di lavaggio + 20 sec di attesa = 1 ciclo) sono sufficienti per garantire l'analisi con le prestazioni dichiarate. Se l'attesa non è possibile aggiungere un ciclo di lavaggio in più. Un ciclo di lavaggio errato o gli aghi bloccati dal sale sono la principale causa di reazioni false positive.
4. I tempi di incubazione hanno una tolleranza del +/-5%.
5. Il lettore di micropiastre ELISA deve essere dotato di un filtro di lettura di 450nm e di un secondo filtro di 620-630nm, obbligatorio per scopi di blanking. Le sue prestazioni standard dovrebbero essere (a) larghezza di banda <10 nm; (b) intervallo di assorbanza da 0 a > 2,0; (c) linearità fino a > 2,0; (d) ripetibilità > 1%. Il blanking viene eseguito sul pozzetto identificato nella sezione "Procedura di analisi". Il sistema ottico del lettore deve essere calibrato regolarmente per garantire che venga misurata la densità ottica corretta. Deve essere sottoposto a regolare manutenzione secondo le istruzioni del produttore.
6. Quando si utilizza una stazione di lavoro automatizzata ELISA, tutti i passaggi critici (dispensazione, incubazione, lavaggio, lettura, gestione dei dati) devono essere attentamente impostati, calibrati, controllati e sottoposti a regolare manutenzione al fine di corrispondere ai valori riportati nella sezione O "Controllo di qualità interno". Il protocollo del test deve essere installato nel sistema operativo dell'unità e convalidato come per il lavatore ed il lettore. Inoltre, la parte di gestione dei liquidi della stazione (dispensazione e lavaggio) deve essere convalidata e impostata correttamente. Particolare attenzione deve essere posta per evitare eventi di trascinamento negli aghi utilizzati per l'erogazione e per il lavaggio. Questo deve essere studiato e controllato per ridurre al minimo la possibilità di contaminazione dei pozzetti adiacenti. L'utilizzo di stazioni di lavoro automatiche ELISA è consigliato per lo screening del sangue quando il numero di campioni da analizzare supera le 20-30 unità per analisi.
7. Quando si utilizzano dispositivi automatici, nel caso in cui il supporto del flaconcino dello strumento non si adatti ai flaconcini forniti nel kit, trasferire la soluzione in contenitori appropriati ed etichettarli con la stessa etichetta staccata dal flaconcino originale. Questa operazione è importante per evitare che il contenuto delle fiale non corrisponda durante il trasferimento. Al termine del test, riportare i contenitori etichettati secondari a 2°-8°C, ben chiusi.

#### **I. CONTROLLI E OPERAZIONI PRELIMINARI**

1. Verificare la data di scadenza del kit stampata sull'etichetta esterna della confezione del kit. Non utilizzare i reagenti oltre la data di scadenza indicata.
2. Verificare che i componenti liquidi non siano contaminati da particelle o aggregati visibili ad occhio nudo. Verificare che il cromogeno / substrato sia incolore o blu pallido aspirandone un piccolo volume con una pipetta di plastica trasparente sterile. Verificare che non si siano verificate rotture durante il trasporto e che non siano presenti fuoriuscite di liquido all'interno della scatola. Verificare che la busta di alluminio, contenente la micropiastre, non sia forata o danneggiata.
3. Diluire tutto il contenuto della soluzione di lavaggio concentrata 20x come descritto sopra.
4. Sciogliere il coniugato liofilizzato n.1 fiala con 6 ml di coniugato n.1 diluente per ottenere il coniugato n.1 come sopra.
5. Sciogliere il Calibratore Ag come descritto sopra.
6. Lasciare che tutti gli altri componenti raggiungano la temperatura ambiente (circa 1 ora) e poi mescolare come descritto.

7. Impostare l'incubatore ELISA a +37°C e preparare il lavatore ELISA pretrattandolo con la soluzione di lavaggio diluita, secondo le istruzioni del produttore. Impostare il giusto numero di cicli di lavaggio come riportato nell'apposita sezione.
8. Verificare che il lettore ELISA sia stato acceso almeno 20 minuti prima della lettura.
9. Se si utilizza una stazione di lavoro automatizzata, accenderla, controllare le impostazioni e assicurarsi di utilizzare il protocollo di analisi corretto.
10. Verificare che le micropipette siano impostate sul volume richiesto.
11. Verificare che tutte le altre apparecchiature siano disponibili e pronte all'uso.
12. In caso di problemi, non procedere oltre con il test e avvisare il supervisore.

## J. PROCEDIMENTO

L'analisi deve essere eseguita secondo quanto riportato di seguito, è importante mantenere lo stesso tempo di incubazione per tutti i campioni in prova.

### Analisi automatizzata:

Seguire il manuale utente del sistema ELISA automatizzato per programmare il metodo di test Sclavo-EIA HIV 1/2 Ag/Ab. Nel caso in cui il test venga eseguito in modo automatizzato, si consiglia di far aspirare allo strumento prima 50 µl di diluente campione, poi 150 µl di controlli e campioni. Prima di aspirare il campione successivo, gli aghi devono essere debitamente lavati per evitare qualsiasi contaminazione incrociata tra i campioni. Si raccomanda vivamente di verificare che il tempo intercorso tra la dispensazione del primo e dell'ultimo campione venga calcolato dallo strumento e preso in considerazione ritardando di conseguenza la prima operazione di lavaggio.

### Analisi manuale:

1. Posizionare il numero richiesto di strip da 8 nella cornice dei micropozzetti. Identificare accuratamente i pozzetti da utilizzare per controlli, calibratore e campioni. Lasciare vuoto il pozzetto A1 per il bianco
2. Dispensare 50 µl di diluente per campioni in tutti i pozzetti ad eccezione del pozzetto A1 (bianco).
3. Dispensare 150 µl di controllo negativo in triplicato, 150 µl di controllo positivo HIV-1 Ab, 150 µl di controllo positivo HIV-2 Ab e 150 µl di calibratore Ag in duplicato, seguiti da 150 µl in singolo per ogni campione nei pozzetti appropriati. Mescolare delicatamente la piastra sulla superficie del banco per consentire la miscelazione dei campioni e del diluente. Fare attenzione a evitare la fuoriuscita della miscela di reazione da un pozzetto all'altro.
4. Incubare la micropiastra, sigillata con la pellicola adesiva in dotazione, per 60 minuti a 37°C.
5. Lavare la micropiastra con un dispositivo di lavaggio automatico erogando e aspirando 350 µl / pozzetto di soluzione di lavaggio diluita come riportato in precedenza (sezione H.3).
6. Pipettare 150 µl di coniugato n.1 in ogni pozzetto, ad eccezione del pozzetto A1 (bianco), e coprire con la pellicola adesiva.

**Nota importante:** Fare attenzione a non toccare la superficie interna in plastica del pozzetto con la punta riempita con il coniugato enzimatico. Potrebbe verificarsi contaminazione.

7. Incubare la micropiastra, sigillata con la pellicola adesiva in dotazione, per 30 minuti a 37°C.
8. Pipetta 100 µl di coniugato n.2 in ogni pozzetto, tranne nel pozzetto A1 (bianco).

**Nota importante:** assicurarsi che il coniugato n.2 venga dispensato sul fondo del pozzetto. Mescolare accuratamente la soluzione di reazione per garantire che il coniugato n.1 ed il coniugato n.2 si siano ben omogeneizzati. Una miscelazione inadeguata può ridurre il legame della streptavidina-HRP (coniugato n.2) ai reagenti biotinilati e di conseguenza influenzare le prestazioni dell'analisi. Assicurarsi di fornire una miscelazione adeguata quando il coniugato n.2 viene aggiunto, sia nelle procedure manuali che in quelle automatizzate.

9. Incubare la micropiastra, sigillata con la pellicola adesiva in dotazione, per 30 minuti a 37°C.
10. Lavare la micropiastra come al punto 5.
11. Pipettare 200 µl di miscela di cromogeno/substrato in ogni pozzetto, compreso il pozzetto del bianco A1. Quindi incubare la micropiastra a temperatura ambiente (18-24°C) per 30 minuti. Iniziare il conto alla rovescia dal momento in cui il reagente viene dispensato nel primo pozzetto di reazione.

**Nota importante:** Non esporre a una forte illuminazione diretta: potrebbe generarsi un risultato falso.

12. Pipettare 100 µl di acido solforico in tutti i pozzetti utilizzando la stessa sequenza di pipettaggio del passaggio 6 per arrestare la reazione enzimatica. L'aggiunta di acido trasformerà il controllo positivo e i campioni positivi da blu a giallo/marrone

13. Misurare l'intensità del colore della soluzione in ciascun pozzetto, come descritto nella sezione H.5, utilizzando un filtro da 450 nm (lettura) e da 620-630 nm (sottrazione dello sfondo), oscurando lo strumento su A1 (obbligatorio).

**Note importanti:**

1. Assicurarsi che non siano presenti impronte sul fondo del micropozzetto prima della lettura. Le impronte digitali potrebbero generare risultati falsi positivi alla lettura
2. La lettura deve essere eseguita subito dopo l'aggiunta della soluzione bloccante e comunque non oltre 30 minuti dalla sua aggiunta. Può verificarsi una certa autossidazione del cromogeno che porta a un elevato background
3. Il calibratore (CAL) non influisce sul calcolo del cut-off e quindi sul calcolo dei risultati del test. Il calibratore può essere utilizzato solo quando è richiesto un controllo di qualità interno al Laboratorio CQ.

**K. SCHEMA DEL TEST**

Operazioni	Procedura
Diluente per campioni Controlli, calibratore, campioni	50 µl in tutti i pozzetti tranne A1 150 µl
<b>1° incubazione</b>	<b>60 min</b>
Temperatura	+37°C
Fase di lavaggio	n°5 cicli con 20" di attesa OPPURE n°6 cicli senza attesa
Coniugato n.1	150 µl in tutti i pozzetti tranne A1
<b>2nd incubation</b>	<b>30 min</b>
Temperature	+37°C
Conjugate n.2	100 µl in tutti i pozzetti tranne A1
<b>3° incubazione</b>	<b>30 min</b>
Temperatura	+37°C
Fase di lavaggio	n°5 cicli con 20" di attesa OPPURE n°6 cicli senza attesa
TMB/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	200 µl
<b>4° incubazione</b>	<b>30 min</b>
Temperatura	Ambiente (18-24°C)
Acido solforico	100 µl
Lettura OD	450nm / 620-630nm

Di seguito è riportato un esempio di schema di dispensazione:

**Micropiastra**

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>A</b>	BLK	CAL Ag	
<b>B</b>	NC	CAL Ag	
<b>C</b>	NC	S1	
<b>D</b>	NC	S2	
<b>E</b>	POS 1 Ab	S3	
<b>F</b>	POS 1 Ab	S4	
<b>G</b>	POS 2 Ab	S5	
<b>H</b>	POS 2 Ab	S6	

**Legenda:**

BLK = Bianco

NC = Controllo negativo

POS 1 = controllo positivo HIV-1

POS 2 = controllo positivo HIV-2

CAL Ag = Calibratore Ag

## L. CONTROLLO DI QUALITÀ INTERNO

Ogni volta che si utilizza il kit viene effettuato un controllo sui controlli e sul calibratore per verificare se i loro valori di OD450nm sono quelli attesi e riportati nella tabella sottostante.

Parametri	Requisiti
Pozzetto bianco	Valore < 0.100 OD450nm
Controllo negativo (NC)	< 0.200 valore medio OD450nm dopo la sottrazione del bianco. Il valore di ogni singola lettura per NC deve essere inferiore a 0,200. Se una delle letture è superiore a questo valore, scartarla e ricalcolare la media. Se due o tutte le letture sono superiori a 0,200, ripetere il test.
Controllo positivo HIV-1 Ab	S/CO > 3,5
Controllo positivo HIV-2 Ab	S/CO > 7,5
Calibratore Ag HIV-1	S/CO > 1,5

Se i risultati del test corrispondono ai requisiti sopra indicati, passare alla sezione successiva.

In caso contrario, non procedere oltre e operare come segue:

Problema	Controllo
<b>Pozzetto bianco</b> > 0.100 OD450nm	1. che la soluzione di cromogeno / substrato non sia stata contaminata durante il test.
<b>Controllo negativo (NC)</b> > 0,200 OD450nm	1. che la procedura di lavaggio e le impostazioni del lavatore siano convalidate nello studio di prequalifica; 2. che sia stata utilizzata la soluzione di lavaggio adeguata e che il lavatore sia stato pretrattato con essa prima dell'uso; 3. che non è stato commesso alcun errore nella procedura del test (dispensazione del controllo positivo invece di quello negativo); 4. che non si sia verificata alcuna contaminazione del controllo negativo o dei pozzetti in cui è stato dispensato il controllo a causa di versamenti di campioni positivi o del coniugato enzimatico; 5. che le micropipette non siano state contaminate con campioni positivi o con il coniugato enzimatico; 6. che gli aghi del lavatore non siano bloccati o parzialmente ostruiti.
<b>Controlli positivi</b> <b>HIV-1Ab</b> S/CO<3,5 <b>HIV-2 Ab</b> S/CO<7,5	1. che la procedura sia stata eseguita correttamente; 2. che non si sia verificato alcun errore durante la loro distribuzione (es.: dispensazione del controllo negativo invece del controllo positivo); 3. che la procedura di lavaggio e le impostazioni del lavatore siano convalidate nello studio di prequalificazione; 4. che non si sia verificata alcuna contaminazione esterna dei controlli positivi.
<b>Calibratore Ag HIV-1</b> <1,5 OD450nm	1. che la procedura sia stata eseguita correttamente; 2. che non si sia verificato alcun errore durante la distribuzione del controllo (dispensazione del controllo negativo al posto del calibratore. Anche in questo caso il controllo negativo avrà un valore OD450nm> 0.200); 3. che la procedura di lavaggio e le impostazioni del lavatore siano convalidate nello studio di prequalificazione; 4. che non si sia verificata alcuna contaminazione esterna con il controllo positivo; 5. che il calibratore liofilizzato sia stato risospeso con la giusta quantità di acqua distillata di grado EIA indicata nell'etichetta.

Qualora si verificassero questi problemi, dopo aver verificato, segnalarli al supervisore per ulteriori azioni.

## M. CALCOLO DEL CUT-OFF

I risultati dei test sono calcolati mediante un valore di cut-off determinato con la seguente formula sul valore medio OD450nm / 620 - 630nm del Controllo Negativo (NC):

$$NC + 0.150 = \text{Cut-Off (CO)}$$

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

**Nota importante:** Quando il calcolo dei risultati viene eseguito dal sistema operativo di una stazione di lavoro automatizzata ELISA, assicurarsi che venga utilizzata la formulazione corretta per calcolare il valore di cut-off e generare le corrette interpretazioni dei risultati.

## N. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

I risultati del test vengono interpretati come rapporto tra l'OD450nm del campione e il valore di cut-off (o S/CO) secondo la tabella seguente:

S/CO	Interpretazione
< 1,0	Negativo
> 1,0	Positivo

Un risultato negativo indica che il paziente non è stato infettato dall'HIV. Se il valore di assorbanza iniziale è uguale o maggiore del valore di cut-off, ripetere l'analisi del campione in duplicato. Se entrambi i valori di ripetizione del test sono inferiori al cut-off, l'interpretazione non è reattiva per l'anticorpo e/o l'antigene dell'HIV (negativo). Se uno o entrambi i valori di ripetizione del test sono uguali o maggiori del cut-off, l'interpretazione dei risultati del test è ripetutamente reattiva. Il campione deve essere considerato reattivo o positivo per l'anticorpo e/o l'antigene dell'HIV secondo i criteri di questo test di screening ELISA per l'HIV.

Un risultato positivo è indicativo di infezione da HIV e quindi il paziente deve essere trattato di conseguenza.

### Note importanti:

1. L'interpretazione dei risultati deve essere eseguita sotto la supervisione del responsabile del laboratorio per ridurre il rischio di errori di giudizio e interpretazioni errate.
2. L'eventuale risultato positivo deve essere confermato prima ripetendo la prova sul campione, dopo averlo filtrato su filtro da 0,2 - 0,8 micron per eliminare ogni interferenza da microparticelle. Quindi, se ancora positivo, il campione deve essere sottoposto a un test di conferma prima che venga rilasciata una diagnosi di HIV.
3. Quando i risultati dei test vengono trasmessi dal laboratorio a un altro reparto, è necessario prestare attenzione per evitare trasferimenti di dati errati.
4. La diagnosi di infezione da HIV deve essere valutata e confermata al paziente da un medico adeguatamente qualificato. Di seguito è riportato un esempio di calcolo:

I dati della seguente tabella devono essere considerati solo come un esempio:

<b>CONTROLLO NEGATIVO</b>	OD 450 nm 0,110 – 0,120 – 0,115
Valore medio OD 450 nm: 0,115	Inferiore a 0,200
ACCETTATO	
CUT-OFF	$0,150 + 0,115 = 0,265$
CONTROLLO POSITIVO HIV1 Ab	OD 450 nm: 2,100 S/CO = 7,90
S/CO maggiore di 3,5	
ACCETTATO	
CONTROLLO POSITIVO HIV2 Ab	OD 450 nm: 2,250 S/CO = 8,50
S/CO maggiore di 7,5	
ACCETTATO	
<b>CALIBRATORE HIV-1 Cal Ag</b>	OD 450 nm: 0,585

	S/CO = 2,20
S/CO maggiore di 1,5	
ACCETTATO	
Campione 1 OD 450 nm: 0,046	S/CO < 1,0
NEGATIVO	
Campione 2 OD 450 nm: 1,22	S/CO > 1,0
POSITIVO	

## O. PRESTAZIONI

La Valutazione delle Prestazioni è stata condotta in conformità a quanto riportato nelle Specifiche Tecniche Comuni o CTS (art. 5, Capitolo 3 della Direttiva IVD 98/79 / CE).

### O.1. Sensibilità analitica

Il limite di rilevabilità (o sensibilità analitica) del test è stato calcolato mediante preparazioni specifiche per anticorpi HIV-1 e HIV-2 e rilevazione HIV-1 p24 Ag, fornite da NIBSC, Blanche Lane South Mimms Potters Bar Hertfordshire EN6 3QG, UK. I campioni sono stati diluiti in plasma HIV Ab e Ag negativo per generare curve di diluizione limitanti ed esaminati in duplicato. La tabella seguente riporta i valori medi di OD450nm e l'indice S/CO ottenuti utilizzando tre diversi lotti di Sclavo-EIA HIV 1/2 Ag/Ab.

**NIBSC anti-HIV 2 codice campione 99/674 – 019**

Fattore di diluizione	Lotto 1		Lotto 2		Lotto 3	
	OD	S/CO	OD	S/CO	OD	S/CO
1:1	3,982	<b>22,37</b>	3,982	<b>22,25</b>	3,737	<b>20,99</b>
1:2	3,982	<b>22,37</b>	3,982	<b>22,25</b>	3,582	<b>20,12</b>
1:4	3,947	<b>22,17</b>	3,961	<b>22,13</b>	3,478	<b>19,54</b>
1:8	3,871	<b>21,74</b>	3,849	<b>21,50</b>	3,275	<b>18,40</b>
1:16	2,969	<b>16,68</b>	2,962	<b>16,55</b>	2,997	<b>16,83</b>
1:32	1,670	<b>9,38</b>	1,660	<b>9,27</b>	1,684	<b>9,46</b>
1:64	0,953	<b>5,35</b>	0,949	<b>5,30</b>	0,959	<b>5,38</b>
1:128	0,527	<b>2,96</b>	0,524	<b>2,92</b>	0,525	<b>2,95</b>
1:256	0,313	<b>1,76</b>	0,313	<b>1,75</b>	0,315	<b>1,77</b>
1:512	0,187	<b>1,05</b>	0,187	<b>1,04</b>	0,190	<b>1,06</b>
1:1024	0,133	0,75	0,133	0,74	0,135	0,76
NC	0,058	0,32	0,058	0,32	0,060	0,33

Controllo negativo (NC) media OD: 0,058

Deviazione Standard (SD): 0,025

**Limite di rilevamento:**

OD medio + (5 x SD) = 0,058 + (5 x 0,025) = 0,183

Il limite di diluizione dell'analisi è 1: 512.

**NIBSC British working standard per anti-HIV 1 code 99/750 –024**

Diluizione del campione	Lotto 1		Lotto 2		Lotto 3	
	OD	S/CO	OD	S/CO	OD	S/CO
1:1	3,882	<b>21,81</b>	3,894	<b>21,75</b>	3,680	<b>20,67</b>
1:2	2,742	<b>15,4</b>	2,722	<b>15,20</b>	2,766	<b>15,54</b>
1:4	1,679	<b>9,43</b>	1,676	<b>9,36</b>	1,688	<b>9,48</b>
1:8	1,018	<b>5,72</b>	1,010	<b>5,64</b>	1,018	<b>5,72</b>
1:16	0,486	<b>2,73</b>	0,485	<b>2,71</b>	0,492	<b>2,76</b>

1:32	0,289	<b>1,62</b>	0,290	<b>1,62</b>	0,293	<b>1,64</b>
1:64	0,177	0,99	0,178	0,99	0,178	1,00
1:128	0,120	0,67	0,120	0,67	0,122	0,69
1:256	0,088	0,49	0,088	0,49	0,088	0,49
1:512	0,073	0,41	0,073	0,41	0,073	0,41
1:1024	0,065	0,36	0,065	0,36	0,065	0,36
NC	0,051	0,29	0,052	0,29	0,054	0,30

Controllo negativo (NC) media OD: 0,052

Deviazione Standard (SD): 0,028

**Limite di rilevamento:**

OD medio + (5 x SD) = 0,052 + (5 x 0,028) = 0,192

Il limite di diluizione dell'analisi è 1: 32.

**Reagente di riferimento primario per HIV 1 Ag NIBSC codice 90/636 – (Version 4, 12 May 2009)**

Fattore di diluizione	Lotto 1		Lotto 2		Lotto 3	
	OD	S/CO	OD	S/CO	OD	S/CO
16	2,374	<b>15,36</b>	2,720	<b>15,19</b>	2,759	<b>15,50</b>
8	1,451	<b>8,15</b>	1,442	<b>8,05</b>	1,466	<b>8,23</b>
4	0,776	<b>4,36</b>	0,777	<b>4,34</b>	0,783	<b>4,40</b>
2	0,446	<b>2,51</b>	0,447	<b>2,50</b>	0,452	<b>2,54</b>
1	0,261	<b>1,47</b>	0,261	<b>1,46</b>	0,263	<b>1,48</b>
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
NC	0,052	0,29	0,052	0,29	0,054	0,30

Il test ha una sensibilità  $\leq 2$  UI / ml come richiesto dalle specifiche tecniche comuni (CTS) per i dispositivi medico-diagnostici in vitro 2009.

**O.2. Specificità e sensibilità**

**Specificità**

È definita come la probabilità che il test dia un risultato negativo quando il particolare analita è assente.

Sono stati analizzati 5336 campioni negativi, ottenendo una specificità del 100%.

Non sono stati ottenuti falsi positivi o reazioni crociate con i più comuni potenziali interferenti inclusi anticorpi correlati al virus dell'epatite, HTLV I/II, anticorpi anti-E. coli e campioni da donne in gravidanza.

**Sensibilità**

È definita come la probabilità del test di dare un risultato positivo quando è presente il particolare analita.

La sensibilità diagnostica di Sclavo-EIA HIV 1/2 Ag/Ab è stata valutata analizzando un totale di 118 campioni positivi inclusi i sottotipi HIV-2, HIV-1 gruppo O e M, Antigene HIV-1 p24 e supernatanti di colture cellulari ottenendo una sensibilità diagnostica del 100%.

È stata testata una serie di pannelli prestazionali disponibili in commercio. I risultati sono riportati nelle tabelle seguenti.

**Etablissement Francais du Sang**

**Pannello Ac anti-HIV Ab (1-6) Lotto # 49n**

ID del campione	Composizione	Lotto n. 2
		Index (S/CO)
.1	HIV-1 (1:700)	<b>22,04</b>
2	HIV-1 (1:160)	<b>25,05</b>
3	HIV-1 (1:200)	<b>17,91</b>
4	HIV-2 (1:500)	<b>15,05</b>
5	Hiv-2 (1:500)	<b>25,05</b>
6	Negativo	0,33

**Etablissement Francais du Sang**

**Pannello Ac anti-HIV Ab (1-6) Lotto # 56**

ID del campione	Lotto n. 3	Lotto n. 4
	Index (S/CO)	Index (S/CO)
1	<b>17,56</b>	<b>17,85</b>
2	<b>22,43</b>	<b>23,63</b>
3	<b>10,97</b>	<b>12,76</b>
4	<b>22,43</b>	<b>23,63</b>
5	<b>22,43</b>	<b>23,63</b>
6	0,29	0,24

**WHO International Standard HIV (anticorpi)****1° pannello di riferimento internazionale****(NIBSC codice 02/210) (Versione 5.0, data 11/12/2012)**

ID del campione	Lotto n. PS
	Index (S/CO)
1	<b>21,65</b>
2	<b>21,65</b>
3	<b>21,65</b>
4	<b>21,65</b>
5	<b>17,81</b>
6	<b>21,65</b>
7	0,33

**Pannello di qualificazione HIV 1/2/O/p24 (codice 0158)**

ID del campione	Lotto n. PS
	Index (S/CO)
1	<b>19,98</b>
2	0,35
3	<b>21,65</b>
4	<b>20,42</b>
5	<b>3,96</b>
6	<b>21,65</b>

Infine, 6 pannelli di sieroconversione contenenti campioni positivi per anticorpi HIV1 / 2/0 e/o antigene HIV-1 p24, ottenuti da BBI USA e Zeptometrix, sono stati valutati utilizzando i lotti 2 e 4 di Sclavo-EIA HIV 1/2 Ag/Ab.

I risultati ottenuti sono riportati nella tabella sottostante:

Pannello di sieroconversione	Lotto n. 2	Lotto n. 4
ID del campione		
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
HIV 9089 – 65376	4	na

**O.3 Precisione**

La precisione dell'analisi è stata valutata determinando i suoi valori in un intervallo e tra le sessioni. Nella tabella seguente sono riportati i risultati per un campione negativo e per un campione leggermente positivo.

Campioni N = 72	Valori medi	
	Negativo	Leggermente positivo
Index (S/CO)	0,29	9,18
Deviazione standard	0,02	0,28
CV%	7,12	3,08

#### O.4 Accuratezza

L'accuratezza è stata stimata analizzando due campioni ad alto titolo sottoposti a diluizioni raddoppiate. Ciascun campione diluito è stato testato in triplicato con due diversi lotti del kit EIA Sclavo 1/2 Ag/Ab.

I risultati ottenuti sono riportati nella tabella sottostante:

Lotto	IU/mL	Index atteso	Indice misurato	Accuratezza%
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	>100
	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

#### O.5 Effetto "Prozona"

L'effetto "Prozona", definito come risultato falso negativo o falso basso in reazioni immunologiche, a causa di un eccesso di antigeni o anticorpi, è stato escluso con un campione altamente reattivo per gli anticorpi dell'HIV e l'antigene dell'HIV.

Il campione non diluito ha mostrato un valore OD450nm / 620-630nm molto alto e dopo diverse diluizioni in siero negativo, sia per l'anticorpo HIV che per l'antigene HIV, non è stato osservato alcun effetto di saturazione.

#### P. LIMITAZIONI

Si consiglia all'utente di questo kit di leggere attentamente e comprendere questo foglietto illustrativo. È necessaria una stretta aderenza al protocollo per ottenere risultati di test affidabili. In particolare, il pipettaggio accurato di campioni e reagenti, insieme a un lavaggio accurato e alla tempistica delle fasi di incubazione è essenziale per il rilevamento accurato e riproducibile degli anticorpi HIV-1 e HIV-2 e dell'antigene p24 dell'HIV-1.

Dopo aver eseguito il test EIA, i campioni ripetutamente reattivi devono essere sottoposti a ulteriori test utilizzando Western Blot (WB), Immunofluorescence Assay (IFA), Radioimmunoprecipitation Assay (RIPA) e PCR per l'acido nucleico dell'HIV.

La determinazione che il siero di una persona contiene anticorpi o antigene p24 contro l'HIV ha ampie implicazioni mediche, sociali, psicologiche ed economiche.

Si raccomanda che la riservatezza, la consulenza appropriata e la valutazione medica siano considerati un aspetto essenziale della sequenza del test. L'AIDS e le condizioni correlate all'AIDS sono malattie cliniche e la loro diagnosi può essere stabilita solo clinicamente.

Il solo test EIA non può essere utilizzato per diagnosticare l'AIDS.

Un risultato del test non reattivo in qualsiasi punto della sequenza del test non preclude la possibilità di esposizione o infezione da HIV. Il rischio che una persona asintomatica, che è ripetutamente reattiva, sviluppi l'AIDS e/o condizioni correlate all'AIDS non è noto.

Risultati di test falsamente reattivi possono essere osservati con un kit di test di questa natura. La proporzione di campioni reattivi dipenderà dalla sensibilità e specificità del kit del test e dalla prevalenza di anticorpi HIV-1 e HIV-2 nella popolazione da sottoporre a screening.

Possono verificarsi anticorpi contro l'HIV a causa della partecipazione volontaria a uno studio sul vaccino contro l'HIV.

L'interpretazione di questo test diagnostico dipenderà dal tipo di vaccino somministrato. La correlazione con la storia medica e ulteriori test possono essere necessari per diagnosticare accuratamente l'HIV nei volontari vaccinati.

## **Q. BIBLIOGRAFIA**

1. **Alizon, M., Sonigo, P., Barré-Sinoussi, F., Chermann, J.-C., Tiollais, P., Montagnier, L. and Wain-Hobson, S., 1984.** Molecular Cloning of Lymphadenopathy-Associated Virus. *Nature* 312: 757-760.
2. **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.
3. **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.
4. **4.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.
5. **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.
6. **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.
7. **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.
8. **Barre-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-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.
9. **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
10. **Retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. Science 224:500-503.**
11. **Gold, J., Dwyer, J. 1994.** A short history of AIDS. *Med. J. Aust.* 160:251-252.
12. **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.
13. **Bernard Weber, El Hadij Mbangane 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.
14. **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.
15. **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.
16. **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.*
17. **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 p24Vopr *Virusol. 1992 Sep- Dec;37(5-6):229-32. Russian.*
18. **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.*
19. **Borghi V, De Rienzo B, Pietrosevoli P, Pecorari M, Mongiardo N, Pellegrino F, Zanchetta GP, Lami G, Squadri F.** Rilevazione di HIV-Ag sierico correlato alla principale proteina core (p24) in persone a rischio di AIDS. *Microbiologica. 1989 Jan;12(1):81-3.*
20. **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.*
21. **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.
22. **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.
  23. **Sinicco, A., Fora, R., Sciandra, M., Lucchini, A., Caramello, P. and Gioannini, P. 1993.** Risk of developing AIDS after primary acute HIV-1 infection. *J. of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 6:575-581.
  24. **Parikh UM, McCormick K, van Zyl G, Mellors JW.** Future technologies for monitoring HIV drug resistance and cure. *Curr Opin HIV AIDS.* **2017** Mar;12(2):182-189. doi: 10.1097/COH.0000000000000344. PMID: 28059958; PMCID: PMC6738332.
  25. **Fanales-Belasio E, Raimondo M, Suligo B, Buttò S.** HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. *Ann Ist Super Sanita.* 2010;46(1):5-14. doi: 10.4415/ANN\_10\_01\_02. PMID: 20348614.
  26. **Masako Nomaguchi, Naoya Doi, Takaaki Koma, Akio Adachi.** HIV-1 mutates to adapt in fluxing environments. *Microbes Infect.* Volume 20, Issues 9–10, October–November 2018, Pages 610-614.
  27. **Chin BS.** Molecular Epidemiology of Human Immunodeficiency Virus. *Infect Chemother.* 2017 Mar;49(1):1-9.
  28. **Hassan M. Naif.** Pathogenesis of HIV Infection. *Infect Dis Rep.* 2013 Jun 6; 5(Suppl 1): e6. doi: 10.4081/idr.2013.s1.e6.
  29. **Md Alamgir Kabir, Hussein Zilouchian, Massimo Caputi, Waseem Asghar.** Advances in HIV diagnosis and monitoring. *Crit Rev Biotechnol.* 2020 Aug;40(5):623-638. doi: 10.1080/07388551.2020.1751058.
  30. **Michael S. Saag.** HIV Infection — Screening, Diagnosis, and Treatment. *N Engl J Med* 2021; 384:2131-2143. DOI: 10.1056/NEJMcp1915826.
  31. **Dagleish AG.** HIV types and testing. *Curr Opin Immunol.* **1991** Aug;3(4):543-6. doi: 10.1016/0952-7915(91)90018-v. PMID: 1755980.

### Simboli utilizzati

 = Dispositivo medico diagnostico in vitro

 = Numero di catalogo

 = Numero del lotto

 = Fabbricante

 = Data di scadenza

 = Temperatura di conservazione

 = Istruzioni d'uso