



CE
0344

Anti-HCV Elisa

4.0

KAPG4NAE3/KAPG4NAE12

History

Resume of change :

| Previous Version : | Current Version : | | | | |
|---|---------------------------------|-----|--|-----|-----|
| 170224/1 | 191023/1 | | | | |
| / | Addition of Manufacturer symbol | | | | |
| / | Addition of IVD symbol | | | | |
| / | Addition of CLP hazard symbols | | | | |
| / | Addition of Residual Risks | | | | |
| P.I. Number : 1701153 | P.I. Number cleared | | | | |
| No history | History added | | | | |
| Substrate buffer <table border="1"><tr><td>SUB</td><td>BUF</td></tr></table> Citrate Acid Buffer containing 0.03% H ₂ O ₂ . | SUB | BUF | Substrate buffer <table border="1"><tr><td>SUB</td><td>BUF</td></tr></table> Acetic Acid Buffer with Urea Hydrogen Peroxydase. | SUB | BUF |
| SUB | BUF | | | | |
| SUB | BUF | | | | |

CE
0344


Anti-HCV Elisa V 4.0.

For in-vitro qualitative detection of Antibody to Hepatitis C virus (anti-HCV) in human serum or plasma

en

KAPG4NAE3 : 96 tests / KAPG4NAE12 : 480 tests

IN VITRO DIAGNOSTIC USE **IVD**

 DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 90

1) INTENDED USE

Anti-HCV Elisa V 4.0 is a fourth generation enzyme immunoassay diagnostic kit for in-vitro qualitative detection of Antibody to Hepatitis C virus (anti-HCV) in human serum or plasma.

2) DESIGN THEORY/ BRIEF DESCRIPTION OF THE PRODUCT

Anti-HCV Elisa V 4.0 adopts the "direct sandwich principle" as the basis for the assay to detect antibodies to Hepatitis C virus (anti-HCV). It is a fourth generation enzyme immunoassay kit, which uses recombinant HCV antigens (Core, NS3 and NS5 antigens) for the detection of Antibody to Hepatitis C virus (anti-HCV) in human serum or plasma.¹⁻³ These antigens, which are reactive with the predominant antibodies of HCV, constitute the solid phase antigenic absorbent. When human serum or plasma is added to the well, the HCV antigens and Anti-HCV will form complexes on the wells if Anti-HCV is present in the specimen. The wells are washed to remove the unbound materials. The diluted HCV Ag•HRPO Conjugate is added to the well and results in the formation of (HCV) • (Anti-HCV) • (HCV Ag•HRPO) complex. After washing out the unbound conjugate, TMB substrate solution is added for color development. The intensity of color development is proportional to the amount of antibodies present in the specimen. The reaction processes are summarized as follows:

A. Specimen (containing Anti-HCV):


1. Plate (HCV Antigens) + Specimen (containing Anti-HCV) → plate (HCV Antigen)•Anti-HCV
2. Wash to remove the unbound materials.
3. Plate (HCV Antigen) •Anti-HCV + HCV Ag•HRPO → Plate (HCV Antigen)•Anti-HCV•HCV Ag•HRPO complex
4. Wash to remove the unbound materials.
5. Plate (HCV Antigen) •Anti-HCV•HCV Ag•HRPO complex + TMB Solution → light blue to blue color
6. Light blue to blue color + Stop Solution → light yellow to yellow color, measured at 450nm with a selected reference wavelength within 620 to 690nm⁴

B. Specimen (without human Anti-HCV):

1. Plate (HCV Antigens) + Specimen (without Anti-HCV) → plate (HCV Antigen)
2. Wash to remove the unbound materials.
3. Plate (HCV Antigen) + HCV Ag•HRPO → plate (HCV Antigen)----- No complex will form
4. Wash to remove the unbound materials.
5. Plate (HCV Antigen) + TMB Solution (colorless) → colorless
6. Colorless + Stop Solution → colorless, measured at 450nm with a selected reference wavelength within 620 to 690nm⁴

3) DESCRIPTION OF PROVIDED MATERIALS & PRODUCT CODE SYSTEM

- Item 1 - 7 on the following reagent table should be refrigerated at +2 to +8°C.
Washing Solution D (20X) and Stop Solution can be stored at +2 to +30°C.

| ITEMS | Components | Description | Qt. per 96 tests | Qt. per 480 tests | | | |
|---------|--|--|------------------|---|--|------------------|----------------|
| (1) |  HCV Antigens Plate | Microtiter plate coated with HCV antigens. | 1 plate | 5 plates | | | |
| (2) | <table border="1" data-bbox="256 1675 453 1720"> <tr> <td>Ag</td> <td>HRP</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Conc. HCV Ag•HRPO Conjugate | Ag | HRP | CONC | Contained HCV Ag•Peroxidase (Horseradish) in buffer with Bovine serum. Preservatives: 0.005 % Sodium azide and 0.05 % Enzyme stabilizer. | 1 bottle, 1.8 ml | 1 bottle, 5 ml |
| Ag | HRP | CONC | | | | | |
| (3) | <table border="1" data-bbox="256 1839 400 1872"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>H</td> </tr> </table> Anti-HCV Positive Control | CONTROL | H | Inactivated human plasma positive for Anti-HCV. Preservative: 0.099 % Sodium azide. | 1 bottle, 2 ml | 1 bottle, 5 ml | |
| CONTROL | H | | | | | | |
| (4) | <table border="1" data-bbox="256 1966 400 2000"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>L</td> </tr> </table> Hepatitis C Negative Control | CONTROL | L | Normal human plasma non-reactive for Antibody to HCV. Preservative: 0.099 % Sodium azide. | 1 bottle, 3 ml | 1 bottle, 5 ml | |
| CONTROL | L | | | | | | |




| | | | | | | | |
|-------|--|-------|------|--|---|------------------|------------------|
| (5) | <table border="1"><tr><td>CONJ</td><td>BUF</td></tr></table> Conjugate Diluent | CONJ | BUF | PB-buffer with Bovine serum and Tween-20. Preservatives: 0.005 % Sodium azide and 0.05 % Enzyme stabilizer | 1 bottle, 24 ml | 1 bottle, 100 ml | |
| CONJ | BUF | | | | | | |
| (6) | <table border="1"><tr><td>CHROM</td><td>TMB</td><td>CONC</td></tr></table> Chromogenic TMB concentrate | CHROM | TMB | CONC | 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine (TMB) in an organic base. | 1 bottle, 12 ml | 1 bottle, 35 ml |
| CHROM | TMB | CONC | | | | | |
| (7) | <table border="1"><tr><td>SUB</td><td>BUF</td></tr></table> Substrate Buffer | SUB | BUF | Acetate acid buffer with Urea Hydrogen Peroxidase | 1 bottle, 12 ml | 1 bottle, 35 ml | |
| SUB | BUF | | | | | | |
| (8) | <table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Conc. Washing Solution D (20X) | WASH | SOLN | CONC | Phosphate buffer with Tween-20. | 1 bottle, 110 ml | 1 bottle, 400 ml |
| WASH | SOLN | CONC | | | | | |
| (9) | <table border="1"><tr><td>STOP</td><td>SOLN</td></tr></table> Stop Solution | STOP | SOLN | 1N Stop Solution | 1 bottle, 12 ml | 1 bottle, 50 ml | |
| STOP | SOLN | | | | | | |

• **OTHER MATERIALS REQUIRED, BUT NOT PROVIDED**

| ITEMS | Components |
|-------|--|
| (1) | 50µl, 100µl and 200µl, 1-ml micropipettes and tips are needed. |
| (2) | Water-bath at 37 +/- 1° or incubator at 37 +/- 1°. |
| (3) | Tubes for specimen dilution. |
| (4) | Plate washing equipment. |
| (5) | ELISA Microwell Reader: Dual wavelength 450nm with 620-690nm as reference wavelength ⁴ , bandwidth 10nm. |
| (6) | Purified water: distilled or deionized water. |
| (7) | Fully automatic EIA micro-plate analyzer is optional. User should validate the automatic EIA micro-plate analyzer in combination with the kit. |
| (8) | Adhesive slip |

4) INSTRUCTIONS FOR USE

4.1) Warnings

- 4.1.1) This reagent kit is for professional use only.
- 4.1.2) **IVD** This reagent kit is for *in vitro* diagnosis only.
- 4.1.3) Bring all kit reagents and samples to room temperature (+20 to +30°C) and mix carefully before use.
- 4.1.4) Do not use reagent past its expiration date.
- 4.1.5) Do not interchange reagents between different lots.
- 4.1.6) Do not put pipette in mouth.
- 4.1.7) Do not smoke or eat in areas where specimens or reagents are handled.
- 4.1.8) All kit components and specimens should be regarded as potential hazards to health. It should be used and discarded according to your own laboratory's safety procedures. Such safety procedures probably will include the wearing of protective gloves and avoiding the generation of aerosols.
- 4.1.9) Potential infectious specimens and non-acid containing spills or leakages should be wiped up thoroughly with 5% sodium hypochlorite or treated in accordance with your practice for potential bio-hazard control.
- 4.1.10) Prior to dispose the waste of used specimens and kit reagents as general waste; it should be treated in accordance with your treatment practice of potential bio-hazardous waste or treated as follows:
Both liquid and solid waste should be autoclaved at 121°C for at least 30 minutes.
Solid waste can also be incinerated.
Non-acidic liquid waste can be treated with sodium hypochlorite diluted to a final concentration of 1%.
Acidic liquid wastes must be neutralized before treatment with sodium hypochlorite as mentioned above and should stand for 30 minutes to obtain effective disinfection.
- 4.1.11)  Stop Solution is an irritant to skin, eyes, respiratory tract and mucous membranes. Avoid contact of the Stop Solution with skin and mucous membranes. In case of contact, flush immediately with abundant amounts of water. In case of inhalation, find fresh air immediately and seek medical advice in case of pain.
- 4.1.12)  Chromogenic TMB concentrate contains organic solvent, which is flammable. Chromogenic TMB concentrate contains dimethyl sulfoxide, an irritant to skin and mucous membranes.
- 4.1.13)  Although all human sourced material are tested free from HBsAg and Anti-HIV and inactivated at 56°C for one hour, the reagent should still be handled as potential infectious material. ^{*5}

4.2) Residual Risks

- 4.2.1) Incorrect operation could lead to wrong results.
- 4.2.2) Using the kit after expiration date might lead to wrong results.
- 4.2.3) Inefficient Washer and ELISA Reader could affect the final result.
- 4.2.4) Storage at higher temperature could affect the shelf life of the product.
- 4.2.5) The product is for single use only. Reuse could lead to wrong results.
- 4.2.6) Any change to the test procedure may lead to incorrect results which could cause diagnostic error.

4.3) Specimen Collection and Storage

- 4.3.1) Either serum or plasma can be used with this diagnostic kit. Whole blood specimens should be separated as soon as possible in order to avoid hemolysis. Any particulates (e.g. fibrin clots, erythrocytes) contained in the specimen should be removed prior to use.
- 4.3.2) Specimens must be stored at +2 to +8°C and avoided heat-inactivation to minimize deterioration. For long-term storage, they should be frozen below -20°C. Storage in self-defrosting freezer is not recommended.
- 4.3.3) Frozen specimens must be thoroughly thawed and mixed homogeneously before test.
- 4.3.4) Avoid multiple freeze-thaw procedures.
- 4.3.5) Incompletely coagulated sera and microbial-contaminated specimens should not be used.

4.4) Reagents Storage

- 4.4.1) The kit must be stored at +2 to +8°C. Do not freeze.
- 4.4.2) Strips of the plate should be used within one month once the original aluminum foil bag is opened. The unused strips should be kept in the aluminum foil bag and taped the opening tightly.
- 4.4.3) Return reagents to +2 to +8°C immediately after use.
- 4.4.4) Washing Solution D (20X) Concentrate can be stored at room temperature to avoid crystallization, because the kits are stored and shipped at +2 to +8°C. If the crystal has been precipitated before use, warm up the solution in 37°C water bath till crystal dissolved.

4.5) Plate Washing Procedure

- 4.5.1) Preparation of washing solution:
Dilute Washing Solution D (20X) Concentrate with distilled or de-ionized water to 1:20 dilution. Do not use tap water.
- 4.5.2) Plate washing:
 - (a) For plate washer with overflow aspirating function: 6 cycles with at least 0.5ml washing buffer per well per cycle.
 - Or
 - (b) For plate washer without overflow aspirating function: 8 cycles with at least 0.35ml washing buffer per well per cycle.
- 4.5.3) Blot dry by inverting the plate and tapping firmly onto absorbent paper. Too much residual wash buffer will cause false results.

WARNING

Improper washing will cause false results.

4.6) Test Procedure

- 4.6.1) Bring all reagents and specimens to room temperature (+20 to 30°C) before assay. Adjust water bath or incubator to 37 ± 1 °C.
- 4.6.2) Preparation of Diluted Conjugate
 - 1. Use only clean container to avoid contamination.
 - 2. Prepare diluted conjugate by making 1:20 dilution of Conc. HCV Ag•HRPO conjugate with conjugate diluent, or following Conjugate Preparation Chart below. Swirl gently to mix thoroughly and avoid foaming.
 - 3. Excess diluted conjugate solution should be discarded after use.

Conjugate Preparation Chart:

| Number of Wells used | Volume of Conjugate Diluent needed (ml) | Volume of Conc. HCV Ag• HRPO conjugate needed (µl) |
|----------------------|---|--|
| 8 | 1 | 50 |
| 16 | 2 | 100 |
| 24 | 3 | 150 |
| 32 | 4 | 200 |
| 40 | 5 | 250 |
| 48 | 6 | 300 |
| 56 | 7 | 350 |
| 64 | 8 | 400 |
| 72 - 80 | 9 | 450 |
| 81 - 96 | 10 | 500 |

- 4.6.3) Reserve one well for blank.
Do not add any specimen or specimen diluent into the well for blank.
- 4.6.4) Prepare the needed number of wells, including 1 well for Blank, 3 wells for Negative Control, 2 wells for Positive Control, and 1 well for each Specimen.
- 4.6.5) Sample input:
 4.6.5.1) Add 100µl of Positive Control, Negative Control and specimen to each appropriate well of HCV Antigens Plate.
 4.6.5.2) Mix well by tapping the plate gently.
NOTE: Use a new pipette tip after each sampling to avoid cross-contamination.
- 4.6.6) Seal the Plate with an Adhesive Slip.
- 4.6.7) Incubate the plate in a 37 ± 1 °C water bath or circulative incubator for 60 minutes.
NOTE: Do not stack plates.
- 4.6.8) At the end of the incubation period, remove carefully the adhesive slip and discard.
- 4.6.9) Wash the plate according to section §4.4. Plate Washing Procedure.
- 4.6.10) Add 100µl of the Diluted Conjugate in each well, except the blank.
- 4.6.11) Seal the plate with an Adhesive Slip.
- 4.6.12) Incubate the Plate in a 37 ± 1 °C water bath or circulative incubator for 30 minutes.
- 4.6.13) Repeat step 4.5.8) and 4.5.9)
- 4.6.14) Select one of the following methods for color development:
 A. Mix equal volumes of Chromogenic TMB concentrate and Substrate Buffer in a clean container immediately prior to use. Add 100µl of the mixture solution to each well including the blank.
 B. Add 50µl of Chromogenic TMB concentrate first, and then add 50µl of Substrate Buffer into each well including the blank. Carefully mix well.
NOTE: Chromogenic TMB concentrate should be colorless to light blue; otherwise, it should be discarded. The mixture of Chromogenic TMB concentrate and Substrate Buffer should be used within 30 minutes after mix. The mixture should be avoided from intense light.
- 4.6.15) Seal the plate with an Adhesive Slip and incubate at 37 ± 1 °C for 15 minutes.
- 4.6.16) Stop the reaction by adding 100µl of Stop Solution to each well including the blank.
- 4.6.17) Determine the absorbance of Controls and test specimens within 15 minutes, measured at 450nm with a selected reference wavelength within 620 to 690nm⁴.
 Use the blank well to blank the spectrophotometer.
NOTE: The color of the blank should be colorless to light yellowish; otherwise, the test results are invalid. Substrate blank : absorbance value must be less than 0.100 OD.

4.7) Calculation of Tested Data

- 4.7.1) Calculation of the NCx (Mean Absorbance of Negative Control).

Example:

| Sample No. | Absorbance |
|------------|------------|
| 1 | 0.045 |
| 2 | 0.060 |
| 3 | 0.051 |

$$NCx = (0.045+0.060+0.051) / 3 = 0.052$$

NCx must be ≤ 0.200 , otherwise the test is invalid.

- 4.7.2) Calculation of PCx (Mean Absorbance of Positive Control)

Example:

| Sample No. | Absorbance |
|------------|------------|
| 1 | 1.510 |
| 2 | 1.826 |

$$PCx = (1.510 + 1.826) / 2 = 1.668$$

PCx must be ≥ 0.600 , otherwise the test is invalid.

- 4.7.3) Calculation of **P-N Value**

$$P-N = PCx - NCx$$

Example:

$$P - N = 1.668 - 0.051 = 1.617$$

P - N Value must be ≥ 0.400 , otherwise the test is invalid.

- 4.7.4) Calculation of the **Cutoff Value**

$$\text{Cutoff Value} = NCx + 0.100$$

Example:

$$\text{Cutoff Value} = 0.053+0.100 = 0.153$$

- 4.7.5) Calculate the cut-off index of the specimens

Cutoff Index

=Sample OD Value / Cutoff Value

Example:

Sample Value is 0.596

Cutoff Index = $0.596/0.153 = 3.895$

4.7.6) Gray Zone: Cut-off index = 1.000 ~ 1.500

4.8) Quality Control of the Test Run

4.8.1) **NCx must be ≤ 0.200 , otherwise the test is invalid.**

4.8.2) **PCx must be ≥ 0.600 , otherwise the test is invalid.**

4.8.3) **P-N Value must be ≥ 0.400 , otherwise the test is invalid.**

NOTE: Negative Control: absorbance value must be less than or equal to 0.200 after subtracting the blank.

4.9) Result Interpretation

4.9.1) Specimens with **CUTOFF INDEX** < 1.000 are considered **NON-REACTIVE** by the criteria of DIAsource's Anti-HCV Elisa V 4.0.

4.9.2) Specimens with **CUTOFF INDEX** ≥ 1.000 are considered as initially **REACTIVE**. They should be **RETESTED** in duplicate.

If both **CUTOFF INDEXES** of the duplicate are **GREATER** than 1.500, the specimen is considered to be repeatedly **REACTIVE** for Anti-HCV by the criteria of DIAsource ImmunoAssays SA's Anti-HCV Elisa V 4.0.

Specimens repeatedly reactive in the Anti-HCV Elisa V 4.0 should be further tested by additional, more specific tests.

4.9.3) Initially reactive specimens, of which both **CUTOFF INDEXES** of the duplicate retest are **LESS** than **1.000**, will be considered **NON-REACTIVE** for Anti-HCV.

4.9.4) If one of the two **CUTOFF INDEXES** of the duplicate is **GREATER** than **1.000** but **LESS** than **1.500**, the specimen may be interpreted as **QUESTIONABLE** and this individual should be monitored in follow up samples, or additional more specific tests should be used.

4.9.5) If one of the **CUTOFF INDEX** of the duplicate is **GREATER** than **1.500** and the other one is **LESS** than **1.000**, this indicates unusual experimental **error**. The test should be repeated again.

4.10) Troubleshooting

If the result cannot be reproduced, please do your own preliminary troubleshooting by checking the possibilities listed below:

4.10.1) Improper washing procedure.

4.10.2) Contaminated with positive specimen.

4.10.3) Add wrong volume of sample, conjugate or substrates.

4.10.4) The well rim is contaminated with conjugate.

4.10.5) Improper specimen such as hemolyzed serum or plasma, specimen containing precipitate and specimen not being mixed well before use.

4.10.6) Wrong incubation time or temperature.

4.10.7) Obstructed or partial obstructed washer aspirate/dispense head and needles.

4.10.8) Insufficient aspiration.

4.11) Limitations and Interferences

4.11.1) This reagent kit is to be used for un-pooled human serum or plasma only.

4.11.2) The reagent kit has not been validated for use with cadaveric samples.

4.11.3) Specimens with very low level of Anti-HCV may not consistently repeat positive. In this case, it is recommended to test follow-up samples.

4.11.4) Anti-HCV negative result does not preclude the possibility of infection with HCV.

4.11.5) Non-repeatable false positive results may occur due to non-specific binding of the sample and conjugate to the wall of the well(s).

4.11.6) Potential Interfering Substances: there is no significant influence on Anti-HCV Elisa V 4.0.

4.12) Storage Conditions and Stability

| Kit/components | Storage condition | State | Stability |
|---|-------------------|-----------|-----------|
| Anti-HCV Elisa V 4.0 KIT | +2 to +8°C | Original | 18 months |
| | | Once open | 1 month |
| Anti-HCV Positive Control | +2 to +8°C | Original | 18 months |
| | | Once open | 1 month |
| Hepatis C Negative Control | +2 to +8°C | Original | 18 months |
| | | Once open | 1 month |
| HCV Antigens Plate | +2 to +8°C | Original | 18 months |
| | | Once open | 1 month |
| Conc. HCV Antigen•HRPO Conjugate Solution | +2 to +8°C | Original | 18 months |
| | | Once open | 1 month |
| Conc. HCV Antigen•HRPO Conjugate Solution | Room temp. | Diluted | 6 hours |
| | +2 to +8°C | Diluted | 2 days |
| Conjugate Diluent | +2 to +8°C | Original | 18 months |
| | | Once open | 1 month |
| Washing Solution D Concentrate (20X) | Room temp. | Original | 24 months |
| | | Once open | 1 month |
| 20X Diluted Washing Solution | Room temp. | Diluted | 2 days |
| | +2 to +8°C | Diluted | 1 week |
| Chromogenic TMB concentrate | +2 to +8°C | Original | 24 months |
| | | Once open | 1 month |
| Substrate Buffer | +2 to +8°C | Original | 24 months |
| | | Once open | 1 month |
| TMB Substrate Solution Mixture | Room temp. | Mixture | 6 hours |
| Stop Solution | Room temp. | Original | 24 months |
| | | Once open | 1 month |

4.13) Performance Characteristics

4.13.1) Analytical Specificity

Potential Interfering Substances: There is no significant influence on Anti-HCV Elisa V 4.0.

| Potential Interfering Substances | n tests | n reactive | n non-reactive |
|---|---------------------|------------|----------------|
| Serum with interfering substances in fixed ratios (Triglycerides, hemoglobin, bilirubin, monoclonal IgG and IgM, and rheumatoid factor) | 50 tests | 0 | 50 |
| Inhibition panels (EDTA, hemoglobin, triglyceride, bilirubin, and heparin) | 14 negative samples | 0 | 14 |
| | 14 positive samples | 14 | 0 |
| Anticoagulant Panels (Serum, EDTA plasma, heparinized plasma, and citrated plasma) | 25 negative samples | 0 | 25 |
| | 25 positive samples | 25 | 0 |
| Total | 128 tested samples | 39 | 89 |

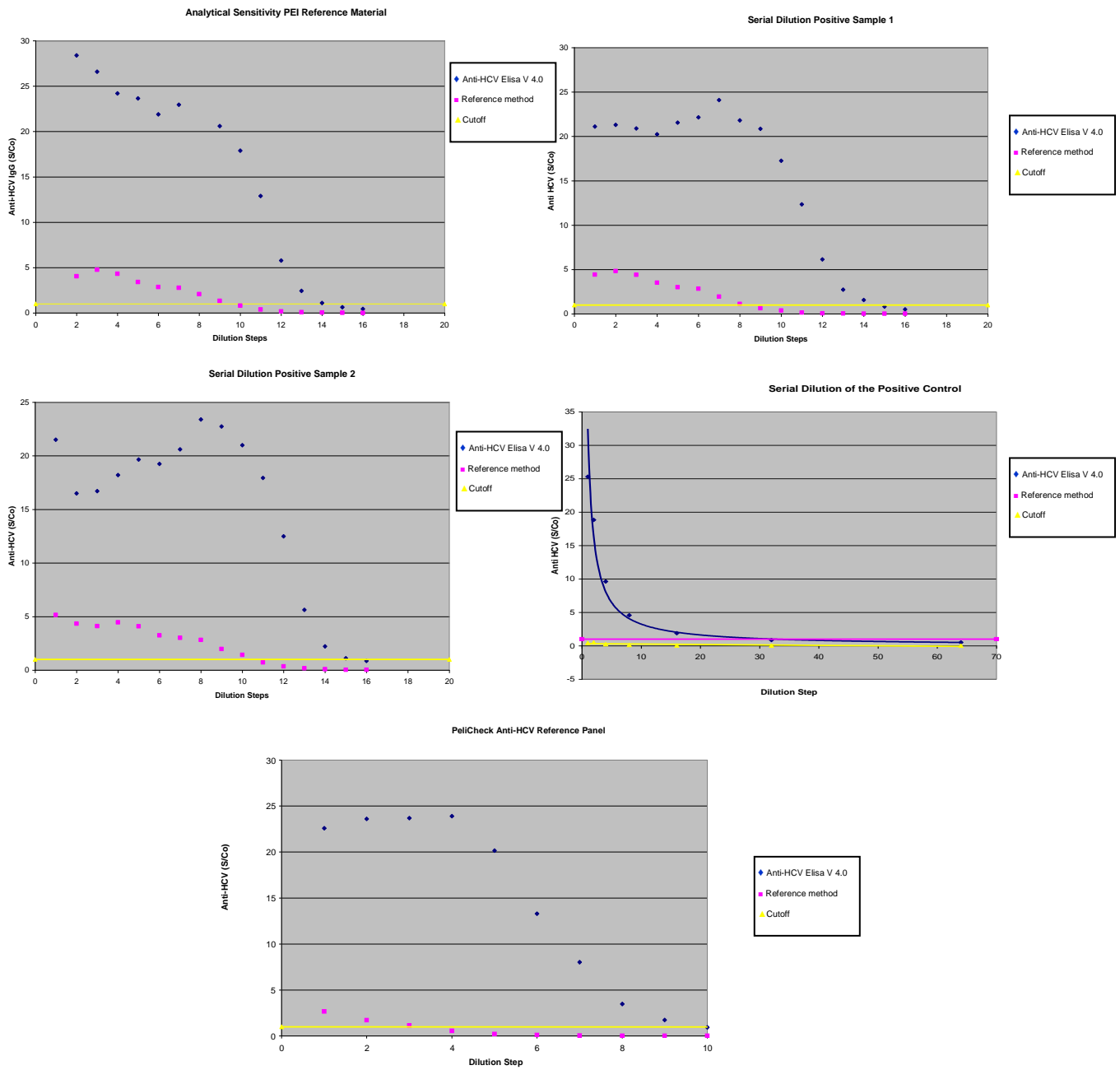
4.13.2) Clinical Specificity

Clinical specificity = 5356/5369 = 99.8 %

| Potential Interfering Substances | n tests | n reactive | n non-reactive | Specificity |
|---|---------|------------|----------------|-------------|
| Blood donors | 5169 | 12 | 5157 | 99.77 % |
| Clinical / hospital specimens | 200 | 1 | 199 | 99.5 % |
| Potentially cross-reacting serum / plasma specimens | 100 | 0 | 100 | 100 % |
| Total | 5369 | 13 | 5356 | 99.8 % |

4.13.3) Analytical Sensitivity

The analytical sensitivity of Anti-HCV Elisa V 4.0 assay is higher than the comparison test.

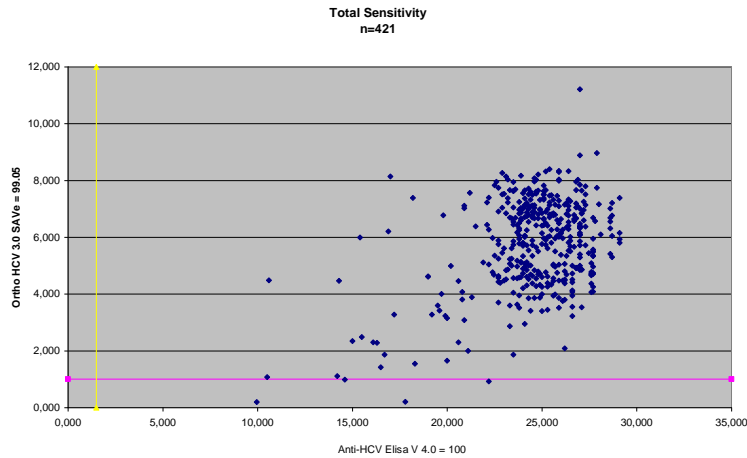


4.13.4) Clinical Sensitivity

1. HCV infected individuals :

The diagnostic sensitivity of the **DIASource ImmunoAssays SA Anti-HCV Elisa V 4.0** was determined to be **100 %**.

421 of 421 positive samples including 20 samples per genotype for genotypes 1a – 4a and 5 samples for genotype 6 were tested and confirmed reactive for HCV antibodies.



2. Commercial seroconversion panels :

Anti-HCV Elisa V 4.0 assay showed a higher seroconversion sensitivity in comparison with the chosen reference method which is CE-marked anti-HCV ELISA.

The total number of tested samples from the 22 seroconversion panels amounted to 198. Sixty three (63) of these samples were tested reactive with Anti-HCV Elisa V 4.0 assay, whereas only 44 of these samples were found to be reactive with the reference method.

4.13.5) Precision

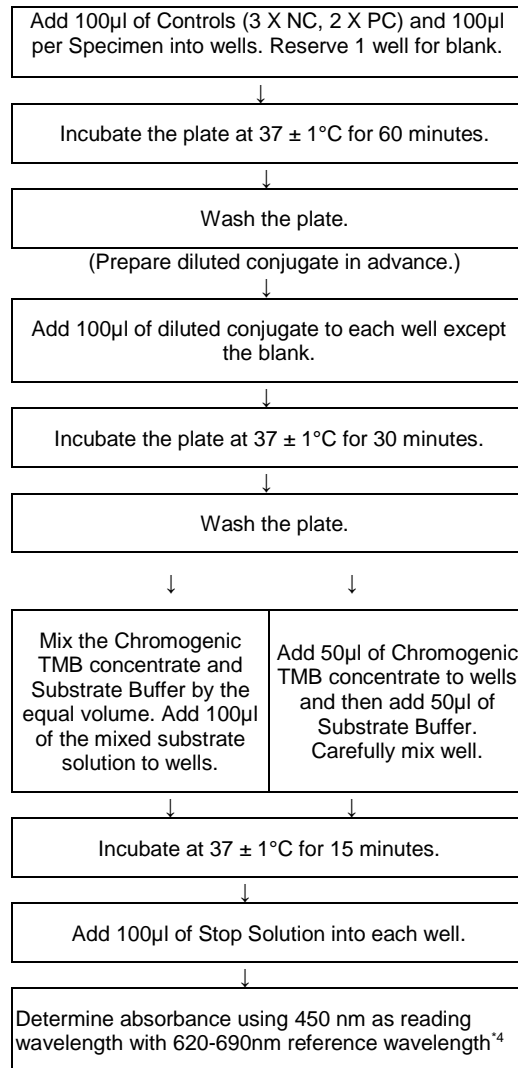
1. Intra-assay Reproducibility

| CUTOFF INDEX | Positive Serum 1 | | Positive Serum 2 | | Positive Control | |
|--------------|------------------|--------|------------------|--------|------------------|--------|
| | Mean | CV (%) | Mean | CV (%) | Mean | CV (%) |
| Day 1 | 4.49 | 7.22 | 9.01 | 5.94 | 21.79 | 4.91 |
| Day 2 | 4.16 | 13.06 | 8.54 | 9.41 | 21.44 | 4.23 |
| Day 3 | 5.07 | 5.24 | 10,64 | 9,27 | 21,70 | 3,08 |
| Mean | 4.57 | 8.51 | 9.40 | 8.21 | 21.64 | 4.07 |

2. Total Imprecision

| Lot C68332PT | | CUTOFF INDEX | | | | Lot C68333PT | | CUTOFF INDEX | | | |
|--------------|----------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|----------|--------------|--------------|-------------|--------------|
| Run-No | Run Date | NC | PS1 | PS2 | PC | Run-No | Run Date | NC | PS1 | PS2 | PC |
| 1 | 15/7/08 | 0.31 | 5.03 | 10.70 | 22.50 | 1 | 19/8/08 | 0,33 | 5,63 | 10,05 | 20,08 |
| 2 | 18/7/08 | 0.30 | 4.52 | 7.83 | 23.56 | 2 | 19/8/08 | 0,25 | 4,96 | 10,50 | 18,10 |
| 3 | 18/7/08 | 0.30 | 4.83 | 9.58 | 21.16 | 3 | 20/8/08 | 0,29 | 5,62 | 10,50 | 21,48 |
| 4 | 21/7/08 | 0.29 | 5.72 | 10.40 | 21.38 | 4 | 21/8/08 | 0,34 | 4,05 | 9,49 | 20,05 |
| 5 | 22/7/08 | 0.33 | 4.91 | 8.82 | 20.72 | 5 | 21/8/08 | 0,33 | 5,31 | 10,20 | 19,36 |
| 6 | 22/7/08 | 0.33 | 4.53 | 10.10 | 17.25 | 6 | 22/8/08 | 0,31 | 5,34 | 8,97 | 19,08 |
| 7 | 23/7/08 | 0.27 | 3.79 | 6.39 | 16.86 | 7 | 22/8/08 | 0,31 | 5,39 | 9,16 | 19,72 |
| 8 | 23/7/08 | 0.34 | 4.21 | 8.08 | 18.42 | 8 | 25/8/08 | 0,25 | 4,31 | 8,64 | 18,79 |
| 9 | 24/7/08 | 0.29 | 5.03 | 7.96 | 20.59 | 9 | 25/8/08 | 0,30 | 5,74 | 10,60 | 21,10 |
| 10 | 24/7/08 | 0.35 | 4.59 | 8.48 | 20.59 | 10 | 26/8/08 | 0,27 | 6,03 | 11,30 | 20,83 |
| MEAN | | 0.31 | 4.73 | 8.83 | 20.30 | MEAN | | 0,30 | 5,15 | 9,94 | 19,86 |
| SD | | 0.03 | 0.52 | 1.36 | 2.17 | SD | | 0,03 | 0,63 | 0,85 | 1,07 |
| CV | | 8.34 | 11.05 | 15.34 | 10.69 | CV | | 10,82 | 12,22 | 8,51 | 5,39 |

4.14) Flow chart of the test procedure



5) BIBLIOGRAPHY

- *1 Abe K, Inchauspe C, Shikate T, and Prince AM. (1992) Three different patterns of hepatitis C virus infection on chimpanzees. *Hepatology*, 15:690.
- *2 Claets H, Volckaerts A, De Beenhouwer H, Vermylen C. (1992) Association of hepatitis C virus carrier state with the occurrence of hepatitis C virus core antibodies. *J. Med. Virol.* 36:259-264.
- *3 Beach MJ, et al. (1992) Temporal relationship of hepatitis C virus RNA and antibody responses following experimental infection of chimpanzee. *J Med. Virol.* 36:226-237.
- *4 The reference wavelength of spectrometer could be 620nm to 690nm. However, user should validate the spectrometer in combination with this kit before use.
- *5 Incomplete inactivation of hepatitis B virus after heat treatment at 60°C for 10 hours, *J. Infect. Dis.* 138:242-244.
- *6 The supplier is: VQC-AcroMetrix: Jan Steenstraat 1,NL-1816 CT Alkmaar, The Netherlands. Type 7 is available in lyophilised or liquid format. The catalogue numbers are S2233 (lyophilised format) and S2058 (liquid format).
- *7 National Inst. For Biological Standards & Control (NIBSC), Blabche Lane South Mimms Potters Bar Herts EN6 3QG, UK; Anti-HCV British Working Standard, Product Code: 02/238-004.

Revision date : 2019-10-23

CE
0344


Anti-HCV Elisa V 4.0.

es

Para la detección cualitativa in-vitro del Anticuerpo contra el virus de la Hepatitis C (anti-VHC) en suero o plasma humano

KAPG4NAE3 : 96 ensayos / KAPG4NAE12 : 480 ensayos

PARA USO DE DIAGNÓSTICO IN VITRO **IVD**

 DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 90

1) USO PREVISTO

El kit de diagnóstico **Anti-HCV Elisa V 4.0** es un inmunoensayo enzimático de cuarta generación para la detección cualitativa in vitro del anticuerpo contra el virus de la Hepatitis C (anti-VHC) en suero o plasma humano.

2) TEORÍA DEL DISEÑO/BREVE DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

Elisa V 4.0 Anti-VHC adopta el “principio del sándwich directo” como la base del ensayo para detectar anticuerpos contra el virus de la Hepatitis C (anti-VHC). Es un kit de inmunoensayo enzimático de cuarta generación que usa antígenos recombinantes del VHC (antígenos Core, NS3 y NS5) para la detección del virus de la Hepatitis C (anti-VHC) en suero o plasma humano.^{*1-3} Estos antígenos, que reaccionan con los anticuerpos predominantes contra el VHC, constituyen la fase sólida antigénica absorbente. Cuando el suero o plasma humano se agrega a los pocillos, si anti- VHC está presente en la muestra, los antígenos del VHC formarán complejos con anti-VHC. Se lavan los pocillos para eliminar el material que no se ha unido. Se agrega el conjugado diluido HVC Ag•HRPO a los pocillos lo que resulta en la formación de un complejo (VHC) • (Anti-VHC) • (VHC Ag•HRPO). Después de eliminar por lavado el complejo que no se ha unido, se agrega una solución de sustrato TMB para desarrollar color. La intensidad del color es proporcional a la cantidad de anticuerpos presentes en la muestra. Los procesos reactivos están resumidos como sigue:

A. Muestra (que contiene anti-VHC):





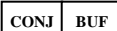

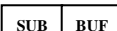

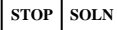
1. Placa (VHC Ag) + muestra (que contiene Anti-VHC) → placa (VHC Ag) • Anti- VHC
2. Lave para eliminar el material que no se ha unido.
3. Placa (VHC Ag) Anti- VHC + VHC Ag•HRPO → placa (VHC Ag)•Anti- VHC • VHC Ag•HRPO complejo
4. Lave para eliminar el material que no se ha unido.
5. Placa (VHC Ag) •Anti- VHC • VHC Ag•HRPO complejo + solución de sustrato TMB → de color azul claro a azul
6. De color azul claro a azul + solución de parada →de color amarillo pálido a amarillo, medido a 450nm con una longitud de onda seleccionada entre 620 y 690nm^{*4}

B. Muestra (sin anti-VHC):

1. Placa (VHC Ag) + muestra (sin Anti-VHC) → placa (VHC Ag)
2. Lave para eliminar el material que no se ha unido.
3. Placa (VHC Ag) + VHC Ag•HRPO → placa (VHC Ag)----- no se formará un complejo
4. Lave para eliminar el material que no se ha unido.
4. Placa (VHC Ag) + solución de sustrato TMB (incolora) → incolora
5. Incolora + solución de parada → incolora, medida a 450nm con una longitud de onda de referencia seleccionada de 620 a 690nm^{*4}

3) DESCRIPCIÓN DE MATERIALES SUMINISTRADOS & SISTEMA DE CÓDIGOS DE PRODUCTOS

- Item 1 - 7 en la siguiente tabla de reactivos deben permanecer refrigerados entre + 2 y +8°C. La Solución de Lavado (20X) y la solución de parada pueden almacenarse entre +2 y +30°C.





| ITEMS | Componentes | Descripción | Cant. para 96 ensayos | Cant. para ensayos |
|-------|---|---|-----------------------|--------------------|
| (1) |  VHC Ag Placa | Una microplaca recubiertos con antígenos VHC. | 1 placa | 5 placas |
| (2) |  Conjugado Conc. VHC Ag•HRPO | Contiene VHC Ag•Peroxidasa (Rábano picante) en tampón con suero Bovino. Conservantes: 0,005 % Azida de sodio y 0,05 % estabilizador de la enzima. | 1 vial, 1.8 ml | 1 vial, 5ml |
| (3) |  Control Positivo Anti-VHC | Plasma humano inactivado positivo para -Anti-VHC. Conservante: 0,099 % Azida de sodio. | 1 vial, 2.0 ml | 1 vial, 5ml |
| (4) |  Control Negativo Hepatitis C | Plasma humano normal, no reactivo con el anticuerpo contra VHC. Conservantes: 0,099 % Azida de sodio | 1 vial, 3.0 ml | 1 vial, 5ml |
| (5) |  Diluyente del Conjugado | Tampón Fosfato PB con suero Bovino y Tween-20. Conservantes: 0,005 % Azida de sodio y 0,05 % estabilizador de la enzima. | 1 vial, 24 ml | 1 vial, 100ml |
| (6) |  TMB cromogenico concentrado | 0.6 mg/ml de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) en una base orgánica | 1 vial, 12 ml | 1 vial, 35ml |
| (7) |  Tampón del Sustrato | Tampón de ácido acetato con peróxido de hidrógeno-urea. | 1 vial, 12 ml | 1 vial, 35ml |
| (8) |  Solución de Lavado Conc. D (20x) | Tampón de fosfato con Tween-20 | 1 vial, 110 ml | 1 vial, 400ml |
| (9) |  Solución de Parada | 1N Solución de Parada | 1 vial, 12 ml | 1 vial, 50ml |

● OTROS MATERIALES REQUERIDOS PERO NO SUMINISTRADOS

| ÍTEMS | Componentes |
|-------|--|
| (1) | Micropipetas y puntas de 50µl, 100 µl, 200 µl y 1-ml |
| (2) | Incubadora o baño maría a +37 ±1°C |
| (3) | Tubos para dilución de las muestras. |
| (4) | Equipo para lavado de placas. |
| (5) | Agua purificada: destilada o desionizada. |
| (6) | Lector de microplacas ELISA: Longitud de onda dual 450nm con longitud de onda de referencia de 620-690nm*4, ancho de banda 10nm. |
| (7) | Un analizador EIA de microplacas totalmente automático es opcional. El usuario debe validar el equipo en conjunto con el kit. |
| (8) | Cubierta Auto adhesiva |

4) INSTRUCCIONES DE USO

4.1) Advertencias:

- 4.1.1) Este kit de reactivos es sólo para uso profesional.
- 4.1.2) **IVD** Este kit de reactivos es sólo para uso de diagnóstico *in vitro*.
- 4.1.3) Procure que todos los reactivos del kit y las muestras alcancen temperatura ambiente (+20 to +30 °C) y mézclelos cuidadosamente antes de usar.
- 4.1.4) No use reactivos después de su fecha de caducidad.
- 4.1.5) No intercambie reactivos entre lotes diferentes.
- 4.1.6) No pipetee con la boca.
- 4.1.7) No fume o coma en zonas donde se manipulan muestras o reactivos.
- 4.1.8) Todos los componentes y las muestras deben considerarse como peligros potenciales para la salud. Deben usarse y eliminarse de acuerdo con los procedimientos de seguridad del laboratorio del usuario. Estos procedimientos de seguridad probablemente incluirán el uso guantes de protección y evitar la generación de aerosoles.
- 4.1.9) Las muestras potencialmente infecciosas y derrames o goteos que no contienen ácidos deben ser limpiados concienzudamente con hipoclorito de sodio al 5% o tratado de acuerdo con las prácticas del laboratorio para el control de un potencial riesgo biológico.
- 4.1.10) Antes de eliminar los desechos de las muestras usadas y reactivos del kit como desechos generales, estos deben ser tratados de acuerdo con el procedimiento local para desecho con potencial riesgo biológico o tratado como sigue:
Tanto los desechos sólidos como los líquidos deben ser autoclavados a +121 °C por lo menos por 30 minutos.
El desecho sólido también se puede incinerar.
El desecho líquido no ácido puede tratarse con hipoclorito de sodio diluido a una concentración final de 1%.
Los desechos ácidos deben ser neutralizados antes de tratarlos con hipoclorito de sodio como se mencionó antes y debe mantenerse por 30 minutos para obtener una desinfección efectiva.
- 4.1.11)  La solución de parada es irritante para los ojos, la piel, vías respiratorias y membranas mucosas. Evite el contacto de la solución de parada con la piel y membranas mucosas. En caso de contacto, lave con copiosa cantidad de agua inmediatamente. En caso de inhalación, proporcione aire fresco y busque ayuda médica en caso de molestias.
- 4.1.12)   El concentrado cromogénico TMB contiene un solvente orgánico, que es inflamable: el concentrado cromogénico TMB contiene dimetil sulfóxido, un irritante para la piel y membranas mucosas.
- 4.1.13)  A pesar de que todo el material de origen humano ha resultado no reactivo para HBsAg y Anti-VIH y ha sido inactivado a +56 °C por una hora, el reactivo debe manipularse como material potencialmente infeccioso.*7

4.2) Riesgos residuales

- 4.2.1) Una operación incorrecta podría conducir a resultados incorrectos.
- 4.2.2) El uso del kit después de la fecha de vencimiento puede dar lugar a resultados incorrectos.
- 4.2.3) La lavadora ineficiente y el lector ELISA podrían afectar el resultado final.
- 4.2.4) El almacenamiento a temperaturas más altas podría afectar la vida útil del producto.
- 4.2.5) El producto es para un solo uso. La reutilización podría conducir a resultados incorrectos.
- 4.2.6) Cualquier cambio en el procedimiento de prueba puede conducir a resultados incorrectos que podrían causar un error de diagnóstico.

4.3) Toma y Almacenaje de la muestra

- 4.3.1) Con este kit diagnóstico se puede usar suero o plasma. La muestra de sangre total debe separarse lo antes posible para evitar hemólisis. Cualquier partícula presente en la muestra (por ej. glóbulos rojos, coágulos de fibrina) deben eliminarse antes de usar.
- 4.3.2) Las muestras deben almacenarse de +2 a +8 °C y evitar inactivación por calor para minimizar el deterioro. Para almacenar por periodos largos, las muestras se deben congelar por debajo de -20 °C. No se recomienda almacenarlas en congeladores que se auto descongelan.
- 4.3.3) Las muestras congeladas deben ser descongeladas completamente y mezcladas en forma homogénea antes del ensayo.
- 4.3.4) Evite congelar y descongelar en forma sucesiva
- 4.3.5) No se debe usar suero parcialmente coagulado ni muestras con contaminación bacteriana.

4.4) Almacenaje del kit

- 4.4.1) El kit debe almacenarse entre +2 y +8 °C. No congelar.
- 4.4.2) Las tiras de las placas deben usarse dentro de uno mes después de abrir la bolsa original de aluminio. Las tiras no usadas deben permanecer en la bolsa de aluminio firmemente sellada.
- 4.4.3) Almacene los reactivos nuevamente entre +2 y +8 °C inmediatamente después de su uso.
- 4.4.4) El concentrado (x20) de la solución D de lavado es almacenado y transportado entre +2 y +8 °C, lo que puede causar cristalización. Si hay precipitado de cristales antes del uso, caliente la solución en un baño maría a +37 °C hasta que los cristales se disuelvan.

4.5) Procedimiento de lavado de placas

- 4.5.1) Preparación de la solución de lavado:
Diluya la solución D de Lavado (x20) con agua destilada o desionizada a una dilución de 1:20. No use agua del grifo.
- 4.5.2) Lavado de las placas:
 - (a) Para un lavador de placas con función de aspiración de desborde: 6 ciclos de por lo menos 0,5 ml de tampón de lavado por pocillo, por ciclo
o
 - (b) Para un lavador sin la función de aspiración de desborde: 8 ciclos de por lo menos 0,35ml de tampón de lavado por pocillo, por ciclo.
- 4.5.3) Seque invirtiendo la placa sobre un papel absorbente y golpeándola enérgicamente. Si queda demasiado tampón de lavado residual, podría causar resultados falsos.

¡ADVERTENCIA!

Un lavado inadecuado causará resultados falsos.

4.6) Procedimiento

- 4.6.1) Asegúrese de que todos los reactivos y muestras alcancen temperatura ambiente (+20 a +30 °C) antes del ensayo. Ajuste el baño maría o incubadora a +37±1 °C.
- 4.6.2) Preparación del **Conjugado diluido**
 - 1. Use solo un envase limpio para evitar contaminación.
 - 2. Prepare conjugado diluido comenzando con una dilución de 1:20 del conjugado VHC Ag•HRPO conc., con el diluyente del conjugado, o siga la tabla de preparación del conjugado que está a continuación. Agite suavemente para mezclar totalmente y evite la formación de espuma.
 - 3. Después de usarla, toda la solución diluyente del sustrato que sobre, debe ser eliminada.

Tabla de Preparación del Conjugado:

| Número de Pocillos Usados | Volumen necesario (ml) de Diluyente del Conjugado | Volumen de conjugado VHC Ag• HRPO conc. necesario (µl) |
|---------------------------|---|--|
| 8 | 1 | 50 |
| 16 | 2 | 100 |
| 24 | 3 | 150 |
| 32 | 4 | 200 |
| 40 | 5 | 250 |
| 48 | 6 | 300 |
| 56 | 7 | 350 |
| 64 | 8 | 400 |
| 72 - 80 | 9 | 450 |
| 81 - 96 | 10 | 500 |

4.6.3) Reserve un pocillo para el blanco

No agregue ninguna muestra o diluyente para muestra en el pocillo para el blanco.

4.6.4) Prepare la cantidad de pocillos necesarios, incluyendo 1 pocillo para el Blanco, 3 pocillos para el Control Negativo, 2 pocillos para el Control Positivo y 1 pocillo para cada Muestra.

4.6.5) Distribución de las muestras:

4.6.5.1) Agregue 100µl de Control Positivo Control Negativo y Muestra a cada pocillo correspondiente en la placa de antígenos de VHC.

4.6.5.2) Mezcle bien golpeando la placa suavemente.

NOTA: Use una punta de pipeta nueva para cada muestra para evitar contaminación cruzada.

4.6.6) Selle la Placa con una Cubierta Auto adhesiva.

4.6.7) Incube la placa en baño maría a 37 ± 1 °C o en una incubadora con circulación de aire por 60 minutos.

NOTA: No apile las placas.

4.6.8) Al término del periodo de incubación, saque la cubierta auto adhesiva cuidadosamente y elimínela.

4.6.9) Lave la placa de acuerdo con la sección §4.4. Procedimiento de Lavado de las Placas.

4.6.10) Agregue 100µl de Conjugado Diluido a cada pocillo, excepto al blanco.

4.6.11) Selle la Placa con una Cubierta Auto adhesiva.

4.6.12) Incube la placa en baño maría a 37 ± 1 °C o en una incubadora con circulación de aire por 30 minutos.

4.6.13) Repita los pasos 4.5.8) y 4.5.9)

4.6.14) Seleccione uno de los dos métodos siguientes para desarrollar el color:

- A. Mezcle volúmenes iguales de **concentrado cromogénico TMB y Tampón de sustrato** en un recipiente limpio inmediatamente antes de usar. Agregue 100 µl de la solución de la mezcla a cada pocillo incluyendo el blanco.
- B. Agregue primero **50 µl de concentrado cromogénico TMB** y luego agregue **50 µl de Tampón del sustrato** a cada pocillo incluyendo el blanco. Mezcle suavemente.



NOTA: El concentrado cromogénico TMB debe ser entre incoloro y celeste; de otro modo debe ser eliminado. La mezcla de concentrado cromogénico TMB con tampón del sustrato debe usarse dentro de 30 minutos a partir del momento de la mezcla. La mezcla debe protegerse de la luz intensa.

4.6.15) Selle la placa con una Cubierta Auto adhesiva e incube a 37 ± 1 °C por 15 minutos.

4.6.16) Detenga la reacción agregando 100 µl de solución de parada en cada pocillo incluyendo el blanco

4.6.17) Determine la absorbancia de los controles y muestras dentro de 15 minutos con un fotómetro de precisión a 450 / 620-690 nm (Longitud de onda de 450 nm para la lectura con 620-690 nm de longitud de onda de referencia)*4. Use el blanco para blanquear el fotómetro.

NOTA:

El color del blanco debe ser de incoloro a amarillento pálido; de otro modo el ensayo es inválido. En este caso el ensayo debe ser repetido.

Blanco Sustrato: la absorbancia debe ser menor de 0,100 DO.

4.7) Cálculo de los resultados del ensayo

4.7.1) Cálculo de la CNx (Absorbancia promedio del Control Negativo).

Ejemplo:

| Muestra No. | Absorbancia |
|-------------|-------------|
| 1 | 0.045 |
| 2 | 0.060 |
| 3 | 0.051 |

$$CNx = (0.045+0.060+0.051) / 3 = 0.052$$

CNx debe ser $\leq 0,200$ de otro modo el ensayo es inválido.

4.7.2 Cálculo de CPx (Absorbancia Promedio del Control Positivo)

Ejemplo:

| Muestra No. | Absorbancia |
|-------------|-------------|
| 1 | 1.510 |
| 2 | 1.826 |

$$CPx = (1.510 + 1.826) / 2 = 1.668$$

CPx debe ser ≥ 0.600 de otro modo el ensayo es inválido.

4.7.3) Cálculo del **Valor P-N**

$$P-N = CPx - CNx$$

Ejemplo:

$$P - N = 1.668 - 0.051 = 1.617$$

El valor P - N debe ser $\geq 0,400$ de otro modo el ensayo es inválido.

4.7.4) Cálculo del **Valor de Corte**

$$\text{Valor de Corte} = CNx + 0.100$$

Ejemplo:

$$\text{Valor de Corte} = 0.053+0.100 = 0.153$$

4.7.5) Calcule el índice de corte para las muestras

$$\text{Índice de corte} = \text{DO de la Muestra} / \text{Valor de Corte}$$

Ejemplo:

El valor de la Muestra es 0,596

$$\text{Índice de Corte} = 0,596/0,153 = 3,895$$

4.7.6) Zona Gris: **Índice de corte** = 1,000 ~ 1,500

4.8) Control de Calidad del Ensayo

4.8.1) **CNx debe ser $\leq 0,200$ de otro modo el ensayo es inválido.**

4.8.2) **CPx debe ser ≥ 0.600 de otro modo el ensayo es inválido.**

4.8.3) **El valor P - N debe ser $\geq 0,400$ de otro modo el ensayo es inválido.**

NOTA: Control Negativo: la absorbancia debe ser menor o igual a 0,200 después de restar el blanco.

4.9) Interpretación de los Resultados

4.9.1) Muestras con **ÍNDICE DE CORTE** < **1,000** se consideran **NO-REACTIVAS** según el criterio del Elisa V 4.0 Anti-VHC de DIASource.

4.9.2) Muestras con **ÍNDICE DE CORTE** \geq **1,000** inicialmente se consideran como **REACTIVAS**. Deben ser **REPETIDAS** en duplicado.

Si ambos **ÍNDICES DE CORTE** de los duplicados son **MAYORES** de 1,500, la muestra se considerará reiteradamente **REACTIVA** con Anti-VHC según el criterio del Inmunoensayo de DIASource Elisa V 4.0 Anti-VHC. Las muestras que son reactivas reiteradamente con el Elisa V 4.0 Anti-VHC deben ser analizadas con pruebas adicionales más específicas.

4.9.3) Las muestras reactivas inicialmente donde al ser repetidas, ambos **INDICES DE CORTE** son **MENORES** de **1,000** se considerarán **NO-REACTIVAS** con Anti-VHC.

4.9.4) Si uno de los dos **ÍNDICES DE CORTE** del duplicado es **MAYOR** de **1,000** pero **MENOR** de **1,500**, se puede

interpretar la muestra como **DUDOSA** y este individuo debe ser monitorizado con tomas de muestra ulteriores o realizando pruebas adicionales más específicas.

4.9.5) Si uno de los **INDICES DE CORTE** de los duplicados es **MAYOR** de **1,500** y el otro es **MENOR** de **1,000**, esto indica un **error inusual** experimental; Este ensayo debe ser repetido.

4.10) Solución de Problemas

Si el resultando no puede ser reproducido, una solución preliminar podría obtenerse revisando las posibilidades mencionadas a continuación:

4.10.1) Procedimiento de lavado inadecuado.

4.10.2) Muestra contaminada con positivo.

4.10.3) Volumen de muestra, conjugado o sustrato equivocado.

4.10.4) Contaminación del borde del pocillo con conjugado.

4.10.5) Muestra inadecuada, p.ej. suero o plasma hemolizados, muestra con precipitado, muestra no suficientemente mezclada antes del uso.

4.10.6) Tiempo o temperatura de incubación equivocados.

4.10.7) Cabeza y agujas de la lavadora para dispensar/aspirar total o parcialmente obstruidas.

4.10.8) Aspiración insuficiente.

4.11) Limitaciones e Interferencias

4.11.1) Este kit de reactivos es para ser usados con muestras de suero o plasma humano individual.

4.11.2) El kit no ha sido validado par uso con muestras de cadáver.

4.11.3) Es posible que muestras con niveles muy bajos de Anti-VHC, no resulten positivas de manera consistente al repetir el ensayo. En este caso, se recomienda analizar muestras posteriores.

4.11.4) Un resultado Anti-VHC negativo no elimina la posibilidad de infección con VHC.

4.11.5) Pueden ocurrir resultados falsos positivos que son irreproducibles, debido a una unión no específica de la muestra y el conjugado a la pared del (los) pocillo(s).

4.11.6) Sustancias que podrían interferir: no tienen una influencia significativa sobre Elisa V 4.0. Anti-VHC

4.12) CONDICIONES DE ALMACENAJE Y ESTABILIDAD

| Kit/componentes | Condición de almacenaje | Estado | Estabilidad |
|---|-------------------------|-----------------|-------------|
| Anti-VHC ELISA V 4.0 kit | +2 to +8°C | Original | 18 meses |
| | | Una vez abierto | 1 mes |
| Control Positivo Anti-VHC | +2 to +8°C | Original | 18 meses |
| | | Una vez abierto | 1 mes |
| Control Negativo Hepatis C | +2 to +8°C | Original | 18 meses |
| | | Una vez abierto | 1 mes |
| Placa VHC Antigen | +2 to +8°C | Original | 18 meses |
| | | Una vez abierto | 1 mes |
| Solución Conjugado Conc. VHC Antigen•HRPO | +2 to +8°C | Original | 18 meses |
| | | Una vez abierto | 1 mes |
| | | Una vez abierto | 1 mes |
| Solución Conjugado Conc. VHC Antigen•HRPO | Temp ambiente | Diluido | 6 horas |
| | +2 to +8°C | Diluido | 2 dias |
| Conjugado diluido | +2 to +8°C | Original | 18 meses |
| | | Una vez abierto | 1 mes |
| Solución de Lavado Concentrada D (20X) | Temp ambiente | Original | 24 meses |

| | | | |
|------------------------------------|---------------|-----------------|----------|
| | | Una vez abierto | 1 mes |
| Solución de Lavado Diluida 20x | Temp ambiente | Diluido | 2 días |
| | +2 to +8°C | Diluido | 1 semana |
| TMB cromogénico concentrado | +2 to +8°C | Original | 24 meses |
| | | Una vez abierto | 1 mes |
| Tampón del sustrato | +2 to +8°C | Original | 24 meses |
| | | Una vez abierto | 1 mes |
| Mezcla de Solución de Sustrato TMB | Temp ambiente | Mezcla | 6 horas |
| Solución de Parada | Temp ambiente | Original | 24 meses |
| | | Una vez abierto | 1 mes |

4.13) Características del Ensayo

4.13.1) Especificidad Diagnostica

Sustancias que podrían interferir: No hay influencia significativa sobre Anti-VHC Elisa V 4.0.

| Sustancias que podrían Interferir | Nº pruebas | Nº reactivas | Nº no-reactivas |
|---|-------------------------|--------------|-----------------|
| Suero con sustancias que podrían interferir en proporciones fijas (Triglicéridos, hemoglobina, bilirrubina, IgG e IgM monoclonales y factor reumatoide) | 50 pruebas | 0 | 50 |
| Paneles de inhibición (EDTA, hemoglobina, triglicéridos, bilirrubina y heparina) | 14 muestras negativas | 0 | 14 |
| | 14 muestras positivas | 14 | 0 |
| Paneles de anticoagulantes (Suero, plasma en EDTA, Plasma heparinizado, y plasma en citrato) | 25 muestras negativas | 0 | 25 |
| | 25 muestras positivas | 25 | 0 |
| Total | 128 muestras analizadas | 39 | 89 |

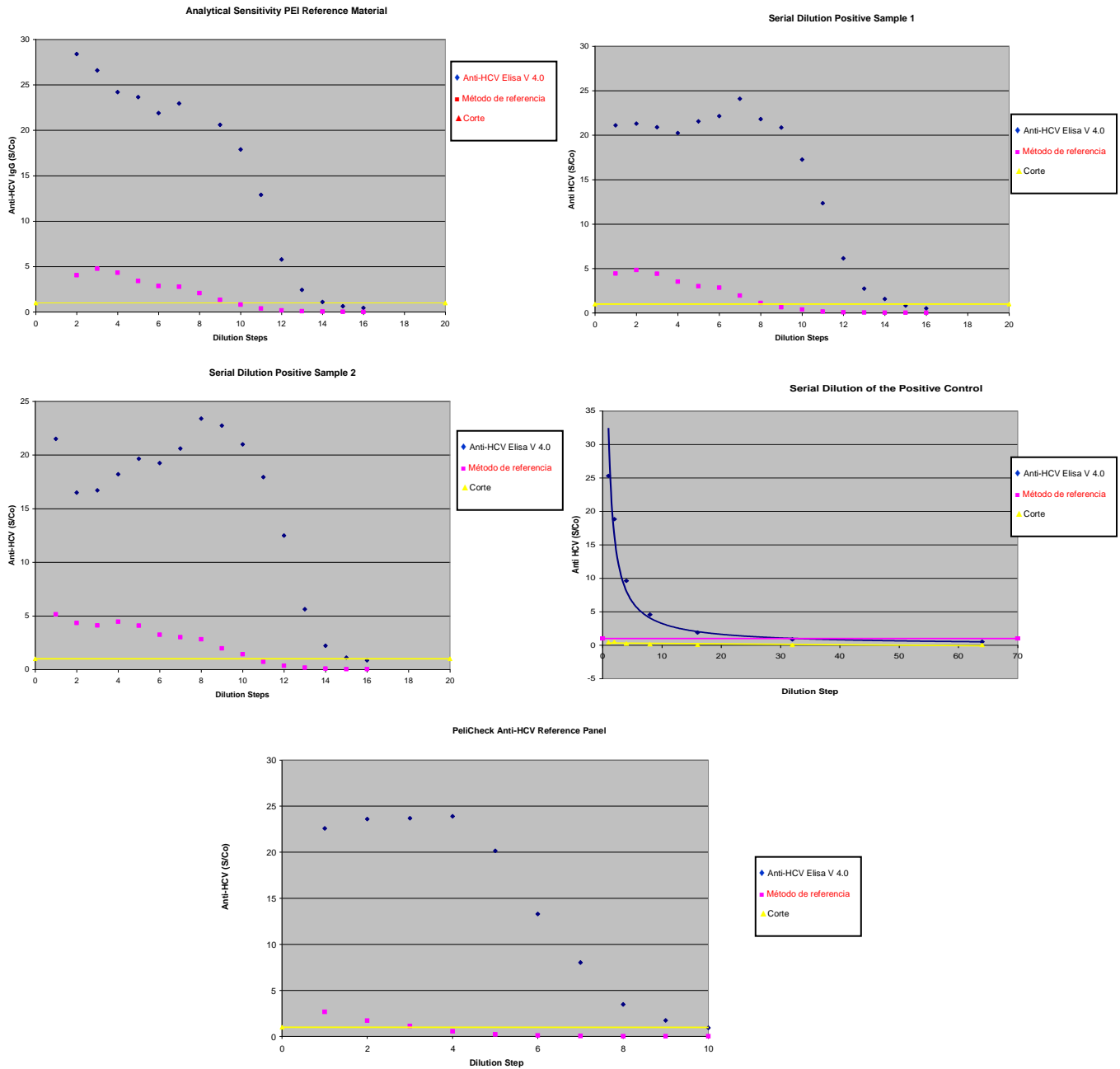
4.13.2) Especificidad Clínica

Especificidad Clínica = 5356/5369 = 99,8 %

| Sustancias que pueden Interferir Potencialmente | Nº pruebas | Nº reactivas | Nº no-reactivas | Especificidad |
|---|------------|--------------|-----------------|---------------|
| Donantes de sangre | 5169 | 12 | 5157 | 99,77 % |
| Muestras clínicas / de hospital | 200 | 1 | 199 | 99,5 % |
| Muestras de suero/plasma con reacción cruzada potencial | 100 | 0 | 100 | 100 % |
| Total | 5369 | 13 | 5356 | 99,8 % |

4.13.3) Sensibilidad Analítica

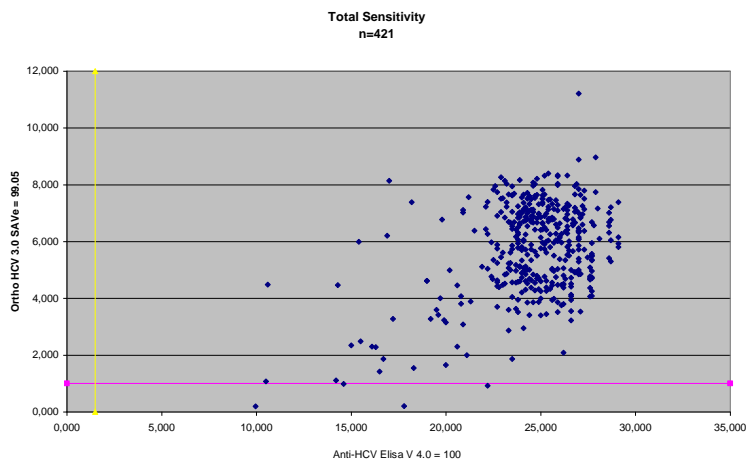
La sensibilidad analítica del ensayo Elisa V 4.0 Anti-VHC es más alta que la del ensayo de comparación.



4.13.4) Sensibilidad Clínica

1. Individuos infectados con VHB

Se determinó que la sensibilidad del Inmunoensayo de DIAsource SA Elisa V 4.0 anti-VHC es de un 100 %. 421 de las 421 muestras positivas incluyendo 20 muestras por genotipo para los genotipos 1a – 4a y 5 muestras para el genotipo 6 fueron analizadas y confirmadas como reactivas con anticuerpos VHC.



2. Paneles de seroconversión Comerciales

El ensayo Anti-VHC Elisa v4.0 mostró una sensibilidad a la seroconversión mayor al compararlo con el método de referencia de elección que es un ELISA anti- VHC con la marca CE.

El número total de muestras analizadas de los 22 paneles de seroconversión alcanzaron a 198. Sesenta y tres (63) de estas muestras resultaron reactivas con el ensayo Anti-HVC Elisa v4.0, en cambio solo 44 de estas muestras resultaron reactivas con el método de referencia.

4.13.5) Precisión

1. Reproducibilidad intra ensayo

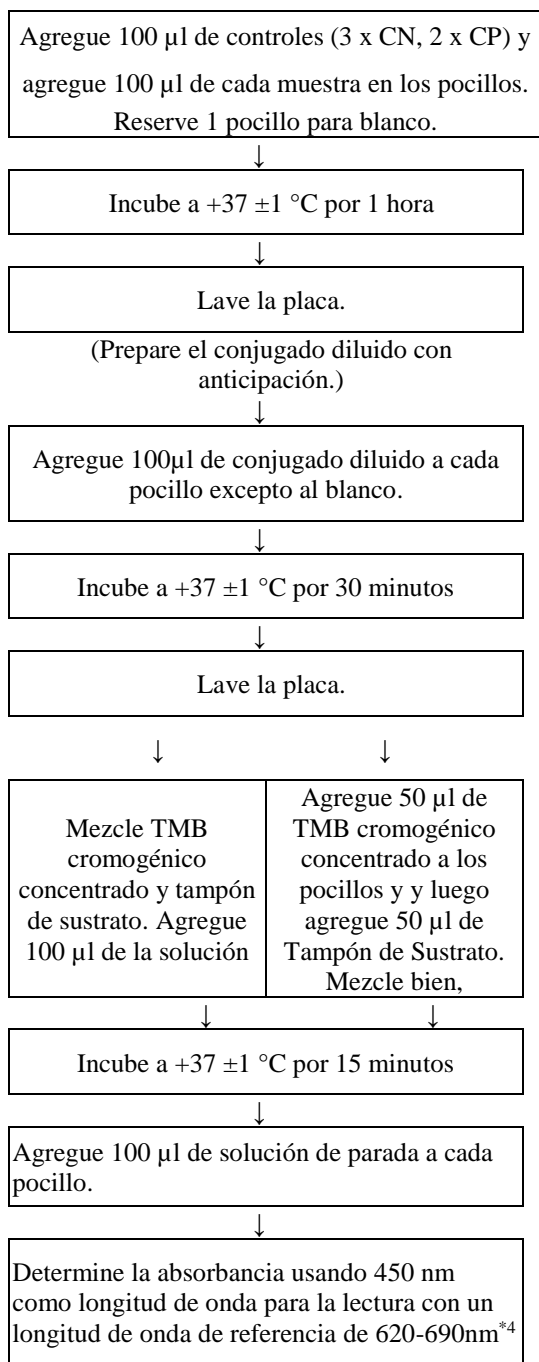
| ÍNDICE DE CORTE | Suero Positivo 1 | | Suero Positivo 2 | | Control Positivo | |
|-----------------|------------------|-------------|------------------|-------------|------------------|-------------|
| | Promedio | CV (%) | Promedio | CV (%) | Promedio | CV (%) |
| Día 1 | 4.49 | 7.22 | 9.01 | 5.94 | 21.79 | 4.91 |
| Día 2 | 4.16 | 13.06 | 8.54 | 9.41 | 21.44 | 4.23 |
| Día 3 | 5.07 | 5.24 | 10,64 | 9,27 | 21,70 | 3,08 |
| Promedio | 4.57 | 8.51 | 9.40 | 8.21 | 21.64 | 4.07 |

2. Imprecisión Total

| Lot C68332PT | | CUTOFF INDEX | | | |
|--------------|----------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Run-No | Run Date | NC | PS1 | PS2 | PC |
| 1 | 15/7/08 | 0.31 | 5.03 | 10.70 | 22.50 |
| 2 | 18/7/08 | 0.30 | 4.52 | 7.83 | 23.56 |
| 3 | 18/7/08 | 0.30 | 4.83 | 9.58 | 21.16 |
| 4 | 21/7/08 | 0.29 | 5.72 | 10.40 | 21.38 |
| 5 | 22/7/08 | 0.33 | 4.91 | 8.82 | 20.72 |
| 6 | 22/7/08 | 0.33 | 4.53 | 10.10 | 17.25 |
| 7 | 23/7/08 | 0.27 | 3.79 | 6.39 | 16.86 |
| 8 | 23/7/08 | 0.34 | 4.21 | 8.08 | 18.42 |
| 9 | 24/7/08 | 0.29 | 5.03 | 7.96 | 20.59 |
| 10 | 24/7/08 | 0.35 | 4.59 | 8.48 | 20.59 |
| MEAN | | 0.31 | 4.73 | 8.83 | 20.30 |
| SD | | 0.03 | 0.52 | 1.36 | 2.17 |
| CV | | 8.34 | 11.05 | 15.34 | 10.69 |

| Lot C68333PT | | CUTOFF INDEX | | | |
|--------------|----------|--------------|--------------|-------------|--------------|
| Run-No | Run Date | NC | PS1 | PS2 | PC |
| 1 | 19/8/08 | 0,33 | 5,63 | 10,05 | 20,08 |
| 2 | 19/8/08 | 0,25 | 4,96 | 10,50 | 18,10 |
| 3 | 20/8/08 | 0,29 | 5,62 | 10,50 | 21,48 |
| 4 | 21/8/08 | 0,34 | 4,05 | 9,49 | 20,05 |
| 5 | 21/8/08 | 0,33 | 5,31 | 10,20 | 19,36 |
| 6 | 22/8/08 | 0,31 | 5,34 | 8,97 | 19,08 |
| 7 | 22/8/08 | 0,31 | 5,39 | 9,16 | 19,72 |
| 8 | 25/8/08 | 0,25 | 4,31 | 8,64 | 18,79 |
| 9 | 25/8/08 | 0,30 | 5,74 | 10,60 | 21,10 |
| 10 | 26/8/08 | 0,27 | 6,03 | 11,30 | 20,83 |
| MEAN | | 0,30 | 5,15 | 9,94 | 19,86 |
| SD | | 0,03 | 0,63 | 0,85 | 1,07 |
| CV | | 10,82 | 12,22 | 8,51 | 5,39 |

4.14) Diagrama de Flujo del Procedimiento del Ensayo



5) BIBLIOGRAFÍA

- *1 Abe K, Inchauspe C, Shikate T, and Prince AM. (1992) Three different patterns of hepatitis C virus infection on chimpanzees. *Hepatology*, 15:690.
- *2 Claets H, Volckaerts A, De Beenhouwer H, Vermeylen C. (1992) Association of hepatitis C virus carrier state with the occurrence of hepatitis C virus core antibodies. *J. Med. Virol.* 36:259-264.
- *3 Beach MJ, et al. (1992) Temporal relationship of hepatitis C virus RNA and antibody responses following experimental infection of chimpanzee. *J Med. Virol.* 36:226-237.
- *4 The reference wavelength of spectrometer could be 620nm to 690nm. However, user should validate the spectrometer in combination with this kit before use.
- *5 Incomplete inactivation of hepatitis B virus after heat treatment at 60°C for 10 hours, *J. Infect. Dis.* 138:242-244.
- *6 The supplier is: VQC-AcroMetrix: Jan Steenstraat 1,NL-1816 CT Alkmaar, The Netherlands. Type 7 is available in lyophilised or liquid format. The catalogue numbers are S2233 (lyophilised format) and S2058 (liquid format).
- *7 National Inst. For Biological Standards & Control (NIBSC), Blabche Lane South Mimms Potters Bar Herts EN6 3QG, UK; Anti-HCV British Working Standard, Product Code: 02/238-004.

Fecha de la revisión: 2019-10-23



Anti-HCV Elisa V 4.0.

fr

Pour la détection qualitative in vitro d'anticorps dirigés contre le virus de l'hépatite C (anti-HCV) dans le sérum ou le plasma humain

KAPG4NAE3 : 96 tests / KAPG4NAE12 : 480 tests

DIAGNOSTIC IN VITRO **IVD**

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgique Tél : +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 90

1) BUT DU DOSAGE

L'anti-HCV Elisa V 4.0 est un kit de diagnostic par essai immuno-enzymatique de quatrième génération pour la détection qualitative in vitro d'anticorps dirigés contre le virus de l'hépatite C (anti-HCV) dans le sérum ou le plasma humain.

2) THÉORIE DE FONCTIONNEMENT/BRÈVE DESCRIPTION DU PRODUIT

L'anti-HCV Elisa V 4.0 applique le « principe du sandwich direct » comme base de l'essai pour détecter les anticorps dirigés contre le virus de l'hépatite C (anti-HCV). Il s'agit d'un kit d'essai immuno-enzymatique de quatrième génération qui utilise des antigènes HCV recombinants (antigènes capsidiques, NS3 et NS5) pour détecter des anticorps dirigés contre le virus de l'hépatite C (anti-HCV) dans le sérum ou le plasma humain.¹⁻³ Ces antigènes, réactifs pour les anticorps prédominants dirigés contre le HCV, constituent l'absorbant antigénique de la phase solide. Lorsque le sérum ou le plasma humain est ajouté aux puits, les antigènes HCV et l'anti-HCV forment des complexes sur les puits si des anti-HCV sont présents dans l'échantillon. Les puits sont rincés pour retirer le matériel non lié. Le conjugué HCV Ag•HRPO dilué est ajouté aux puits et entraîne la formation du complexe (HCV) • (Anti-HCV) • (HCV Ag•HRPO). Après lavage du conjugué non lié, une solution de substrat TMB est ajoutée pour coloration. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité d'anticorps présents dans l'échantillon. Les processus de réaction sont décrits ci-dessous :

A. Échantillon (contenant des Anti-HCV) :


1. Plaque (antigènes HCV) + échantillon (contenant des Anti-HCV) → plaque (antigène HCV)•Anti-HCV
2. Laver pour retirer le matériel non lié.
3. Plaque (antigène HCV)•Anti-HCV + HCV Ag•HRPO → Plaque complexe (antigènes HCV)•Anti-HCV•HCV Ag•HRPO
4. Laver pour retirer le matériel non lié.
5. Plaque complexe (antigènes HCV) •Anti-HCV•HCV Ag•HRPO + solution TMB → couleur bleu clair à bleu
6. Couleur bleu clair à bleu + solution d'arrêt → couleur jaune clair à jaune, mesurée à 450 nm avec une longueur d'onde de référence sélectionnée entre 620 et 690 nm⁴

B. Échantillon (sans anti-HCV humain) :

1. Plaque (antigènes HCV) + échantillon (sans Anti-HCV) → plaque (antigène HCV)
2. Laver pour retirer le matériel non lié.
3. Plaque (antigènes HCV) + HCV Ag•HRPO → plaque (antigènes HCV) ----- Aucun complexe ne se forme
4. Laver pour retirer le matériel non lié.
5. Plaque (antigènes HCV) + solution TMB (incolore) → incolore
6. Incolore + solution d'arrêt → incolore, mesuré à 450 nm avec une longueur d'onde de référence sélectionnée entre 620 et 690 nm⁴

3) DESCRIPTION DU MATÉRIEL FOURNI ET DU SYSTÈME DE CODE DU PRODUIT

- Les articles 1 - 7 du tableau de réactifs suivant doivent être réfrigérés entre +2 et +8 °C. La solution de lavage D (20X) et la solution d'arrêt peuvent être conservées entre +2 et +30 °C.

| ARTICLES | Composants | Description | Qté par 96 tests | Qté par 480 tests | | | |
|----------|---|--|------------------|---|---|------------------|----------------|
| (1) |  Plaque antigènes HCV | Plaque de microtitration tapissée d'antigènes HCV. | 1 plaque | 5 plaques | | | |
| (2) | <table border="1" data-bbox="256 1675 448 1720"> <tr> <td>Ag</td> <td>HRP</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Conjugué HCV Ag•HRPO concentré | Ag | HRP | CONC | Contient de l'HCV Ag•Peroxydase (raifort) dans un tampon avec du sérum bovin. Conservateurs : 0,005 % d'azoture de sodium et 0,05 % de stabilisateur d'enzyme. | 1 flacon, 1,8 ml | 1 flacon, 5 ml |
| Ag | HRP | CONC | | | | | |
| (3) | <table border="1" data-bbox="256 1854 416 1899"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>H</td> </tr> </table> Contrôle Anti-HCV positif | CONTROL | H | Plasma humain inactivé positif pour l'anti-HCV. Conservateur : 0,099 % d'azoture de sodium. | 1 flacon, 2 ml | 1 flacon, 5 ml | |
| CONTROL | H | | | | | | |





| | | | | | | | |
|---------|--|---------|------|--|--|------------------|------------------|
| (4) | <table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>L</td></tr></table> Contrôle Hépatite C négatif | CONTROL | L | Plasma humain normal non réactif pour les anticorps dirigés contre l'HCV. Conservateurs : 0,099 % d'azoture de sodium. | 1 flacon, 3 ml | 1 flacon, 5 ml | |
| CONTROL | L | | | | | | |
| (5) | <table border="1"><tr><td>CONJ</td><td>BUF</td></tr></table> Diluant du conjugué | CONJ | BUF | Tampon PB avec du sérum bovin et du Tween-20. Conservateurs : 0,005 % d'azoture de sodium et 0,05 % de stabilisateur d'enzyme. | 1 flacon, 24 ml | 1 flacon, 100 ml | |
| CONJ | BUF | | | | | | |
| (6) | <table border="1"><tr><td>CHROM</td><td>TMB</td><td>CONC</td></tr></table> Chromogène TMB concentré | CHROM | TMB | CONC | 3, 3', 5, 5'-tétraméthylbenzidine (TMB) dans une base organique. | 1 flacon, 12 ml | 1 flacon, 35 ml |
| CHROM | TMB | CONC | | | | | |
| (7) | <table border="1"><tr><td>SUB</td><td>BUF</td></tr></table> Tampon du substrat | SUB | BUF | Tampon acide acétate avec peroxydase d'hydrogène urée | 1 flacon, 12 ml | 1 flacon, 35 ml | |
| SUB | BUF | | | | | | |
| (8) | <table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Solution de lavage D conc. (20X) | WASH | SOLN | CONC | Tampon phosphate avec Tween-20. | 1 flacon, 110 ml | 1 flacon, 400 ml |
| WASH | SOLN | CONC | | | | | |
| (9) | <table border="1"><tr><td>STOP</td><td>SOLN</td></tr></table> Solution d'arrêt | STOP | SOLN | 1N Solution d'arrêt | 1 flacon, 12 ml | 1 flacon, 50 ml | |
| STOP | SOLN | | | | | | |

• MATÉRIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

| ARTICLES | Composants |
|----------|--|
| (1) | Micropipettes de 50 µl, 100 µl, 200 µl et 1 ml et des embouts sont nécessaires. |
| (2) | Bain-marie à 37 +/- 1° ou incubateur à 37 +/- 1°. |
| (3) | Tubes pour la dilution de l'échantillon. |
| (4) | Matériel de lavage de la plaque. |
| (5) | Lecteur de micropuits ELISA : Longueur d'onde double à 450 nm avec longueur d'onde de référence de 620 à 690 nm ⁴ , bande passante 10 nm. |
| (6) | Eau purifiée : eau distillée ou désionisée. |
| (7) | Un analyseur de microplaque pour EIA totalement automatique est facultatif. L'utilisateur doit valider l'analyseur de microplaque pour EIA automatique par rapport au kit. |
| (8) | Bande adhésive |

4) MODE D'EMPLOI

4.1) Avertissements

- 4.1.1) Ce kit de réactifs est uniquement à usage professionnel.
- 4.1.2)  Ce kit de réactifs est uniquement destiné à un diagnostic *in vitro*.
- 4.1.3) Placer l'ensemble des réactifs du kit et des échantillons à température ambiante (+20 à +30 °C) et mélanger soigneusement avant utilisation.
- 4.1.4) Ne pas utiliser les réactifs après la date d'expiration.
- 4.1.5) Ne pas échanger les réactifs entre différents lots.
- 4.1.6) Ne pas porter la pipette à la bouche.
- 4.1.7) Ne pas fumer ou manger dans les zones où des échantillons ou des réactifs sont manipulés.
- 4.1.8) Tous les composants du kit et les échantillons doivent être considérés comme potentiellement dangereux pour la santé. Ils doivent être utilisés et éliminés conformément aux procédures de sécurité de votre laboratoire. Ces procédures de sécurité incluent probablement le port de gants de protection et éviter de produire des aérosols.
- 4.1.9) Les échantillons potentiellement infectieux et les déversements ou fuites non acides doivent être nettoyés minutieusement à l'aide d'hypochlorite de sodium à 5 % ou traités selon votre procédure de contrôle des risques biologiques potentiels.
- 4.1.10) Avant d'éliminer les échantillons et les kits de réactifs usagés dans les ordures ménagères, ils doivent être traités conformément à la procédure locale de traitement des déchets biologiques potentiellement dangereux ou comme suit :
Les déchets liquides et solides doivent être stérilisés par autoclave à +121 °C pendant au moins 30 minutes.
Les déchets solides peuvent également être incinérés.
Les déchets liquides non acides peuvent être traités à l'aide d'hypochlorite de sodium dilué à une concentration finale de 1 %.
Les déchets liquides acides doivent être neutralisés avant traitement à l'aide d'hypochlorite de sodium tel que mentionné ci-dessus et doivent être stérilisés pendant 30 minutes pour obtenir une désinfection effective.
- 4.1.11)  La solution d'arrêt est un irritant pour la peau, les yeux, les voies respiratoires et les muqueuses. Éviter le contact de la solution d'arrêt avec la peau et les muqueuses. En cas de contact, laver immédiatement et abondamment à l'eau.
En cas d'inhalation, respirer immédiatement de l'air frais et consulter un médecin en cas de douleur.
- 4.1.12)  Le chromogène TMB concentré contient un solvant organique inflammable. Le chromogène TMB concentré contient du sulfoxyde de diméthyle, un irritant pour la peau et les muqueuses.
- 4.1.13)  Bien que tous les échantillons d'origine humaine soient testés exempts d'HBsAg et d'anti-HIV et ont été inactivés à +56 °C pendant une heure, le réactif doit être manipulé comme une substance potentiellement infectieuse. *5

4.2) Risque résiduel

- 4.2.1) Une opération incorrecte peut conduire à des résultats erronés.
- 4.2.2) L'utilisation du kit après la date d'expiration peut donner des résultats erronés.
- 4.2.3) Un laveur inefficace et un lecteur ELISA pourraient affecter le résultat final.
- 4.2.4) Le stockage à une température plus élevée pourrait affecter la durée de vie du produit.
- 4.2.5) Le produit est à usage unique. La réutilisation pourrait entraîner des résultats erronés.
- 4.2.6) Toute modification de la procédure de test peut conduire à des résultats incorrects pouvant entraîner une erreur de diagnostic.

4.3) Collecte et stockage des échantillons

- 4.3.1) Du sérum ou du plasma peut être utilisé avec ce kit de diagnostic. Les échantillons de sang total doivent être séparés au plus tôt pour éviter l'hémolyse. Toute particule (par ex., caillots de fibrine, érythrocytes) contenue dans l'échantillon doit être retirée avant utilisation.
- 4.3.2) Les échantillons doivent être stockés entre +2 et +8 °C et éviter l'inactivation par la chaleur pour minimiser la détérioration. Pour un stockage de longue durée, ils doivent être congelés en dessous de -20 °C. Un stockage en congélateur à dégivrage automatique n'est pas recommandé.
- 4.3.3) Les échantillons congelés doivent être entièrement décongelés et mélangés de façon homogène avant le test.
- 4.3.4) Éviter les procédures de congélation-décongélation multiples.
- 4.3.5) Les sérums partiellement coagulés et les échantillons avec une contamination bactérienne ne doivent pas être utilisés.

4.4) Stockage des réactifs

- 4.4.1) Le kit doit être conservé entre +2 et +8 °C. Ne pas congeler.
- 4.4.2) Les barrettes de la plaque doivent être utilisées dans le mois suivant l'ouverture du sachet en aluminium d'origine. Les barrettes non utilisées doivent être conservées dans le sachet en aluminium qui doit être solidement fermé.
- 4.4.3) Remplacer les réactifs entre +2 et +8 °C immédiatement après utilisation.
- 4.4.4) La solution de lavage concentrée (20X) peut être conservée à température ambiante pour éviter la cristallisation, car les kits sont conservés et expédiés entre +2 et +8 °C. Si des cristaux se sont formés avant utilisation, réchauffer la solution dans un bain-marie à 37 °C jusqu'à dissolution des cristaux.

4.5) Procédure de lavage de la plaque

- 4.5.1) Préparation de la solution de lavage :
Diluer la solution de lavage D concentrée (20X) avec de l'eau distillée ou désionisée pour obtenir une dilution 1:20. Ne pas utiliser d'eau du robinet.
- 4.5.2) Lavage de la plaque :
 - (a) Pour un laveur de plaques avec fonction d'aspiration du trop-plein : 6 cycles avec au moins 0,5 ml de tampon de lavage par puits par cycle.**
 - Ou**
 - (b) Pour un laveur de plaques sans fonction d'aspiration du trop-plein : 8 cycles avec au moins 0,35 ml de tampon de lavage par puits par cycle.**
- 4.5.3) Sécher la plaque en la retournant et en la tapotant fermement sur du papier absorbant. Une trop grande quantité de tampon de lavage résiduel entraînera des résultats erronés.

AVERTISSEMENT

Un lavage insuffisant entraînera des résultats erronés.

4.6) Procédure du test

- 4.6.1) Placer tous les réactifs et échantillons à température ambiante (+20 à +30 °C) avant l'essai. Régler le bain-marie ou l'incubateur à 37±1 °C.
- 4.6.2) Préparation du conjugué dilué
 - 1. Utiliser uniquement un récipient propre pour éviter une contamination.
 - 2. Préparer un conjugué dilué en réalisant une dilution 1:20 du conjugué HCV Ag•HRPO concentré avec le diluant du conjugué, ou selon le tableau de préparation du conjugué ci-dessous. Remuer doucement pour bien mélanger et éviter la mousse.
 - 3. La solution de conjugué dilué en excès doit être jetée après utilisation.

Tableau de préparation du conjugué :

| Nombre de puits utilisés | Volume nécessaire de diluant du conjugué (ml) | Volume nécessaire de conjugué HCV Ag• HRPO conc. (µl) |
|--------------------------|---|---|
| 8 | 1 | 50 |
| 16 | 2 | 100 |
| 24 | 3 | 150 |
| 32 | 4 | 200 |
| 40 | 5 | 250 |
| 48 | 6 | 300 |
| 56 | 7 | 350 |
| 64 | 8 | 400 |
| 72 - 80 | 9 | 450 |
| 81 - 96 | 10 | 500 |

- 4.6.3) Laisser un puits pour le blanc.
Ne pas ajouter d'échantillon ou de diluant de l'échantillon au puits pour le blanc.
- 4.6.4) Préparer le nombre nécessaire de puits, y compris 1 puits pour le blanc, 3 puits pour le contrôle négatif, 2 puits pour le contrôle positif et 1 puits pour chaque échantillon.
- 4.6.5) Ajout de l'échantillon :
4.5.5.1) Ajouter 100 µl de contrôle positif, contrôle négatif et échantillon à chaque puits approprié de la plaque d'antigènes HCV.
4.5.5.2) Bien mélanger en tapotant la plaque.
REMARQUE : Utiliser un nouvel embout de pipette après chaque prélèvement pour éviter la contamination croisée.
- 4.6.6) Sceller la plaque avec une bande adhésive.
- 4.5.7) Incuber la plaque dans un bain-marie ou un incubateur à circulation d'air à 37 ± 1 °C pendant 60 minutes.
REMARQUE : Ne pas empiler les plaques.
- 4.6.8) À la fin de la période d'incubation, retirer soigneusement et jeter la bande adhésive.
- 4.6.9) Laver la plaque selon le paragraphe 4.4) Procédure de lavage de la plaque.
- 4.6.10) Ajouter 100 µl de conjugué dilué à chaque puits sauf au blanc.
- 4.6.11) Sceller la plaque avec une bande adhésive.
- 4.6.12) Incuber la plaque dans un bain-marie ou un incubateur à circulation à 37 ± 1 °C pendant 30 minutes.
- 4.6.13) Répéter les étapes 4.5.8) et 4.5.9).
- 4.6.14) Sélectionner l'une des deux méthodes suivantes pour la coloration :
A. Mélanger immédiatement avant utilisation des volumes identiques de chromogène TMB concentré et de tampon du substrat dans un récipient propre. Ajouter 100 µl de la solution de mélange à chaque puits, y compris au blanc.
B. Ajouter tout d'abord 50 µl de chromogène TMB concentré, puis ajouter 50 µl de tampon du substrat à chaque puits, y compris au blanc. Bien mélanger avec précaution.
REMARQUE : Le chromogène TMB concentré doit être incolore à bleu clair ; sinon, il faut le jeter. Le mélange de chromogène TMB concentré et de tampon du substrat doit être utilisé dans les 30 minutes après le mélange. Le mélange doit être tenu à l'écart de toute lumière intense.
- 4.6.15) Sceller la plaque à l'aide d'une bande adhésive et incuber à 37 ± 1 °C pendant 15 minutes.
- 4.6.16) Stopper la réaction en ajoutant 100 µl de solution d'arrêt à chaque puits, y compris au blanc.
- 4.6.17) Déterminer l'absorbance des contrôles et des échantillons dans les 15 minutes, mesurée à 450 nm avec une longueur d'onde de référence sélectionnée entre 620 et 690 nm⁴.
Utiliser le puits blanc pour définir le zéro du spectrophotomètre.
REMARQUE : La couleur du blanc doit être incolore à jaune clair ; sinon, les résultats du test sont invalides. Blanc du substrat : la valeur d'absorbance doit être inférieure à une DO de 0,100.

4.7) Calcul des données testées

4.7.1) Calcul du NCx (absorbance moyenne du contrôle négatif).

Exemple :

| N° d'échantillon | Absorbance |
|------------------|------------|
| 1 | 0,045 |
| 2 | 0,060 |
| 3 | 0,051 |

$$NCx = (0,045+0,060+0,051) / 3 = 0,052$$

Le NCx doit être $\leq 0,200$, sinon le test n'est pas valide.

4.7.2) Calcul du PCx (absorbance moyenne du contrôle positif).

Exemple :

| N° d'échantillon | Absorbance |
|------------------|------------|
| 1 | 1,510 |
| 2 | 1,826 |

$$PCx = (1,510 + 1,826) / 2 = 1,668$$

Le PCx doit être $\geq 0,600$, sinon le test n'est pas valide.

4.7.3) Calcul de la **valeur P - N**

$$P-N = PCx - NCx$$

Exemple :

$$P - N = 1,668 - 0,051 = 1,617$$

La valeur P - N doit être $\geq 0,400$, sinon le test n'est pas valide.

4.7.4) Calcul de la **valeur du seuil de positivité**

$$\text{Valeur du seuil de positivité} = NCx + 0,100$$

Exemple :

$$\text{Valeur du seuil de positivité} = 0,053+0,100 = 0,153$$

4.7.5) Calculer l'indice du seuil de positivité des échantillons

$$\text{Indice du seuil de positivité} = \text{Valeur DO de l'échantillon} / \text{Valeur du seuil de positivité}$$

Exemple :

La valeur de l'échantillon est 0,596

$$\text{Indice du seuil de positivité} = 0,596/0,153 = 3,895$$

4.7.6) Zone grise : Indice du seuil de positivité = 1,000 ~ 1,500

4.8) Contrôle qualité du run de tests

4.8.1) **Le NCx doit être $\leq 0,200$, sinon le test n'est pas valide.**

4.8.2) **Le PCx doit être $\geq 0,600$, sinon le test n'est pas valide.**

4.8.3) **La valeur P - N doit être $\geq 0,400$, sinon le test n'est pas valide.**

REMARQUE : Contrôle négatif: la valeur d'absorbance doit être inférieure ou égale à 0,200 après avoir soustrait le blanc.

4.9) Interprétation des résultats

4.9.1) Les échantillons avec **INDICE DU SEUIL DE POSITIVITÉ** $< 1,000$ sont considérés comme **NON RÉACTIFS** par les critères de l'Anti-HCV Elisa V 4.0 de DIAsource.

4.9.2) Les échantillons avec un **INDICE DU SEUIL DE POSITIVITÉ** $\geq 1,000$ sont considérés comme initialement **RÉACTIFS**. Ils doivent être **TESTES A NOUVEAU** en doublon.

Si les deux **INDICES DU SEUIL DE POSITIVITÉ** du doublon sont **SUPÉRIEURS** à 1,500, l'échantillon est considéré comme **RÉACTIF** réitéré pour les anti-HCV par les critères de l'Anti-HCV Elisa V 4.0 de DIAsource ImmunoAssays SA.

Les échantillons réactifs réitérés de l'Anti-HCV Elisa V 4.0 doivent être encore testés par des tests supplémentaires plus spécifiques.

4.9.3) Les échantillons initialement réactifs, dont les **INDICES DU SEUIL DE POSITIVITÉ** du nouveau test en double sont **INFÉRIEURS** à **1,000**, seront considérés comme **NON RÉACTIFS** pour les anti-HCV.

4.9.4) Si l'un des deux **INDICES DU SEUIL DE POSITIVITÉ** du test en doublon est **SUPÉRIEUR** à **1,000**, mais **INFÉRIEUR** à **1,500**, l'échantillon peut être interprété comme **DISCUTABLE** et cette personne doit être surveillée par des échantillons de suivi ou des tests supplémentaires plus spécifiques doivent être effectués.

4.9.5) Si l'un des **INDICES DU SEUIL DE POSITIVITÉ** du doublon est **SUPÉRIEUR** à **1,500** et que l'autre est **INFÉRIEUR** à **1,000**, cela indique une **erreur expérimentale inhabituelle**. Le test doit être refait.

4.10) Résolution des problèmes

Si le résultat ne peut être reproduit, réaliser une procédure de contrôle préliminaire en vérifiant les possibilités ci-dessous :

- 4.10.1) Procédure de lavage de la plaque inappropriée.
- 4.10.2) Contamination avec un échantillon positif.
- 4.10.3) Volume incorrect d'échantillon, conjugué ou substrat.
- 4.10.4) Contamination du bord du puits avec un conjugué.
- 4.10.5) Échantillon inapproprié, par exemple sérum ou plasma hémolysé, échantillon contenant des sédiments et échantillon insuffisamment mélangé avant utilisation.
- 4.10.6) Durée ou température d'incubation incorrecte.
- 4.10.7) Tête et aiguilles d'aspiration/distribution du laveur obstruées ou partiellement obstruées.
- 4.10.8) Aspiration insuffisante.

4.11) Limites et interférences

- 4.11.1) Ce kit de réactifs doit être uniquement utilisé pour du sérum ou du plasma humain non mis en pool.
- 4.11.2) Ce kit de réactifs n'a pas été validé pour une utilisation avec des échantillons prélevés sur des cadavres.
- 4.11.3) Les échantillons présentant un très faible taux d'anti-HCV peuvent ne pas être continuellement positifs. Dans ce cas, il est recommandé de tester des échantillons de suivi.
- 4.11.4) Un résultat anti-HCV négatif n'exclut pas la possibilité d'une infection par HCV.
- 4.11.5) Des résultats faux positifs non réitérables peuvent se produire en raison d'une liaison non spécifique de l'échantillon et du conjugué sur la paroi des puits.
- 4.11.6) Substances pouvant provoquer des interférences : il n'existe aucune influence significative sur l'Anti-HCV Elisa V 4.0.

4.12) Conditions de stockage et stabilité

| Kit/composants | Température de stockage | État | Stabilité |
|---|-------------------------|-----------------|-----------|
| KIT Anti-HCV Elisa V 4.0 | +2 à +8 °C | Original | 18 mois |
| | | Après ouverture | 1 mois |
| Contrôle Anti-HCV positif | +2 à +8 °C | Original | 18 mois |
| | | Après ouverture | 1 mois |
| Contrôle Hépatite C négatif | +2 à +8 °C | Original | 18 mois |
| | | Après ouverture | 1 mois |
| Plaque d'antigènes HCV | +2 à +8 °C | Original | 18 mois |
| | | Après ouverture | 1 mois |
| Solution du conjugué HCV antigen•HRPO concentré | +2 à +8 °C | Original | 18 mois |
| | | Après ouverture | 1 mois |
| Solution du conjugué antigène HCV•HRPO conc. | Temp. ambiante | Diluée | 6 heures |
| | +2 à +8 °C | Diluée | 2 jours |
| Diluant du conjugué | +2 à +8 °C | Original | 18 mois |
| | | Après ouverture | 1 mois |
| Solution de lavage D concentrée (20X) | Temp. ambiante | Original | 24 mois |
| | | Après ouverture | 1 mois |
| Solution de lavage diluée 20X | Temp. ambiante | Diluée | 2 jours |
| | +2 à +8 °C | Diluée | 1 semaine |
| Chromogène TMB concentré | +2 à +8 °C | Original | 24 mois |
| | | Après ouverture | 1 mois |
| Tampon du substrat | +2 à +8 °C | Original | 24 mois |
| | | Après ouverture | 1 mois |
| Mélange de solution du substrat TMB | Temp. ambiante | Mélange | 6 heures |
| Solution d'arrêt | Temp. ambiante | Original | 24 mois |
| | | Après ouverture | 1 mois |

4.13) Performance

4.13.1) Spécificité analytique

Substances pouvant provoquer des interférences : il n'existe aucune influence significative sur l'Anti-HCV Elisa V 4.0.

| Substances pouvant provoquer des interférences | n de tests | n de réactifs | n de non réactifs |
|---|--|---------------|-------------------|
| Sérum avec des substances provoquant des interférences en proportions fixes (Triglycérides, hémoglobine, bilirubine, IgG et IgM monoclonales et facteur rhumatoïde) | 50 tests | 0 | 50 |
| Panels d'inhibition (EDTA, hémoglobine, triglycéride, bilirubine et héparine) | 14 échantillons négatifs 14 échantillons positifs | 0 14 | 14 0 |
| Panels d'anticoagulants (sérum, plasma EDTA, plasma hépariné et plasma citraté) | 25 échantillons négatifs 25 échantillons positifs | 0 25 | 25 0 |
| Total | 128 échantillons testés | 39 | 89 |

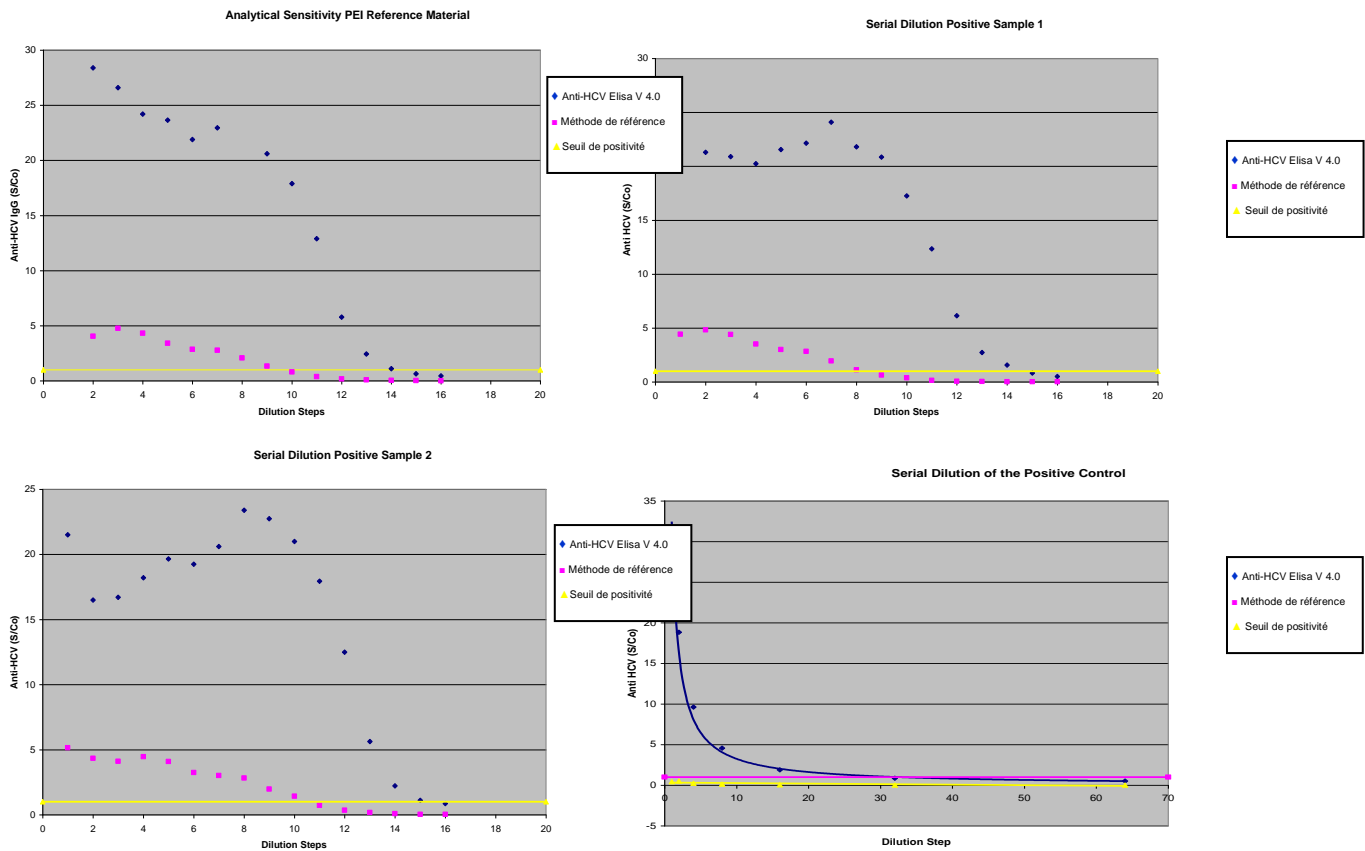
4.13.2) Spécificité clinique

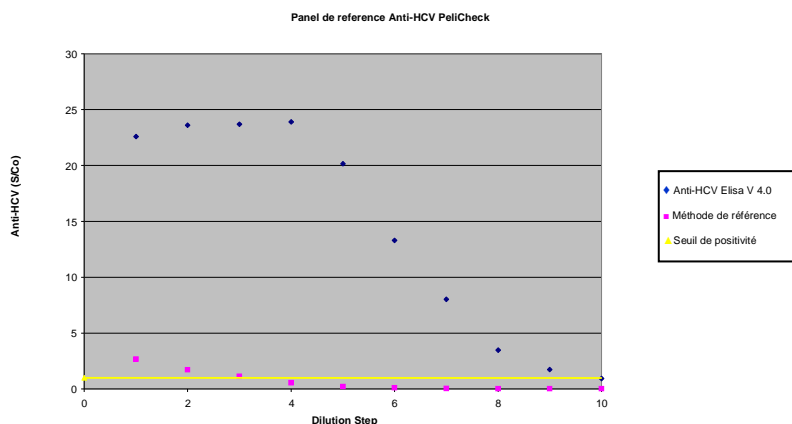
Spécificité clinique = 5356/5369 = 99,8 %

| Substances pouvant provoquer des interférences | n de tests | n de réactifs | n de non réactifs | Spécificité |
|---|------------|---------------|-------------------|-------------|
| Donneurs de sang | 5 169 | 12 | 5 157 | 99,77 % |
| Échantillons cliniques / hospitaliers | 200 | 1 | 199 | 99,5 % |
| Échantillons sériques/plasmatisques avec réaction croisée potentielle | 100 | 0 | 100 | 100 % |
| Total | 5 369 | 13 | 5 356 | 99,8 % |

4.13.3) Sensibilité analytique

La sensibilité analytique de l'essai Anti-HCV Elisa V 4.0 est supérieure au test de référence.



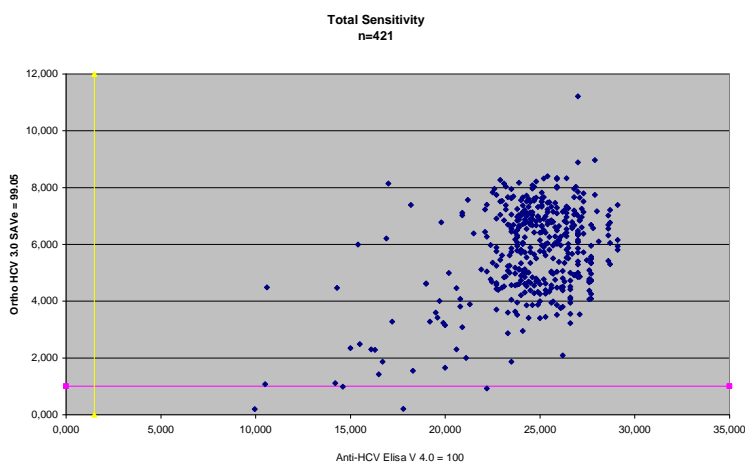


4.13.4) Sensibilité clinique

1. Personnes infectées par le HCV :

La sensibilité diagnostique de l'Anti-HCV Elisa V 4.0 de DIAsource ImmunoAssays SA était de 100 %.

421 des 421 échantillons positifs incluant 20 échantillons par génotype pour les génotypes 1a – 4a et 5 échantillons pour les génotypes 6 ont été testés et confirmés réactifs pour les anticorps dirigés contre le HCV.



2. Panels commerciaux de séroconversion :

L'essai Anti-HCV Elisa V 4.0 a montré une sensibilité accrue de la séroconversion comparé à la méthode de référence choisie : l'anti-HCV ELISA marqué CE.

Le nombre total d'échantillons testés parmi les 22 panels de séroconversion s'élevait à 198. Parmi eux, soixante-trois (63) échantillons ont été testés réactifs avec l'essai Anti-HCV Elisa V 4.0, tandis que seuls 44 de ces échantillons ont été testés réactifs avec la méthode de référence.

4.13.5) Précision

1. Reproductibilité intra-essai

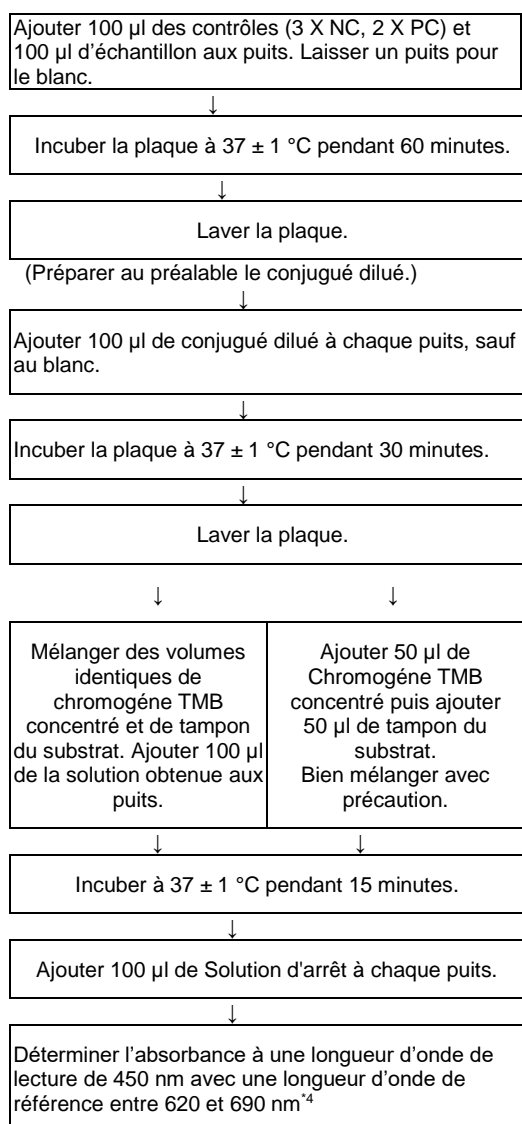
| INDICE DU SEUIL | Sérum positif 1 | | Sérum positif 2 | | Contrôle positif | |
|-----------------|-----------------|-------------|-----------------|-------------|------------------|-------------|
| | Moyenne | CV (%) | Moyenne | CV (%) | Moyenne | CV (%) |
| Jour 1 | 4,49 | 7,22 | 9,01 | 5,94 | 21,79 | 4,91 |
| Jour 2 | 4,16 | 13,06 | 8,54 | 9,41 | 21,44 | 4,23 |
| Jour 3 | 5,07 | 5,24 | 10,64 | 9,27 | 21,70 | 3,08 |
| Moyenne | 4,57 | 8,51 | 9,40 | 8,21 | 21,64 | 4,07 |
| | | | | | | |

2. Imprécision totale

| Lot C68332PT | | CUTOFF INDEX | | | |
|--------------|----------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Run-No | Run Date | NC | PS1 | PS2 | PC |
| 1 | 15/7/08 | 0.31 | 5.03 | 10.70 | 22.50 |
| 2 | 18/7/08 | 0.30 | 4.52 | 7.83 | 23.56 |
| 3 | 18/7/08 | 0.30 | 4.83 | 9.58 | 21.16 |
| 4 | 21/7/08 | 0.29 | 5.72 | 10.40 | 21.38 |
| 5 | 22/7/08 | 0.33 | 4.91 | 8.82 | 20.72 |
| 6 | 22/7/08 | 0.33 | 4.53 | 10.10 | 17.25 |
| 7 | 23/7/08 | 0.27 | 3.79 | 6.39 | 16.86 |
| 8 | 23/7/08 | 0.34 | 4.21 | 8.08 | 18.42 |
| 9 | 24/7/08 | 0.29 | 5.03 | 7.96 | 20.59 |
| 10 | 24/7/08 | 0.35 | 4.59 | 8.48 | 20.59 |
| MEAN | | 0.31 | 4.73 | 8.83 | 20.30 |
| SD | | 0.03 | 0.52 | 1.36 | 2.17 |
| CV | | 8.34 | 11.05 | 15.34 | 10.69 |

| Lot C68333PT | | CUTOFF INDEX | | | |
|--------------|----------|--------------|--------------|-------------|--------------|
| Run-No | Run Date | NC | PS1 | PS2 | PC |
| 1 | 19/8/08 | 0,33 | 5,63 | 10,05 | 20,08 |
| 2 | 19/8/08 | 0,25 | 4,96 | 10,50 | 18,10 |
| 3 | 20/8/08 | 0,29 | 5,62 | 10,50 | 21,48 |
| 4 | 21/8/08 | 0,34 | 4,05 | 9,49 | 20,05 |
| 5 | 21/8/08 | 0,33 | 5,31 | 10,20 | 19,36 |
| 6 | 22/8/08 | 0,31 | 5,34 | 8,97 | 19,08 |
| 7 | 22/8/08 | 0,31 | 5,39 | 9,16 | 19,72 |
| 8 | 25/8/08 | 0,25 | 4,31 | 8,64 | 18,79 |
| 9 | 25/8/08 | 0,30 | 5,74 | 10,60 | 21,10 |
| 10 | 26/8/08 | 0,27 | 6,03 | 11,30 | 20,83 |
| MEAN | | 0,30 | 5,15 | 9,94 | 19,86 |
| SD | | 0,03 | 0,63 | 0,85 | 1,07 |
| CV | | 10,82 | 12,22 | 8,51 | 5,39 |

4.14) Représentation graphique de la procédure de test



5) BIBLIOGRAPHIE

- *1 Abe K, Inchauspe C, Shikate T, and Prince AM. (1992) Three different patterns of hepatitis C virus infection on chimpanzees. *Hepatology*, 15:690.
- *2 Claets H, Volckaerts A, De Beenhouwer H, Vermylen C. (1992) Association of hepatitis C virus carrier state with the occurrence of hepatitis C virus core antibodies. *J. Med. Virol.* 36:259-264.
- *3 Beach MJ, et al. (1992) Temporal relationship of hepatitis C virus RNA and antibody responses following experimental infection of chimpanzee. *J Med. Virol.* 36:226-237.
- *4 La longueur d'onde de référence du spectromètre peut se situer entre 620 et 690 nm. Cependant, l'utilisateur doit, avant utilisation, valider le spectromètre par rapport au kit utilisé.
- *5 Incomplete inactivation of hepatitis B virus after heat treatment at 60°C for 10 hours, *J. Infect. Dis.* 138:242-244.
- *6 The supplier is: VQC-AcroMetrix: Jan Steenstraat 1,NL-1816 CT Alkmaar, The Netherlands. Type 7 is available in lyophilised or liquid format. The catalogue numbers are S2233 (lyophilised format) and S2058 (liquid format).
- *7 National Inst. For Biological Standards & Control (NIBSC), Blabche Lane South Mimms Potters Bar Herts EN6 3QG, UK; Anti-HCV British Working Standard, Product Code: 02/238-004.

Date de révision : 2019-10-23