



HIV BLOT 2.2 DOSAGGIO WESTERN BLOT

CE
0123

DATA DI REVISIONE: 03/07
MAE 0011-ITA-1

Nota: modifiche evidenziate

REF (18 kit per test) : 11030-018
(36 kit per test) : 11030-036

NOME E USO PREVISTO

Il kit **HIV BLOT 2.2 di MP Diagnostics (MPD)** è un dosaggio qualitativo immunoenzimatico per il rilevamento *in vitro* degli anticorpi del virus di immunodeficienza umana tipo 1 (HIV-1) e tipo 2 (HIV-2) nel siero o nel plasma umano. È indicato come test integrativo più specifico da condurre su campioni di siero o plasma umano rilevati ripetutamente reattivi mediante procedure di screening come i test immunoenzimatici ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assays).

INTRODUZIONE

Sono attualmente disponibili numerosi test di screening per la determinazione degli anticorpi anti HIV-1 e HIV-2, agenti eziologici della Sindrome di Immunodeficienza Acquisita (AIDS). Tali test possono essere estremamente sensibili, ma potenzialmente meno specifici, dando origine a interpretazioni falsamente positive. Sarà quindi necessario effettuare ulteriori test ad elevata specificità per confermare la presenza di anticorpi anti HIV-1 e/o HIV-2.

Il kit **HIV BLOT 2.2 prodotto dalla MP Diagnostics** rappresenta un test supplementare più specifico da effettuare su campioni di siero o plasma umani risultati ripetutamente reattivi al test ELISA. Gli antigeni virali specifici anti HIV-1, posti separatamente sulle strisce mediante procedure di elettroforesi ed elettrotransblot e combinati col peptide sintetico HIV-2-specifico sulla stessa striscia, consentono una maggiore delineazione delle risposte anticorpi alla proteine virali specifiche. Ciascuna striscia comprende anche un controllo interno aggiuntivo del campione atto a minimizzare il rischio di false negatività dovute ad errori operativi, nonché a garantirne l'aggiunta di campioni.

DESCRIZIONE DEI SIMBOLI UTILIZZATI

	Utilizzare entro <i>Sinonimo:</i> Data di scadenza		Dispositivo medico diagnostico in vitro
	Codice partita <i>Sinonimi:</i> Numero di lotto Numero di partita		Numero di catalogo
	Limitazione di temperatura		Attenzione. Vedere le Istruzioni per l'uso
	Produttore		Rappresentante autorizzato per la Comunità Europea
	Contiene il necessario per l'esecuzione di <= > analisi		Vedere le Istruzioni per l'uso
	Non riutilizzare		

PRINCIPI CHIMICI E BIOLOGICI DEL METODO
--

Alle strisce di nitrocellulosa vengono legate singole proteine antigeniche, derivate da HIV-1 inattivato e parzialmente purificato mediante blotting elettroforetico, nonché un peptide sintetico HIV-2-specifico. Le singole strisce di nitrocellulosa vengono incubate con siero o plasma diluiti e con i controlli. Se presenti nel campione, gli anticorpi specifici anti HIV-1 e HIV-2 si legheranno alle proteine HIV-1 e al peptide HIV-2 sulle strisce. Queste ultime sono quindi sottoposte a lavaggio al fine di rimuoverle le sostanze non legate. È possibile visualizzare gli anticorpi che si legano specificamente alle proteine HIV mediante una serie di reazioni che utilizzano immunoglobuline di capra anti-IgG umane coniugate con fosfatasi alcalina e substrato BCIP/NBT. Grazie al suo elevato grado di sensibilità, questo metodo consente la determinazione di quantità minime di anticorpi specifici anti HIV presenti nel siero o nel plasma umani.

COMPONENTI DEL KIT	
Descrizione dei componenti	Quantità fornita
ANTIGEN STRIPS	Disponibili in confezioni da 18 o 36 strisce
STRISCHE DI NITROCELLULOSA	Contenenti lisato virale HIV-1, peptide di superficie HIV-2-specifico e una banda per il controllo dell'aggiunta del siero. Conservare all'asciutto e al riparo dalla luce.

DESCRIZIONE DEI SIMBOLI UTILIZZATI

DESCRIZIONE DEI SIMBOLI UTILIZZATI

- SOLUZIONE DI LAVORO DEL CONIUGATO**

Nota: Preparare la soluzione in un recipiente o contenitore graduato di polipropilene.

 - La **SOLUZIONE DI LAVORO DEL CONIUGATO** deve essere **preparata ogni volta prima dell'uso**.
 - Preparare la **SOLUZIONE DI LAVORO DEL CONIUGATO** diluendo il **CONIUGATO 1:1000** nel **TAMPONE DI BLOTTING**, ad esempio, 5 µl di **CONIUGATO** in 5 ml di **TAMPONE DI BLOTTING**.

- SOLUZIONE SUBSTRATO (pronta per l'uso)**
 - Dispensare il volume richiesto direttamente dal flacone. Utilizzare una pipetta pulita. Dopo l'uso chiudere accuratamente.

PROCEDURA RAPIDA DEL TEST

Nota: a) Gli utenti possono usare l'analisi veloce o di notte per fare funzionare le prove. Le fasce del HIV sono diventate e più fasce possono comparire con l'analisi di notte, ma le prestazioni generali delle due analisi sono la stessa.

- Aspirare tutte le sostanze chimiche e i reagenti residui in un contenitore con ipoclorito di sodio.
- Ogni incubazione deve essere effettuata sull'agitatore oscillante.

Attenzione:

Alcuni campioni provocano la formazione di macchie scure sulla striscia quando vengono aggiunti. Per evitare questo inconveniente, procedere come segue:

- Aggiungere il campione soltanto dopo aver aggiunto il **TAMPONE DI BLOTTING**.
- Inclinare leggermente il vassoio sollevandolo dall'estremità superiore o inferiore. Il tampone di blotting dovrà fluire verso l'estremità inferiore del vassoio. Aggiungere il campione nel punto di raccolta del tampone di blotting. Una volta aggiunti tutti i campioni, riportare il vassoio in posizione orizzontale. Accertarsi che le strisce rimangano costantemente umide durante l'operazione.
- In alternativa, se non si desidera inclinare il vassoio, i campioni possono essere aggiunti sull'estremità superiore o inferiore del pozzetto. In questo modo, anche in caso di comparsa di macchie scure, la lettura dei risultati della strisce non viene influenzata

Procedura:	
1. Aggiungere 2 ml di SOLUZIONE DI LAVAGGIO DILUITA a ciascun pozzetto.	2 ml
2. Prendere con cautela il numero di STRISCE occorrente dalla confezione usando le pinzette e sistemarle, con il lato numerato rivolto verso l'alto, una per pozzetto. Utilizzare strisce per i controlli reattivi forti, reattivi deboli e non reattivi.	
3. Incubare le strisce da 1 a 2 minuti , a temperatura ambiente (25 ± 3°C), su una piattaforma oscillante (alla velocità di 12 - 16 cicli al minuto). Eliminare la soluzione tampone mediante aspirazione. <p>(Nota: Non lasci che le strisce asciughino il guasto può provocare i contrassegni acquosi sulle strisce sviluppate per alcuni esemplare.)</p>	2 minuti

CONTROLLO NON REATTIVO	1 provetta (80 µl)
-------------------------------	--------------------

Siero umano normale inattivato non reattivo per antigene di superficie dell'epatite B (HBsAg), anticorpi HIV-1/2 e anti-HCV. Contiene sodio azide e thimerosal come conservanti.

CONTROLLO REATTIVITÀ FORTE	1 provetta (80 µl)
-----------------------------------	--------------------

Siero umano inattivato con un alto titolo di anticorpi HIV-1 e HIV-2 e non reattivo per HBsAg e anti-HCV Contiene sodio azide e thimerosal come conservanti.

CONTROLLO REATTIVO DEBOLE	1 provetta (80 µl)
----------------------------------	--------------------

SOLUZIONE TAMPONE CONCENTRATA (10x)	1 flacone (20 ml)
--	-------------------

Tampone tris contenente siero di capra inattivato tramite calore. Contiene thimerosal come conservante.

TAMPONE DI LAVAGGIO CONCENTRATO (20x)	1 flacone (70 ml)
--	-------------------

Soluzione tris con Tween-20. Contiene thimerosal come conservante

CONIUGATO	1 provetta (120 µl)
------------------	---------------------

IgG anti-umane di capra coniugate con fosfatasi alcalina. Contiene sodio azide come conservante.

SUBSTRATO	1 flacone (100 ml)
------------------	--------------------

Soluzione di 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (BCIP) e nitroblu di tetrazolio (NBT).

POLVERE PER BLOT	10 confezioni (1 g ciascuna)
-------------------------	------------------------------

Vaschette per incubazione a 9 settori.

Manuale d'istruzioni	1 copia
----------------------	---------

Pinzette	1 paio
----------	--------

Nota: Il volume di reagenti fornito è sufficiente per 4 sedute.

3. Aggiungere 2 ml di SOLUZIONE DI BLOTTING a ciascun pozzetto.	2 ml
5. Aggiungere 20 µl di siero del paziente o di controllo, a seconda del pozzetto. Evitare rigorosamente di aggiungere i campioni direttamente sulle strisce.	20 µl
6. Coprire la vaschetta con il relativo coperchio e incubare per 1 ora a temperatura ambiente (25 ± 3°C) sull'agitatore oscillante.	60 minuti

- Scoprire con cautela la vaschetta per evitare la fuoriuscita del materiale o il rimescolamento dei campioni. Inclinare la vaschetta per aspirare la miscela dai pozzetti. Tra un campione e l'altro, cambiare il beccuccio dell'aspiratore per evitare una contaminazione incrociata.
- Lavare ogni striscia per 3 volte con 2 ml di **TAMPONE DI LAVAGGIO DILUITO** lasciandola a bagno per **5 minuti** sull'agitatore oscillante tra ogni lavaggio.
- Aggiungere 2 ml di **SOLUZIONE DI CONIUGATO** a ogni pozzetto.
- Coprire la vaschetta e incubare per **1 ora** a temperatura ambiente (25 ± 3°C) sull'agitatore oscillante.
- Aspirare il **CONIUGATO** dai pozzetti. Eseguire un lavaggio come indicato al punto 8.
- Aggiungere 2 ml di **SOLUZIONE DI SUBSTRATO** a ogni pozzetto.
- Coprire la vaschetta e incubare per **15 minuti** sull'agitatore oscillante. (Nota: La reazione può essere interrotta prima di 15 minuti se tutte le fasce sono visibili.)
- Aspirare il **SUBSTRATO** e sciacquare almeno tre volte le strisce con acqua per reagenti per arrestare la reazione. (In caso di lavaggio insufficiente, a questo punto può apparire uno sfondo scuro).
- Prendere delicatamente le strisce con le pinzette e appoggiarle su fazzoletti di carta. Coprire con altri fazzoletti e asciugare. In alternativa, lasciare asciugare le strisce nei pozzetti del vassoio.
- Sistemare le strisce su carta da lavoro (carta bianca non assorbente). Non applicare nastro adesivo sulle bande che si sono formate. Osservare le bande (vedere Interpretazione dei risultati) e classificare i risultati. Conservare le strisce al buio.

PROCEDURA ALTERNATIVA - TEST "OVERNIGHT"

Procedimento:

- Aggiungere 2 ml di SOLUZIONE DI LAVAGGIO DILUITA a ciascun pozzetto.
- Prendere con cautela il numero di STRISCE occorrenti dalla confezione usando le pinzette e sistemarle, con il lato numerato rivolto verso l'alto, una per pozzetto. Disporre anche le strisce per i controlli reattivi forti, reattivi deboli e non reattivi.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

- Solo per uso diagnostico *in vitro*.
- Solo per uso professionale.
- Per informazioni sui componenti potenzialmente pericolosi leggere le etichette apposte sui prodotti.

NORME DI SICUREZZA

ATTENZIONE: Questo kit contiene sostanze di origine umana. Nessun metodo di prova è in grado di garantire con assoluta certezza che i prodotti derivati dal sangue umano non trasmettano infezioni.

MANEGGIARE TUTTI I CAMPIONI D'ANALISI, NONCHÉ I CONTROLLI REATTIVI FORTI, REATTIVI DEBOLI E NON REATTIVI, COME AGENTI POTENZIALMENTE INFETTIVI. Si consiglia di maneggiare i componenti e i campioni di analisi nel rispetto delle pratiche operative di laboratorio. Lo smaltimento del materiale dovrà essere effettuato in conformità alle procedure di sicurezza stabilite.

Il *controllo reattivo forte*, il *controllo reattivo debole* e il *controllo non reattivo* contengono thimerosal e sodio azide, la soluzione tampone concentrata e il tampone di lavaggio contengono thimerosal, mentre il coniugato contiene sodio azide. Il sodio azide può reagire con il rame o il piombo utilizzati in alcuni impianti idraulici con la conseguente formazione di sali esplosivi. Sebbene le quantità utilizzate in questo kit siano limitate, si raccomanda comunque di smaltire sempre i materiali contenenti azide in abbondante acqua corrente onde evitare l'accumulo di metallo-azide nell'impianto idraulico. Qui di seguito sono elencate le frasi relative ai rischi (R).

R22 Nocivo per ingestione.

Il *substrato* contiene 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato e nitroblu di tetrazolio, classificato secondo le direttive della Comunità Economica Europea (CEE) come nocivo (Xn). Qui di seguito sono elencate le frasi relative ai rischi (R).

R20/21/22 Nocivo per inalazione, contatto con la pelle ed ingestione.

- Evitare la contaminazione microbica dei reagenti durante l'apertura delle provette o dei flaconi originali e durante il prelievo dei materiali.
- Non pipettare con la bocca.
- Maneggiare i campioni di analisi, le strisce di nitrocellulosa, i controlli reattivi, reattivi deboli e non reattivi come agenti potenzialmente infettivi.
- Indossare indumenti da laboratorio e guanti monouso durante l'esecuzione delle analisi. I guanti devono essere gettati negli appositi contenitori a rischio biologico. Lavarsi accuratamente le mani al termine dell'operazione.
- Si raccomanda di eseguire il test in uno spazio apposito per procedure con rischio di contaminazione biologica.
- Evitare il contatto dei materiali con cibi e bevande.
- In caso di contatto con gli occhi sciacquare immediatamente con abbondante acqua e richiedere assistenza medica.
- In caso in ingestione o di contatto dei materiali contaminati con ferite aperte o altre lacerazioni cutanee, consultare immediatamente il medico.

- Asciugare immediatamente ogni versamento di materiale potenzialmente infettivo con carta assorbente e tamponare l'area contaminata con una soluzione di ipoclorito di sodio all'1% prima di riprendere il lavoro. In presenza di versamenti contenenti sostanze acide, asciugare l'area con carta assorbente prima di utilizzare l'ipoclorito di sodio. Tutto il materiale usato (inclusi i guanti monouso) dovrà essere smaltito come materiale a rischio biologico. Non autoclavare il materiale contenente ipoclorito di sodio.
- Prima dell'eliminazione, sterilizzare in autoclave tutto il materiale utilizzato e contaminato a 121°C a 15 p.s.i. per 30 minuti. In alternativa, decontaminare i materiali in una soluzione di ipoclorito di sodio al 5% per 30-60 minuti prima di gettarli negli appositi contenitori a rischio biologico.
- Decontaminare tutti i reagenti e le sostanze chimiche impiegate in una soluzione di ipoclorito di sodio con una concentrazione finale pari almeno all'1%. Lasciare agire per 30 minuti per garantire una efficace decontaminazione.
- Si sconsiglia il riutilizzo delle vaschette per incubazione.

PRECAUZIONI DI IMPIEGO

- Per ottenere prestazioni ottimali dal test occorre **SEGUIRE RIGOROSAMENTE** le procedure illustrate nel presente Manuale di istruzioni. Qualsiasi deviazione dalla procedura può provocare risultati erronei.
- NON MODIFICARE O SCAMBIARE REAGENTI DI KIT APPARTENENTI A LOTTI DIVERSI.** I controlli, il coniugato e le strisce di Western Blot sono stati abbinati per ottenere prestazioni ottimali. Utilizzare unicamente i reagenti forniti con il kit.
- Non utilizzare i componenti del kit dopo la data di scadenza riportata sulla confezione.
- Evitare la contaminazione microbica dei reagenti nell'aprire le provette o i flaconi originali e prelevare i materiali poiché ne potrebbero derivare risultati erronei nonché la prematura riduzione della durata di conservazione del prodotto. Utilizzare tecniche asettiche, incluse pipette o puntali di pipette monouso, per l'aspirazione dei materiali dai flaconi.
- I controlli del kit devono essere analizzati contemporaneamente ai campioni dei pazienti per ogni ciclo di analis.
- Per evitare una contaminazione incrociata, cambiare il puntale della pipetta tra un campione e l'altro.
- Per ottenere migliori risultati, dispensare tutti i reagenti a freddo e riportarli ad una temperatura di 2°C - 8°C non appena possibile.
- Tutto il materiale di vetro previsto per l'utilizzo con i reagenti dovrà essere lavato con acido cloridrico 2M e sciacquato abbondantemente con acqua distillata o deionizzata prima dell'uso.
- Utilizzare unicamente acqua ionizzata, distillata o comunque di qualità idonea per la diluizione dei reagenti. Tutti i reagenti dovranno essere miscelati accuratamente prima dell'uso.
- La soluzione di lavoro del coniugato, il tampone di lavaggio diluito e il tampone di blotting devono essere **preparati ogni volta prima dell'uso**.

- La soluzione di lavoro del coniugato deve essere preparata utilizzando un recipiente o un contenitore graduato in polipropilene.
- Evitare di esporre i reagenti o di eseguire i test in un ambiente contenente un grado elevato di vapori di disinfettanti chimici (es. vapori di ipoclorito) durante le fasi di conservazione e incubazione. Il contatto inibisce la reazione cromatica. Non esporre inibisce ad eccessiva luminosità.
- L'analisi deve essere effettuata preferibilmente a temperatura ambiente (25± 3°C).
- Sistemare le strisce con il lato numerato rivolto verso l'alto.
- Per il dosaggio Western Blot è necessario utilizzare un agitatore a piattaforma oscillante anziché un agitatore rotante. In caso contrario, le prestazioni del kit potrebbero essere pregiudicate. Si raccomanda di azionare l'agitatore ad una velocità di 12 - 16 cicli al minuto, con un angolo di inclinazione di 5 - 10 gradi.
- In caso di impiego di strumentazione automatica, accertarsi che questa sia validata prima dell'uso.
- Accertarsi che i campioni vengano aggiunti dalla striscia. Il vassoio può essere titolato e il campione aggiunto quando il tampone viene raccolto all'estremità inferiore. In questo modo si impedisce la formazione di macchie scure dovute all'aggiunta del campione sulla striscia.
- Evitare l'impiego di congelatori a sbrinamento automatico per la conservazione di reagenti e campioni.17. Ensure that automated equipment if used is validated before use.
- Si sconsiglia l'utilizzo di campioni diluiti o liofilizzati in quanto possono fornire risultati alterati. Se costituiscono un pannello QC o una parte di esso, dovrebbero essere considerati validi.

ISTRUZIONI PER LA CONSERVAZIONE
--

- Conservare il kit HIV BLOT 2.2 di MPD e i relativi componenti a 2-8°C quando non sono utilizzati.
- Se conservati alla temperatura di 2°C - 8°C, tutti i reagenti e le strisce per test mantengono la stabilità fino alla data di scadenza riportata sul kit. Non congelare i reagenti.

- A. Strisce**
- Evitare inutili esposizioni delle strisce alla luce.
- B. Reagenti**
- Conservare i reagenti nelle provette o nei flaconi originali con i cappucci correttamente serrati.
 - Dispensare tutti i reagenti a freddo e riportarli ad una temperatura di 2°C - 8°C non appena possibile.
 - La conservazione del substrato a 2°C - 8°C può provocare la formazione di precipitato. Questo, tuttavia, non avrà alcuna influenza sulle prestazioni del kit.

Attenzione: Evitare l'esposizione non strettamente necessaria del substrato alla luce.

DESCRIZIONE DEI SIMBOLI UTILIZZATI

DESCRIZIONE DEI SIMBOLI UTILIZZATI

RACCOLTA, TRASPORTO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

È possibile utilizzare campioni di siero o di plasma raccolti in EDTA, eparina o citrato di sodio. Prima della conservazione, accertarsi che i coaguli o le cellule ematiche siano state separate prima della centrifugazione.

I campioni devono essere conservati a 2 - 8°C se il test deve essere eseguito entro 7 giorni dalla raccolta oppure congelati a -20°C o temperature inferiori se il test è previsto per una data successiva. Utilizzare preferibilmente campioni trasparenti e non emolizzati. I campioni lipemici, itterici o contaminati (particelle) devono essere filtrati (0,45 µm) o centrifugati prima dell'analisi.

I campioni dei pazienti possono essere inattivati, tuttavia ciò non è indispensabile per ottenere risultati ottimali.

Per l'inattivazione, procedere nel modo seguente:

- Allentare i cappucci dei contenitori dei campioni.
- Riscaldare i campioni a 56 °C per 30 minuti in un'incubatrice ad acqua.
- Lasciare raffreddare i campioni prima di serrare nuovamente i cappucci.
- Fino al momento dell'analisi, i campioni possono essere conservati congelati.

Si raccomanda di non sottoporre i campioni dei pazienti a ripetuti cicli di congelamento e scongelamento prima del test.

MATERIALI OCCORRENTI MA NON PRESENTI NEL KIT

- Acqua deionizzata o distillata
- Guanti monouso
- Agitatore oscillante (con una gamma di velocità di oscillazioni da 12 a 16 al minuto e in grado di inclinarsi ad un angolo compreso fra 5° e 10° per un lavaggio omogeneo delle membrane)
- Pipette e puntali in quantità adeguate
- Aspiratore con filtro a ipoclorito di sodio
- Incubatore ad acqua a 56°C (opzionale)
- Ipoclorito di sodio per la decontaminazione

PREPARAZIONE DEI REAGENTI

- TAMPONE DI LAVAGGIO DILUITO**
 - Il **TAMPONE DI LAVAGGIO DILUITO** deve essere **preparato fresco prima dell'uso**.
 - Diluire un volume di **TAMPONE DI LAVAGGIO CONCENTRATO (20X)** in 19 volumi di acqua per reagenti. Mescolare accuratamente.
- TAMPONE DI BLOTTING**
 - Il **TAMPONE DI BLOTTING** deve essere **preparato fresco prima dell'uso**.
 - Diluire 1 volume di **SOLUZIONE TAMPONE CONCENTRATA (10X)** in 9 volumi di acqua per reagenti. Mescolare accuratamente.
 - Aggiungere 1 g di **POLVERE PER BLOT** per 20 ml di **SOLUZIONE TAMPONE CONCENTRATA** preparata come indicato sopra, al punto 2(b). Agitare fino a sciogliere completamente la polvere.
 - Agitare nuovamente prima di dispensare.

DESCRIZIONE DEI SIMBOLI UTILIZZATI

DESCRIZIONE DEI SIMBOLI UTILIZZATI

DESCRIZIONE DEI SIMBOLI UTILIZZATI

SOMMARIO PROTOCOLLI DI ANALISI			
Reagenti	Quantità	Temp. ambiente Proc. rapida	Temp. ambiente Proc. "overnight"
Striscia nitrocellulosa	1	-	-
Tampone lavaggio	2 ml	1-2 min.	1-2 min.
Tampone di blotting	2 ml	-	-
Campione	20 µl	60 min.	Tutta la notte (16-20 ore)
Tampone lavaggio	3 x 2 ml	3 x 5 min.	3 x 5 min.
Coniugato	2 ml	60 min.	30 min.
Tampone lavaggio	3 x 2 ml	3 x 5 min.	3 x 5 min.
Substrato (pronto per l'uso)	2 ml	15 min. (o di meno)	15 min. (o di meno)
Acqua distillata	3 x 2 ml	-	-

QUANTITÀ NECESSARIA DI REAGENTI PER NUMERO DI STRISCE							
Reagenti	NUMERO DI STRISCE DA UTILIZZARE						
	3	6	9	15	20	27	36
1X Tampone di lavaggio (ml)	60	100	140	240	300	400	520
1X Tampone di blotting (ml)	20	40	60	80	100	120	160
Coniugato (µl)	11	17	23	35	45	59	77
Substrato (ml)	11	17	23	35	45	59	77
Polvere per blot (g)	1	2	3	4	5	6	8

CONTROLLO DI QUALITÀ

Si raccomanda di eseguire in ogni seduta il controllo non reattivo, reattivo forte e reattivo debole, indipendentemente dal numero di campioni esaminati. I risultati di un'analisi possono essere considerati validi solo se soddisfano le seguenti condizioni:

- CONTROLLO NON REATTIVO**

Assenza di bande specifiche HIV-1 e HIV-2 sulle strisce di controllo non reattivo. Dovrebbe essere visibile la banda di controllo del siero (Fig. 1c).
- CONTROLLO REATTIVO FORTE**

Devono essere visibili tutte le bande di peso molecolare pertinenti. La Figura 1a fornisce una guida al posizionamento relativo delle bande visualizzate con l'HIV BLOT 2.2 di MPD consentendo l'identificazione delle bande osservate per il CONTROLLO REATTIVO FORTE. Le bande sono: p17, p24, p31, gp41, p51, p55, p66 e gp120/gp160. Possono essere visibili anche altre bande associate ad antigeni del nucleo (p39, p42). Fare attenzione a non interpretare queste ultime come gp41. Gli antigeni di rivestimento gp41, gp120/gp160 appaiono come bande diffuse, in quanto fenomeno tipico delle glicoproteine. La banda di controllo del siero e la banda specifica HIV-2 devono risultare visibili, come indicato dalla Figura 1a.
- CONTROLLO REATTIVO DEBOLE**

Il controllo reattivo debole indica il livello di sensibilità del kit. Devono comparire delle bande deboli alla p24 e/o gp41 e gp 120/160. Potrebbero essere presenti o meno delle deboli bande aggiuntive. Deve essere visibile la banda per il controllo del siero. (Figura 1b).

DESCRIZIONE DEI SIMBOLI UTILIZZATI

DESCRIZIONE DEI SIMBOLI UTILIZZATI

NOTA: Per evitare ogni rischio di errata interpretazione, le strisce devono essere completamente asciutte.

La presenza o assenza di anticorpi anti HIV-1 in un campione viene determinata confrontando ogni striscia di nitrocellulosa con le strisce utilizzate per i controlli NEGATIVO, REATTIVO FORTE e REATTIVO DEBOLE.

La figura 1a viene utilizzata per individuare le bande sviluppate sulla striscia con il controllo REATTIVO FORTE.

N.B.:</

5. Esiste anche una banda ad alto peso molecolare attorno a 160kD che si presume essere un precursore proteico GAG-POL. Ciò si nota con alcuni sierii a titolo elevato HIV-2 o indeterminati (GAG Reactive Only), ma si tratta di una banda evidente non marcata, diversa dalla banda diffusa di gp160 ENV.

Il procedimento di interpretazione comporta quanto segue:

1. Accertare che la banda di controllo del siero sia visibile. Se la banda di controllo è negativa, i risultati non devono essere considerati validi, in quanto ciò è indice di un errore tecnico, quale ad esempio la mancata aggiunta del campione, del coniugato o del substrato.

2. Individuare il peso molecolare di ciascuna banda della striscia utilizzando le strisce di Controllo REATTIVO FORTE e/o DEBOLE, come guida.

3. L'interpretazione della striscia si basa quindi sull'individuazione di profili specifici delle bande, secondo le raccomandazioni delle autorità competenti (ad es. Ministero della Sanità, Organizzazione Mondiale della Sanità, etc.).

Poiché le direttive per l'interpretazione possono variare da Paese a Paese, MPD raccomanda di consultare le autorità locali. Di seguito vengono elencati i criteri d'interpretazione stabiliti dai diversi organismi internazionali.

ORGANISMO	CRITERI INTERPRETATIVI DI POSITIVITÀ PER IL TEST WESTERN BLOT
Association of State and Territorial Public Health Laboratory Directors/Centers for Disease Control (ASTPHLD/CDC), 1989 USA	Almeno due bande di p24, gp41 o gp120/gp160
Centre National Transfusion Sanguine	Due bande ENV(2) con GAG o POL
Organizzazione Mondiale Sanità (WHO), 1990	Due bande ENV con o senza GAG o POL
Consorzio per la Standardizzazione della Sierologia di Retrovirus (CRSS), 1988 USA	Una banda ENV con p24 o p31
Croce Rossa Americana (CRA), 1988 USA	Una banda ciascuno di GAG, POL ed ENV
Centro cinese per il controllo della malattia e la prevenzione (CCDCP), 2004 PRC	Due bande ENV OPPURE una banda ENV con banda p24
National and State Reference Laboratories (NRL) 1987, Australia	Una banda ENV con almeno tre bande GAG o POL
Associazione tedesca per il controllo delle malattie virali (DVV)	Una banda ENV e almeno una banda GAG o POL, vedere anche DIN 58 969, parte 41

Si raccomanda di utilizzare le seguenti direttive per l'interpretazione dell'HIV BLOT 2.2 prodotto dalla MPD. Per ciascuna banda individuata si devono rilevare i risultati ed interpretarli come NEGATIVO, POSITIVO o INDETERMINATO.

PROFILO	INTERPRETAZIONE
Assenza di specifiche bande virali	NEGATIVO
Determinazione di anticorpi p17 SOLTANTO , nessun'altra banda	NEGATIVO
Determinazione di 2 ENV (gp160/gp41 e gp120) e GAG (p17, p24, p55) o POL (p31, p51, p66)	POSITIVO ALLHIV-1

7

Determinazione di 2 ENV (gp160/gp41 e gp120) e GAG (p17, p24, p55) o POL (p31, p51, p66) e banda HIV-2-specifica visibile	POSITIVO ALLHIV-1 con INDICAZIONE DI HIV-2
Presenza di una delle bande virali specifiche, ma il profilo non ha i requisiti di POSITIVO	INDETERMINATO ²
Presenza di una delle bande virali specifiche, ma il profilo non ha i requisiti per essere POSITIVO. Banda HIV-2-specifica visibile.	INDETERMINATO ² con INDICAZIONE DI HIV-2

CRITERI PER INTERPRETARE IL TEST COME INDETERMINATO

Un test INDETERMINATO non può essere considerato determinante per una diagnosi di infezione da HIV-1. Poiché la maggior parte dei soggetti con un risultato inizialmente INDETERMINATO sviluppano anticorpi anti-HIV entro 1 mese, se sono stati infettati dall'HIV-1, il CDC degli USA (2001) raccomanda che questi soggetti ripetano il test per l'infezione da HIV-1 dopo ≤ 1 mese. I soggetti che continuano a presentare un test INDETERMINATO dopo 1 mese presentano una scarsa probabilità di essere stati infettati dall'HIV, a meno che non si sospetti un'esposizione recente all'HIV.

Sulla base di uno studio recente di Fiebig *et al* (2003), benché il periodo finestra per il Western blot possa durare fino a 22 giorni nel caso di un'infezione primaria da HIV-1, la progressione da un blot INDETERMINATO a un profilo pienamente POSITIVO richiedeva non più di 8 giorni. Inoltre, nel caso di una reale infezione, il periodo in cui il risultato del Western Blot era INDETERMINATO, era sempre accompagnato da RNA dell'HIV-1 rilevabile. Invece, negli studi di follow-up di individui che erano risultati positivi allo screening e che presentavano un Western Blot INDETERMINATO, non si osservava nessuna sierocconversione nel caso in cui i risultati ottenuti tramite metodiche basate sulla PCR erano negativi (Sethoe *et al*, 1995). È quindi ragionevole ritenere che i soggetti che presentano un Western Blot INDETERMINATO, ma che sono negativi a un test sull'RNA, abbiano scarse probabilità di essere stati infettati dall'HIV, specialmente se gli individui testati non presentano alcun fattore di rischio associato all'esposizione.

In particolare, i soggetti che presentano un Western Blot INDETERMINATO derivato da un algoritmo diagnostico che utilizza ELISA di quarta generazione come test di screening primario dovrebbero essere ulteriormente analizzati per la presenza di RNA virale utilizzando un test di biologia molecolare come la RT-PCR effettuata con coppie di primer che includano HIV-1/2/O. Se necessario, effettuare un follow-up con un qualsiasi test supplementare un mese dopo. La progettazione unica degli ELISA di quarta generazione permette una rilevazione simultanea dell'antigene e dell'anticorpo. Di conseguenza, i campioni identificati come positivi da un ELISA di quarta generazione dovrebbero contenere l'anticorpo o l'antigene oppure entrambi. Benché oltre il 95% dei casi identificati come veri positivi da un ELISA di quarta generazione siano correlati alla presenza di anti-HIV e verificabili (confermati) tramite Western Blot (Ly *et al*, 2000), l'effettuazione di un test supplementare che utilizzi l'RT-PCR sembra inevitabile per la piccola porzione di reattività correlata all'antigene p24. Anche in questo caso, i soggetti senza alcun rischio di esposizione presentano scarse probabilità di essere infettati dall'HIV, se sono stati identificati come positivi da un ELISA di quarta generazione accompagnato da un Western Blot INDETERMINATO in assenza di un risultato POSITIVO ottenuto utilizzando un test sull'RNA effettuato con coppie di primer che includano HIV-1/2/O.

Tuttavia, l'applicazione a scopo diagnostico delle analisi degli acidi nucleici (NAT) per il DNA e l'RNA dell'HIV è stata approvata dalle autorità competenti (CDC degli USA, 2001; Constantine & Zink, 2005) soltanto di recente. Ad oggi, soltanto un test qualitativo per l'RNA è stato approvato dalla FDA degli USA per la diagnosi di infezione primaria e acuta da parte dell'HIV-1. Quindi, gli algoritmi diagnostici raccomandati dal CDC degli USA (2001) e dell'OMS (2004) devono essere ancora aggiornati e i NAT devono essere ancora inclusi come metodi per risolvere i casi di risultato INDETERMINATO al Western Blot. Ciononostante, la CDC degli USA (2001) riconosceva che le NAT possono essere utili per determinare lo stato infettivo delle persone con un Western Blot iniziale INDETERMINATO, se effettuate in consultazione con specialisti clinici e laboratoristici.

LIMITI DELLA PROCEDURA

La determinazione degli anticorpi anti HIV-1 non costituisce diagnosi di sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS). Un TEST NEGATIVO non garantisce che l'agente infettivo dell'AIDS non sia presente. Sebbene un test POSITIVO per gli anticorpi anti HIV-1 indichi un'infezione causata dal virus, una diagnosi di AIDS può essere eseguita solo clinicamente se un paziente corrisponde alla definizione di AIDS stabilita dal Center for Disease Control (USA), dall'Organizzazione Mondiale della Sanità o da altre autorità competenti.

È noto che i pazienti nei quali la sierocconversione si è verificata recentemente, possono presentare dei profili incompleti, ma gli stessi svilupperanno un aumento di reattività (sia nel numero che nell'intensità delle bande) nell'arco di 2-6 mesi. La maggior parte delle strisce con risultati POSITIVI presenterà altre bande virali specifiche.

Un test INDETERMINATO non può essere considerato determinante per una diagnosi di infezione da HIV-1. Si consiglia di ripetere tutti i test INDETERMINATI utilizzando sia il primo prelievo che i successivi. I donatori di sangue che presentano un profilo INDETERMINATO devono essere riesaminati dopo un mese utilizzando un campione appena prelevato (CDC degli USA, 2001). Inoltre, gli anticorpi anti p24 e p31 diminuiscono durante il decorso dell'AIDS, producendo un mutamento nell'interpretazione del test da POSITIVO a INDETERMINATO. In tali situazioni, l'interpretazione dei risultati deve essere basata su una successiva analisi e su valutazioni cliniche.

Data la sua natura altamente specifica, la NON REATTIVITÀ di campioni con peptide di superficie HIV-2-specifico su un test virale indeterminato, non esclude la possibilità di infezione con altri ceppi di HIV-2.

I campioni riscontrati indicativi per infezioni da HIV-2 devono essere ulteriormente riesaminati con un kit Western Blot per HIV-2.

CARATTERISTICHE SPECIFICHE DI ESECUZIONE

I risultati del test HIV BLOT 2.2 di MPD per la determinazione degli anticorpi anti-HIV-1 e HIV-2 sono stati oggetto di numerosi studi clinici.

Tabella 1 : Studio sulla sensibilità basato sul livello di reattività degli antigeni virali HIV-1 con campioni sieropositivi di HIV-1. (Campioni testati = 197)

PROFILO SIEROLOGICO	HIV BLOT 2.2 NUMERO (PERCENTUALE)	DUPONT/ORTHO HIV-1 WB NUMERO (PERCENTUALE)
GAG, POL ed ENV	192 (97,5%)	188 (95,4%)
p24, p31, gp41 e/o gp120/gp160	187 (94,9%)	179 (90,9%)
ENV e GAG o POL	197 (100%)	197 (100%)

8

Tabella 2 : Studio sulla specificità basato sul livello di reattività degli antigeni virali HIV-1 su campioni di sangue proveniente da donatori sani e su sierii con altre infezioni virali.

TIPO DI CAMPIONE	NUMERO	POSITIVO	REATTIVITÀ ALL'HIV-1	
			INDETERMINATO*	NEGATIVO
Donatori sani	208	0	11	197
HTLV-1	5	0	0	5
CMV	5	0	1	4
EBV (IgM)	5	0	1	4
V.zoster (IgG)	5	0	1	4
Morbillo	6	0	2	4
Rosolia	5	0	1	4
Parotite	4	0	1	3
Adenovirus	5	0	2	3
HSV	5	0	0	5
Dengue	5	0	1	4
Totale	258	0	21	237

*Tutti apparsi soltanto come banda p24 o p17.

Tabella 3 : Studio sulla sensibilità della banda del peptide HIV-2 con campioni HIV-2 sieropositivi. (Campioni testati = 178)

HIV-2 Western Blot Profilo sierologico ⁹	Reattività del Peptide HIV-2	
	Positivo	Negativo
GAG, POL e 2 ENV	160	0
GAG, POL e 1 ENV	18	0

⁹ I sierii sono stati definiti positivi in base ai risultati ottenuti con il New LAV Blot 2 della Pasteur. I dati sono stati forniti dal Dott. Olivier E. Varnier e dalla Dr.ssa Flavia Lillo, del Laboratorio per lo Studio dei Retrovirus Umani, Università di Genova.

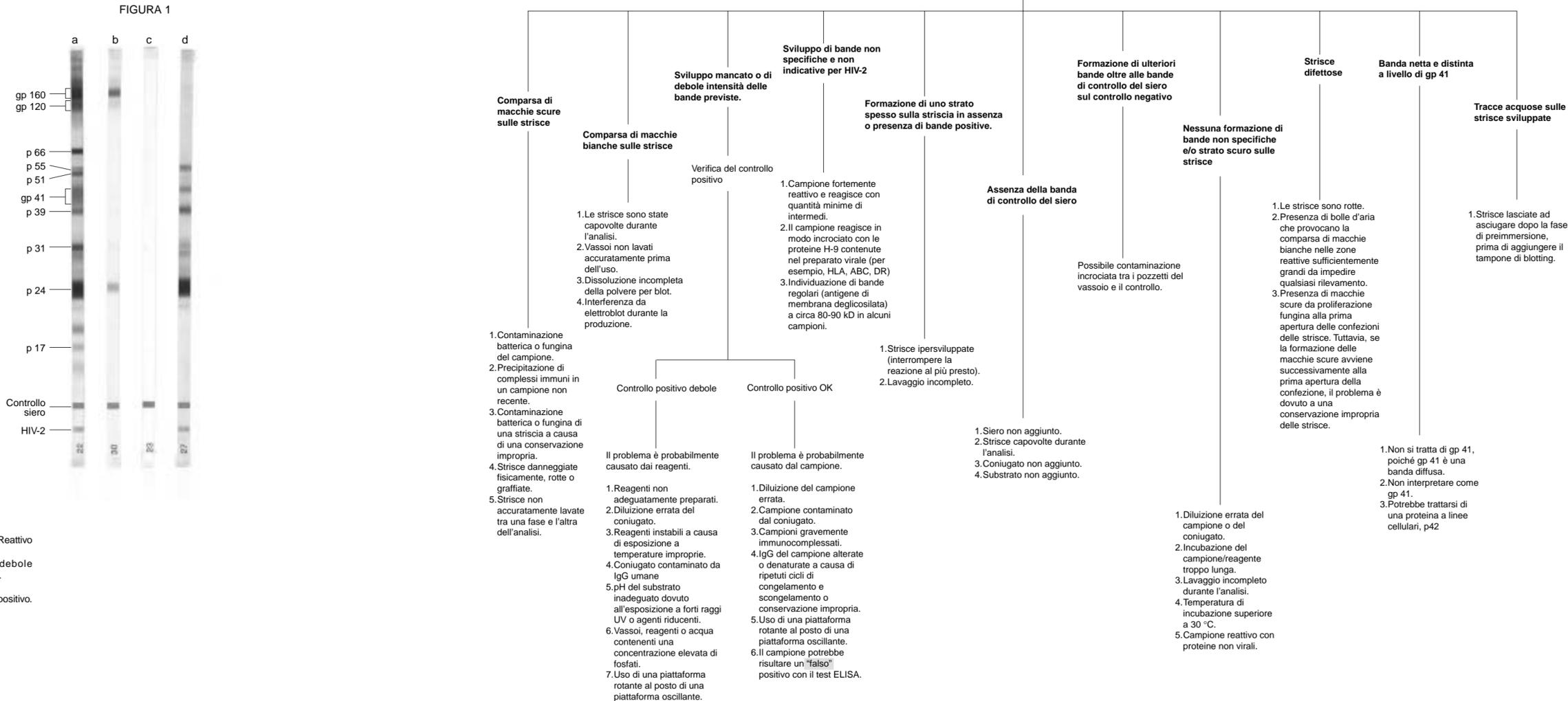
Tabella 4 : Studi sulla specificità della banda del peptide HIV-2 con sierii HIV-1 sieropositivi, campioni di donatori sani e sierii con altre infezioni virali.

TIPO DI CAMPIONE	NUMERO	REATTIVITÀ DEL PEPTIDE HIV-2	
		POSITIVO	NEGATIVO
HIV-1 sieropositivo	197	16 ^a	181
Donatori sani	208	0	208
HTLV-1 sieropositivo	5	0	5
CMV	5	0	5
EBV (IgM)	5	0	5
V.zoster (IgG)	5	0	5
Morbillo	6	0	6
Rosolia	5	0	5
Parotite	4	0	4
Adenovirus	5	0	5
HSV	5	0	5
Dengue	5	0	5
Totale	455	16	439

^a Quando testati con l'HIV-2 Western Blot, 6 di questi campioni sono risultati positivi a ENV, GAG o POL, 9 sono risultati positivi solo a GAG e/o POL, mentre 1 campione è risultato negativo.

Un totale di 15 pannelli di sierocconversione HIV-1 commerciali è stato analizzato con HIV Blot 2.2 di MPD e i risultati hanno mostrato che HIV Blot 2.2 di MPD era in grado di rilevare l'anticorpo per l'HIV anticipatamente o nello stesso campione in tutti i pannelli.

TAVOLA DI INDIVIDUAZIONE GUASTI



10

11

ESCLUSIONE DI GARANZIA E GARANZIA LIMITATA ESPRESSA

Il produttore non fornisce altra garanzia esplicita per il kit, tranne l'uso come dosaggio diagnostico *in vitro* nel quadro delle specifiche e delle limitazioni indicate nel Manuale di istruzioni del prodotto, sempre se viene usato seguendo le istruzioni ivi fornite. Il produttore non fornisce alcuna garanzia, espressa o implicita, compresa qualsiasi garanzia espressa o implicita di commerciabilità, adeguatezza all'uso o utilità implicita ad altri scopi. Il produttore riconosce solo la sostituzione del prodotto o il rimborso del prezzo di acquisto del prodotto stesso. Il produttore non potrà essere ritenuto responsabile nei confronti dell'acquirente o di terzi per danni, lesioni o danni economici di qualsiasi entità comunque causati dal prodotto nell'uso o nell'applicazione sopra indicati.

PROBLEMI TECNICI / RECLAMI

In caso di problemi tecnici o di reclami, attenersi alla seguente procedura:

- Annotare il numero di lotto del kit, la data di scadenza e il numero di lotto della striscia.
- Conservare i kit e risultati ottenuti.
- Contattare il più vicino centro MP Biomedicals o il proprio distributore locale.

BIBLIOGRAFIA

- V.C.W.Tsang, K.Hancock, M.Wilson,D.F.Palmer, S.Whaley, J.S.Mc Dougal, and S.Kennedy. March 1985. Developmental Procedure: Enzyme-linked Immunoelctrotransfer Blot technique for HTLV-III/LAV antibodies:CDC, Atlanta.
- H.Towbin, T.Staehein, and J.Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.Proc.Natl. Acad.Sci.USA 76:4350-4354
- J.Schupbach, M.Popovic, R.V.Gilden, M.A.Gonds, M.G.Sargadharan and C.Gallo.1984. Serological Analysis of subgroup of Human T-Lymphotropic retroviruses(HTLV-III) associated with AIDS.Science 224, 503-505
- M.G.Sargadharan, M.Popovic, L.Bruch, J.Schupbach and R.C.Gallo.1984.Antibodies reactive with human T-Lymphotropic retroviruses (HTLV-III) in the serum of patients with AIDS. Science 224, 506-608.
- Centre for Disease Control.1985. "Provisional public health service inter-agency recommendations for screening donated blood and plasma for antibody to the virus causing Acquired Immune Deficiency Syndrome". United States Morbidity and Mortality Weekly Report 34(1):1-5
- Proposed WHO criteria for interpreting results from Western blot assays for HIV-1, HIV-2, and HTLV-I/HTLV-II, 1990, WHO Weekly Epidemiological Record No 37, p282-283.
- F.Clavel, D. Guetard., F.Brun-Vezinet, etal, 1986 Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. Science; 233:343-346.
- F.Clavel., 1987.HIV-2, the West African AIDS virus.AIDS 1:135-140.
- R.S.Tedder, A. Hughes, T.Corrah et al 1988. Envelope cross-reactivity in Western Blot for HIV-1 and HIV-2 may not indicate dual infection. Lancet 11:927-930.
- Bottinger B., A.Karisson, F.Andreasson et al.1990.Envelope cross-reactivity between Human Immunodeficiency Virus Type 1 and 2 detected by different serological methods: Correlation between cross-neutralization and reactivity against the main neutralizing site. J.Virol.64(7):3492-3499.

- Centers for Disease Control. 2001. Revised Guidelines for HIV Counseling Testing, and Referral and Revised Recommendations for HIV Screening of Pregnant Women --- United States, Morbid. Mortal. Weekly Rep. 50: RR-19.
- Fiebig, E. W., D. J. Wright, B. D. Rawal, P. E. Garrett, R. T. Schumacher, L. Peddada, C. Heldebrant, R. Smith, A. Conrad, S. H. Kleinman, and M. P. Busch. 2003. Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. AIDS. 17:1871-1879.
- Ly, T. D., C. Edlinger, and A. Vabret. 2000. Contribution of combined detection assays of p24 antigen and anti-human immunodeficiency virus (HIV) antibodies in diagnosis of primary HIV infection by routine testing. J Clin Microbiol. 38:2459-2461.
- Sethoe, S. Y., A. E. Ling, E. H. Sng, E. H. Monteiro, R. K. Chan. 1995. PCR as a confirmatory test for human immunodeficiency virus type 1 infection in individuals with indeterminate western blot (immunoblot) profiles. J Clin Microbiol. 33:3034-3036.
- Constantine, N. T. and H. Zink. 2005. HIV testing technologies after two decades of evolution. Indian J Med Res. 121:519-538.
- World Health Organization. 2004. Guidelines for HIV Diagnosis and monitoring of antiretroviral therapy. Regional Office for South-East Asia, New Delhi, India.

MP Biomedicals Asia Pacific Pte Ltd.
85 Science Park Drive
#04-01, The Cavendish
Singapore Science Park
Singapore 118259
N. tel. : + 65 6775 0008
N. fax : + 65 6775 4536
E-mail : enquiry_ap@mpbio.com

EC REP Medical Technology Promedt
Consulting GmbH
Attenhofstrasse 80
D-66386 St. Ingbert
Germany
N. tel. : + 49 68 94 58 1020
N. fax : + 49 68 94 58 1021
E-mail : info@mt-procons.com

Sedi regionali:
MP Biomedicals
Parc d'Innovation, BP 50067
67402 ILLKIRCH CEDEX
France
N. tel. : +33 388 67 4607
N. fax : +33 388 67 5420
E-mail: custserv.eur@mpbio.com

* Brevetto degli Stati Uniti 5.721.095

* Il nome e il logo Genelabs sono concessi in licenza da Genelabs Technologies, Inc.

12