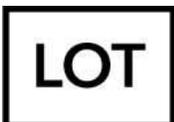
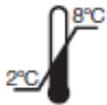




Sistema microElisa per HTLV-I/II Avioq

Principali simboli utilizzati

	Numero di catalogo		Consultare le istruzioni per l'uso
	Codice di lotto		Dispositivo medico-diagnostico in vitro
	Data di scadenza		Controllo positivo
	Limite di temperatura		Controllo negativo
	Senza lattice		Contenuto sufficiente per <n> test
	Attenzione		Tenere al riparo dalla luce solare

Sistema microElisa per HTLV-I/II Avioq



USO PREVISTO

Il Sistema microElisa per HTLV-I/II Avioq è un saggio di immunoassorbimento enzimatico (ELISA) qualitativo per la rilevazione di anticorpi anti-virus T-linfotropico umano di tipo I (HTLV-I) e/o virus T-linfotropico umano di tipo II (HTLV-II) in campioni umani sierici, plasmatici o cadaverici. È destinato allo screening di singoli donatori umani, compresi donatori volontari di sangue intero ed emocomponenti e altri donatori viventi, per la presenza di anticorpi anti-HTLV-I/HTLV-II e all'uso come ausilio nella diagnosi clinica di infezioni da HTLV-I o HTLV-II e patologie correlate. È progettato inoltre per l'analisi di campioni di siero e plasma per lo screening di donatori di organi se i campioni vengono prelevati quando il cuore del donatore è ancora battente e per l'analisi dei campioni per lo screening di donatori cadaverici (cuore non battente). Non è progettato per l'uso su campioni di sangue cordonale. Oltre a essere usato come saggio manuale, è concepito anche per l'uso con il Sistema Summit ORTHO® (OSS) per lo screening di donatori di sangue.

RIEPILOGO E SPIEGAZIONE DEL TEST

HTLV-I, un retrovirus di tipo C umano, è stato eziologicamente associato alla leucemia a cellule T (ATL) dell'adulto¹⁻⁴ e ad un disturbo neurologico demielinizzante denominato paraparesi spastica tropicale e/o mielopatia associata a HTLV-I (TSP/HAM). Gli anticorpi anti-HTLV-I vengono riscontrati con elevata frequenza nelle persone affette da questi disturbi. Tuttavia, studi in aree virali endemiche hanno accertato l'esistenza di casi di ATL e TSP/HAM virus-negativi. Più recentemente, è stato dimostrato che l'infezione da HTLV-I è associata a leucemia linfatica cronica (CLL) a cellule B e T,^{5,6} mieloma multiplo,⁷ alcuni casi di linfoma non Hodgkin (NHL),⁸ polimiosite,⁹ artrite,^{10,11} sarcoma di Kaposi,¹² uveite,¹³ strongiloidiasi⁵ e micosi fungoide.^{14,15} L'HTLV-I è endemico in alcuni paesi caraibici, nel Giappone meridionale e possibilmente in alcune regioni africane.¹⁶⁻²¹ Negli Stati Uniti l'HTLV-I è stato identificato nei pazienti affetti da ATL, in tossicodipendenti per via endovenosa e in soggetti sani.

L'HTLV-II, un virus correlato, è endemico in varie tribù amerindie,²²⁻²⁵ ma la sua patogenicità non è stata dimostrata in modo inequivocabile. È stato osservato un tasso elevato di sieropositività a HTLV-II nei tossicodipendenti per via endovenosa.²⁶⁻²⁸ I primi pazienti per i quali sono state riportate infezioni da HTLV-II presentavano una variante a cellule T atipica di leucemia a cellule capellute. Osservazioni più recenti fanno supporre che l'HTLV-II possa essere associato a leucemia linfocitica granulosa (LGL),²⁹ leucemia leucopenica cronica a cellule T,³⁰ leucemia prolinfocitica a cellule T,³¹ micosi fungoide¹⁴ e malattie neurodegenerative croniche^{32,33} quali mielopatia³⁴ e atassia spastica.³⁵ Gli anticorpi anti-HTLV-II presentano reattività crociata significativa per gli antigeni di HTLV-I.

La trasmissione di infezioni da HTLV-I e HTLV-II a riceventi di trasfusioni di emoderivati cellulari infetti è ben documentata. Altre modalità note di trasmissione includono latte materno, contatto sessuale e condivisione di aghi e siringhe contaminati da parte di tossicodipendenti per via endovenosa. Si sospetta trasmissione perinatale, che rimane tuttavia da dimostrare.

PRINCIPIO DEL TEST

Il Sistema microElisa per HTLV-I/II Avioq è un saggio di immunoassorbimento enzimatico nel quale la fase solida (micropozzetti) è rivestita con un lisato virale di HTLV-I purificato, un lisato virale di HTLV-II purificato e un antigene ricombinante di HTLV-I, p21e.

L'aggiunta di un campione da analizzare diluito contenente anticorpi anti-HTLV-I o HTLV-II provoca la formazione di complessi in seguito all'interazione tra gli anticorpi presenti nel campione e gli antigeni presenti nella fase solida. Dopo l'incubazione, il campione viene aspirato e il pozzetto viene lavato con tampone. Successivamente vengono aggiunte immunoglobuline anti-umane di capra coniugate a perossidasi di rafano (HRP), che si legano al complesso anticorpo-antigene durante una seconda incubazione. Dopo un lavaggio e l'incubazione con il substrato TMB (tetrametilbenzidina), si ottiene una colorazione blu. La reazione enzimatica viene interrotta mediante l'aggiunta di una soluzione di acido solforico, che determina il cambiamento del colore a giallo. La quantità di anticorpi anti-HTLV-I o HTLV-II specifici presenti nel campione è proporzionale all'intensità del colore.



REAGENTI

Componenti di ciascun kit del Sistema microElisa per HTLV-I/II Avioq

192 test	576 test	9600 test	
2 porta-strisce	6 porta-strisce	100 porta-strisce	Strisce microElisa per HTLV-I/II – Dodici per porta-strisce, contenenti ciascuna 8 pozzetti rivestiti con lisato virale di HTLV-I inattivato, un antigene di HTLV-I ricombinante (rp21E) e lisato virale di HTLV-II inattivato; sono inserite in un sacchetto di alluminio contenente gel di silice come essiccante.
1 flaoncino (50 mg)	2 flaoncini (50 mg ciascuno)	4 flaoncini (50 mg ciascuno)	EnzAbody® per HTLV-I/II (EnzAbody concentrato) – Perossidasi di rafano coniugata a immunoglobulina anti-umana di capra, ~0,06% p/p o 30 µg; liofilizzato con siero di capra, saccarosio e latte scremato in polvere.
1 flacone (55 ml)	2 flaconi (55 ml ciascuno)	28 flaconi (55 ml ciascuno)	Diluyente EnzAbody® – Soluzione salina in tampone fosfato contenente siero di capra 10% e surfattanti non ionici. Conservanti: gentamicina solfato 0,2% e cinnamaldeide 0,02%.
1 flacone (100 ml)	2 flaconi (100 ml ciascuno)	16 flaconi (100 ml ciascuno)	Diluyente per il campione – Soluzione salina in tampone fosfato contenente siero di capra 10%, surfattanti non ionici, cloruro di sodio, albumina sierica bovina 0,14%, latte scremato in polvere e colorante amaranto. Conservante: bromonitrodiossano 0,03% (p/v).
1 flacone (22 ml)	2 flaconi (22 ml ciascuno)	34 flaconi (22 ml ciascuno)	Soluzione di TMB – Acido citrico contenente tetrametilbenzidina•2HCl 0,03%.
1 flacone (22 ml)	2 flaconi (22 ml ciascuno)	34 flaconi (22 ml ciascuno)	Soluzione di perossido – Tampone di acido citrico/citrato di sodio contenente perossido di urea 0,04%.

192 test	576 test	9600 test	
1 flaconcino (1,5 ml)	2 flaconcini (1,5 ml ciascuno)	17 flaconcini (1,5 ml ciascuno) CONTROL -	Siero di controllo negativo – Siero umano contenente stabilizzatori proteici; non reattivo in base a test approvati dalla FDA per anticorpi anti-HTLV-I, HTLV-II, HIV-1, HIV-2, HCV e non reattivo per HBsAg e HIV-Ag. Conservante: bromonitrodiossano 0,05% (p/v).
1 flaconcino (1,0 ml)	1 flaconcino (1,0 ml)	12 flaconcini (1,0 ml ciascuno) CONTROL +	Siero di controllo positivo per HTLV-I – Siero umano inattivato contenente stabilizzatori proteici e colorante rosso amaranto; reattivo per anticorpi anti-HTLV-I; non reattivo in base a test approvati dalla FDA per anticorpi anti-HIV-1, HIV-2, HCV e non reattivo per HBsAg e HIV-Ag. Può presentare reattività crociata con l'antigene di HTLV-II. Conservante: bromonitrodiossano 0,05% (p/v).
1 flaconcino (1,0 ml)	1 flaconcino (1,0 ml)	12 flaconcini (1,0 ml ciascuno) CONTROL +	Siero di controllo positivo per HTLV-II – Siero umano inattivato contenente stabilizzatori proteici e colorante blu brevettato; reattivo per anticorpi anti-HTLV-II; non reattivo in base a test approvati dalla FDA per anticorpi anti-HIV-1, HIV-2, HCV e non reattivo per HBsAg e HIV-Ag. Può presentare reattività crociata con l'antigene di HTLV-I. Conservante: bromonitrodiossano 0,05% (p/v).
1 ciascuno	1 ciascuno	5 ciascuno	Morsetto e barra (o sistema equivalente) – Chiusura per il pacchetto in alluminio.
10 fogli	20 fogli	30 fogli	Pellicola sigillante per piastra – Adesiva.

Nota. Il Tampone di lavaggio concentrato è un accessorio del kit.

Il tampone di lavaggio concentrato, numero di prodotto 559879, comprende 1 flacone (100 ml)

Il tampone di lavaggio concentrato, numero di prodotto 559880, comprende 4 flaconi (4 da 100 ml)

Nota. La soluzione neutralizzante è acido solforico 2N e non viene fornita da Avioq. Non usare altre soluzioni neutralizzanti per questo saggio.



AVVERTENZE E PRECAUZIONI

1. **Attenzione. Maneggiare tutti i materiali biologici per il test HTLV-I/II Avioq come se fossero in grado di trasmettere agenti infettivi.** Gli antigeni usati per rivestire i pozzetti microElisa sono stati sottoposti a inattivazione virale mediante trattamento con detergenti e i **sieri di controllo positivi per HTLV-I e HTLV-II** sono stati inattivati mediante aggiunta di un detergente. I controlli positivi e negativi sono derivati da siero o plasma umano e sono stati analizzati per la presenza di antigene di HIV-1, HBsAg, anticorpi anti-HIV-1, anti-HIV-2 e anti-HCV e sono risultati non reattivi mediante test approvati dalla FDA. Poiché nessun metodo analitico è in grado di garantire con certezza l'assenza di agenti infettivi, tutti i materiali di origine umana devono essere maneggiati come se fossero in grado di trasmettere agenti infettivi.
2. Tutti gli operatori del test devono rispettare i regolamenti dell'Occupational Safety and Health Administration (OSHA) (29 CFR 1910.1030).
3. Tenere l'area di analisi separata da aree in cui vengono conservati sangue o emoderivati per trasfusioni.
4. Non pipettare alcun materiale con la bocca. Non fumare, mangiare o bere nelle aree in cui vengono maneggiati i campioni o i reagenti del kit.
5. Non eseguire il test in presenza di vapori reattivi (es. di ipoclorito di sodio, acidi, alcali o aldeidi) o di polvere, perché l'attività enzimatica del coniugato può risultare compromessa.
6. Usare guanti monouso e maneggiare tutti i materiali utilizzati nel test (compresi campioni, controlli, soluzione di lavaggio, strisce microElisa e porta-strisce e pipette) con cautela, come se fossero in grado di trasmettere agenti infettivi. Consultare immediatamente un medico in caso di ingestione dei materiali o di contatto dei materiali con lacerazioni, lesioni o altre ferite cutanee aperte, membrane mucose o gli occhi.
7. Pulire immediatamente eventuali versamenti di materiale contenente antigeni o anticorpi usando una soluzione di ipoclorito di sodio al 5% diluita 1:10 (concentrazione finale 0,5%) o un disinfettante equivalente, per decontaminare. Smaltire i materiali per la pulizia con un metodo accettabile.
8. Smaltire tutti i materiali che sono venuti a contatto con campioni e reagenti nel rispetto dei regolamenti locali e nazionali.³⁷ I rifiuti solidi possono essere incinerati o sterilizzati in autoclave per un periodo di tempo appropriato. A causa delle differenze tra autoclavi e configurazioni dei rifiuti, ogni utente deve verificare l'efficacia del ciclo di decontaminazione usando indicatori biologici.³⁸

Nota. I rifiuti liquidi contenenti acidi devono essere neutralizzati prima dell'aggiunta di disinfettanti e/o lo smaltimento.
9. Alcuni componenti del kit contengono concentrazioni ridotte di sostanze chimiche pericolose (tampone di lavaggio concentrato, soluzione di perossido, soluzione di TMB). Per informazioni più specifiche fare riferimento alla scheda dei dati di sicurezza dei materiali (MSDS). Richiedere eventuali MSDS ad Avioq Inc.
10. **Acido solforico 2N** – L'acido solforico è corrosivo e deve essere maneggiato con cautela, per prevenire l'esposizione di cute e occhi. Se questo reagente venisse a contatto con la cute o gli occhi, sciacquarli con abbondante acqua.
11. Prestare attenzione durante il montaggio di micropiastre per analisi parziali delle piastre (mescolando strisce rivestite e non rivestite). È possibile che alcuni analizzatori non siano in grado di distinguere tra pozzetti rivestiti e non rivestiti e producano risultati per qualsiasi posizione dei pozzetti con un numero ID o controllo assegnato.

PREPARAZIONE DEI REAGENTI

Preparare i seguenti reagenti prima o durante il saggio. I reagenti e i campioni devono essere a temperatura ambiente (15-30 °C) prima della diluizione/preparazione e prima di iniziare il test e possono rimanere a temperatura ambiente durante l'esecuzione del test. Preparare una quantità di reagenti sufficiente per il numero desiderato di test da effettuare. Riporre i reagenti nuovamente a 2-8 °C dopo l'uso.

Preparazione di EnzAbody concentrato

1. Pipettare 4,0 ml di **diluyente EnzAbody** in 1 flaconcino di **EnzAbody concentrato** liofilizzato. Miscelare accuratamente il contenuto. Evitare la formazione di eccessiva schiuma. Lasciare reidrattare **EnzAbody concentrato** almeno 30 minuti dopo la ricostituzione. Non maneggiare il flaconcino di **EnzAbody concentrato** con guanti che sono venuti a contatto con siero o plasma.
2. Annotare la data di preparazione e la data di scadenza sul flaconcino. EnzAbody concentrato ricostituito è stabile per 5 settimane se conservato a 2-8 °C.

Preparazione della soluzione di lavoro EnzAbody

1. Usare preferibilmente contenitori in polipropilene monouso puliti. **Non usare contenitori in polistirene.** Se si utilizza un processore di micropiastre automatico, fare riferimento alle raccomandazioni del produttore riguardo al contenitore da usare. Trasferire nel contenitore una quantità opportuna di **diluyente EnzAbody** e aggiungere una quantità opportuna di **EnzAbody concentrato** ricostituito, in modo da preparare una **soluzione di lavoro EnzAbody** 1:251 (vedere la tabella seguente). Prima dell'uso, assicurarsi che **EnzAbody concentrato** sia ben miscelato. Riporre **EnzAbody concentrato** ricostituito non utilizzato a 2-8 °C. Non combinare flaconcini di **EnzAbody concentrato ricostituito**. A seconda del dispensatore di reagente utilizzato, potrebbe essere necessaria una quantità maggiore di **soluzione di lavoro EnzAbody**.

Preparazione della soluzione di lavoro EnzAbody

Numero di strisce microElisa	Volume di concentrato EnzAbody ricostituito	Volume di diluyente EnzAbody
2	10 µl	2,5 ml
3	20 µl	5,0 ml
6	25 µl	6,25 ml
9	30 µl	7,5 ml
12	50 µl	12,5 ml

Numero di piastre	Volume di concentrato EnzAbody ricostituito	Volume di diluyente EnzAbody
1	50 µl	12,5 ml
2	100 µl	25,0 ml
4	200 µl	50,0 ml
6	300 µl	75,0 ml
10	500 µl	125,0 ml

2. Una volta preparata, la **soluzione di lavoro EnzAbody** è stabile per quattro ore a temperatura ambiente. Annotare l'orario di preparazione e di scadenza della **soluzione di lavoro EnzAbody**. Eliminare eventuale **soluzione di lavoro EnzAbody** non utilizzata al termine del saggio.

Preparazione del tampone di lavaggio

Importante! Il **tampone di lavaggio concentrato** è formulato in modo specifico per il saggio per HTLV-I/II Avioq. Non usare altri tamponi di lavaggio per questo saggio.

1. Controllare il **tampone di lavaggio concentrato** per la presenza di cristalli o precipitato. Se nella soluzione si sono formati cristalli o precipitato, risolubilizzarli riscaldando la soluzione a 37 °C fino al dissolvimento dei cristalli o del precipitato. Miscelare il **tampone di lavaggio concentrato** prima della diluizione.
2. Diluire il **tampone di lavaggio concentrato** 1:25 con acqua purificata,³⁹ in base alla tabella seguente.

Preparazione del tampone di lavaggio

Numero di strisce microElisa	Volume di tampone di lavaggio concentrato	Volume di acqua purificata	Volume totale di tampone di lavaggio
1-6	7 ml	168 ml	175 ml
7-12	14 ml	336 ml	350 ml

Numero di piastre	Volume di tampone di lavaggio concentrato	Volume di acqua purificata	Volume totale di tampone di lavaggio
1	14 ml	336 ml	350 ml
2	28 ml	672 ml	700 ml
4	56 ml	1344 ml	1400 ml
6	84 ml	2016 ml	2100 ml
10	140 ml	3360 ml	3500 ml

Il volume totale di **tampone di lavaggio** non include eventuale volume aggiuntivo necessario per un lavatore automatico (adescamento, volume morto, ecc). Consultare le istruzioni del produttore per il lavatore di piastre microElisa.

3. Il **tampone di lavaggio** è stabile per due settimane se conservato a 2-30 °C. Annotare la data di preparazione e di scadenza.



Preparazione del substrato TMB

Preparare il **substrato TMB** in un contenitore in polipropilene pulito, preferibilmente monouso. **Non usare contenitori in polistirene.** Trasferire una quantità sufficiente di **soluzione di perossido** in un contenitore, aggiungere alla **soluzione di perossido** un'opportuna quantità di **soluzione di TMB** e miscelare accuratamente prima dell'uso (vedere la tabella seguente).

Ogni piastra di micropozzetti richiede almeno 10 ml di **substrato TMB**. A seconda del dispensatore di reagente utilizzato, potrebbe essere necessaria una quantità di **substrato TMB** maggiore. Per ulteriori requisiti del reagente, consultare le istruzioni del produttore dello strumento.

Preparazione del substrato TMB

Numero di strisce microElisa	Volume di soluzione di TMB	Volume di soluzione di perossido
2	1 ml	1 ml
3	2 ml	2 ml
6	3 ml	3 ml
9	5 ml	5 ml
12	6 ml	6 ml

Numero di piastre	Volume di soluzione di TMB	Volume di soluzione di perossido
1	6 ml	6 ml
2	12 ml	12 ml
4	24 ml	24 ml
6	36 ml	36 ml
10	60 ml	60 ml

Il **substrato TMB** è stabile per 6 ore se mantenuto a temperatura ambiente e deve essere incolore quando viene utilizzato. Annotare l'orario di preparazione e di scadenza. Se la soluzione presenta un'evidente colorazione blu, eliminarla e preparare dell'altro **substrato TMB** come necessario.

Nota. La **soluzione di TMB** e il **substrato TMB** devono essere protetti dall'esposizione alla luce. Evitare il contatto con metalli o ioni metallici, perché potrebbero determinare la formazione di una colorazione blu indesiderata.

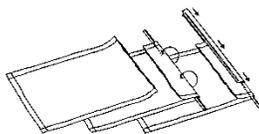
ISTRUZIONI PER LA CONSERVAZIONE DEL KIT

Quando non sono utilizzati, conservare tutti i componenti a 2-8 °C. La data di scadenza stampata sul kit indica la data oltre la quale il prodotto non deve essere utilizzato. La stabilità dei reagenti del kit dopo la ricostituzione o la diluizione è indicata nella sezione "PREPARAZIONE DEI REAGENTI". Non conservare il kit congelato.

STRISCE MICROELISA PER HTLV-I/II

La confezione di alluminio deve essere portata a temperatura ambiente (15-30 °C) prima dell'apertura, per evitare condensazione sulle **strisce microElisa**. Dopo l'apertura della confezione in alluminio sigillata, le **strisce** sono stabili per 4 settimane a 2-8 °C, se la confezione in alluminio viene sigillata nuovamente con il morsetto e la barra forniti o un metodo equivalente. Annotare la data di apertura e la data di scadenza sulla confezione in alluminio. **Il sacchetto in gel di silice non deve essere rimosso.**

Figura 1. Chiusura della confezione di alluminio.



1 2 3

Ripiegare l'estremità aperta della confezione in alluminio sulla barra.

Applicare il morsetto.

INDICAZIONI CHIMICHE O FISICHE DI INSTABILITÀ

Alterazioni dell'aspetto fisico dei materiali del kit possono indicare instabilità o deterioramento. La data di scadenza stampata sull'etichetta dei reagenti del kit indica la data oltre la quale il prodotto non deve essere utilizzato.

Se il **substrato TMB** presenta un'evidente colorazione blu, eliminarlo e preparare dell'altro **substrato TMB** come necessario.

PRELIEVO, CONSERVAZIONE E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Campioni di donatori viventi

Prelievo. Non è necessaria alcuna preparazione particolare del paziente e neppure che sia a digiuno. Si può usare siero o plasma derivato da anticoagulanti quali eparina, citrato, CPD, CPDA-1 o EDTA (etilendiamminotetraacetato). Per informazioni sul corretto rapporto tra volume di campione e anticoagulante da utilizzare, consultare le istruzioni fornite dal produttore delle provette per il prelievo dei campioni. Rimuovere il siero o il plasma dal coagulo o dagli eritrociti il prima possibile, per evitare emolisi. Possono essere utilizzati campioni da provette con separatore di siero e da segmenti di sacche di raccolta. Il Sistema microElisa per HTLV-I/II Avioq non è influenzato da livelli elevati di lipidi (3000 mg/dl), bilirubina totale (20 mg/dl), fattore reumatoide o emoglobina (3051 mg/dl). I campioni possono essere inattivati al calore per 30 minuti a 56 °C senza perdita di reattività. Non sono state valutate le prestazioni di altri tipi di campioni, compresi fluido pleurico, saliva, fluido orale, eluati di gocce di sangue essiccato e campioni di sangue non umano.

Conservazione. I campioni devono essere privi di contaminazione microbica e possono essere conservati a 2-8 °C per un massimo di 14 giorni. Per la conservazione a lungo termine, i campioni devono essere congelati a -20 °C. I campioni devono essere miscelati dopo lo scongelamento. I campioni possono essere congelati e scongelati una volta senza perdita di reattività. Tuttavia, i campioni congelati e scongelati ripetutamente o contenenti materiale particellare possono determinare risultati errati.

Spedizione. I campioni da spedire devono essere confezionati in conformità ai regolamenti applicabili in materia di trasporto di agenti eziologici. I campioni possono essere spediti a temperatura ambiente, refrigerati (2-8 °C) o congelati (-20 °C o temperatura inferiore). Al ricevimento, i campioni devono essere conservati alla temperatura di conservazione raccomandata descritta sopra.

Campioni di donatori cadaverici

Prelievo: I campioni cadaverici possono essere prelevati da siero, provette con separatore siero o plasma EDTA. Sono preferibili campioni non emolizzati chiari. I precipitati presenti nei campioni devono essere rimossi mediante centrifugazione.

Conservazione: I campioni cadaverici possono essere conservati fino a un massimo di 14 giorni a 2-8° C e a -20 °C sottoposti a 4 cicli di congelamento/scongelo. Miscelare accuratamente dopo lo scongelamento e prima di eseguire il test.

Spedizione: I campioni da spedire devono essere confezionati in conformità ai regolamenti applicabili in materia di trasporto di agenti eziologici. I campioni possono essere spediti a una temperatura compresa tra -20 °C e 30 °C. Al momento della consegna, i campioni devono essere conservati alle temperature di conservazione raccomandate e non deve essere superato un totale di 14 giorni, tempo di spedizione inclusa.

PROCEDURA DEL SISTEMA DI ANALISI MICROELISA PER HTLV I/II AVIOQ

Materiali forniti

Strisce microElisa per HTLV-I/II
EnzAbody® per HTLV-I/II
Diluyente EnzAbody®
Diluyente per il campione
Soluzione di TMB
Soluzione di perossido
Siero di controllo negativo
Siero di controllo positivo per HTLV-I
Siero di controllo positivo per HTLV-II
Morsetto e barra
Pellicole sigillanti per piastre

Materiali aggiuntivi necessari ma non forniti

Strumentazione/apparecchiatura

Nota. Per qualsiasi strumento, esaminare il manuale fornito dal produttore per ulteriori informazioni relativamente a quanto segue:

- a) Installazione e requisiti particolari.
- b) Principi operativi, istruzioni, precauzioni e pericoli.
- c) Specifiche del produttore e prestazioni.
- d) Informazioni su riparazioni e manutenzione.
- e) Controllo di qualità.

Sistema di diluizione/dispensazione automatico o equivalente

Sistema di aspirazione/lavaggio

Il sistema di aspirazione/lavaggio deve essere in grado di dispensare un volume minimo di 300 µl ed essere in grado di eseguire un secondo ciclo di immersione (soaking) di 30 ± 5 secondi. I rifiuti aspirati devono essere contenuti in un sistema chiuso.

Pipetta multicanale a volume variabile regolabile in grado di erogare 50-300 µl ± 5 % e puntali

Micropipetta(e) in grado di erogare 20 µl ± 5 %, 100 µl ± 5 % e puntali

Incubatore- Un incubatore a secco, un blocco riscaldante o un dispositivo equivalente, in grado di mantenere una temperatura di 37 ± 2 °C.

Letto di piastre microElisa

Si può utilizzare qualsiasi lettore di piastre microElisa in grado di trasmettere luce a 450 nm ± 5 nm o a doppia lunghezza d'onda, 450 nm ± 5 nm e 620/630 nm ± 5 nm, come riferimento, con un intervallo di assorbanza lineare da 0 a 2,000, una deviazione inferiore a 0,005% UA/h e una larghezza di banda a metà altezza di 10 ± 2 nm.

Cronometro

Cilindro graduato, 50 ml e 1-2,5 l o equivalente

Reagenti/materiali monouso

Tampone di lavaggio concentrato (Numero di prodotto 559879)

Acido solforico 2N

Acqua purificata,³⁹ USP, tipo I NCCLS⁴¹ o equivalente

Porta-strisce con pozzetti non rivestiti

Carta assorbente

Recipienti a V monouso o contenitori equivalenti

Guanti monouso

Soluzione di ipoclorito di sodio (5%), candeggina o disinfettante equivalente

Opportuni contenitori per rifiuti biologici pericolosi, per materiali potenzialmente contaminati con agenti infettivi

Provette in polipropilene monouso con tappo (15 o 50 ml) o equivalenti

Materiali disponibili da Avioq Inc.

Tampone di lavaggio concentrato, 1 flacone da 100 ml (numero di prodotto 559879)

Tampone di lavaggio concentrato, 4 flaconi da 100 ml (numero di prodotto 559880)

Note procedurali

1. La mancata osservanza delle istruzioni contenute nel foglio illustrativo può determinare risultati errati o saggi non validi.
2. Le **strisce microElisa**, **EnzAbody per HTLV-I/II**, il **diluyente EnzAbody**, il **diluyente per il campione**, la **soluzione di TMB**, la **soluzione di perossido** e i **controlli** utilizzati in un particolare saggio devono possedere lo stesso numero di lotto di riferimento. Il tampone di lavaggio non è specifico per il numero di lotto del kit di riferimento e può essere utilizzato con qualsiasi numero di lotto del kit di riferimento. I materiali devono essere utilizzati prima della data di scadenza indicata sull'etichetta della confezione. I componenti e i campioni da analizzare devono essere a temperatura ambiente (15-30 °C) ed essere miscelati (come pertinente) prima di iniziare il test. Riporre i reagenti nuovamente a 2-8 °C dopo l'uso. Non conservarli congelati.
3. Le **strisce** della piastra microElisa sono rimovibili. Conservare le **strisce** non utilizzate come descritto nelle "ISTRUZIONI PER LA CONSERVAZIONE DEL KIT". Prima di iniziare il test, ispezionare il porta-strisce microElisa e controllare che tutte le strisce siano ben salde. I porta-strisce devono essere maneggiati con cautela, in modo da garantire che durante l'analisi nessuna striscia si stacchi. Le **strisce microElisa** possono essere numerate per garantire il reinserimento nella posizione corretta in caso si staccassero.
4. Le **strisce microElisa** e le **pellicole sigillanti per piastra** possono essere usate solo una volta.
5. Per evitare contaminazione, non toccare la parte superiore delle **strisce** o il bordo dei pozzetti con le dita o le punte della pipetta.
6. Tutti i reagenti e i campioni devono essere miscelati bene prima dell'uso. I **controlli positivo** e **negativo** possono essere miscelati con un agitatore vortex prima di essere pipettati. I **controlli positivo** e **negativo** devono essere erogati e diluiti in modo identico ai campioni. Su ogni piastra (porta-strisce) devono essere analizzati uno ciascuno dei **controlli positivi** e tre **controlli negativi**. Se vengono analizzati molteplici porta-strisce, assicurarsi di rispettare tutti i tempi di incubazione specificati.
7. Tutte le fasi di pipettatura devono essere eseguite con la massima cura e precisione. La contaminazione crociata tra i reagenti rende i risultati del test non validi. Usare micropipette per erogare in modo quantitativo campioni e reagenti. Per pipettare manualmente controlli e campioni, usare singoli puntali monouso, in modo da evitare il trascinarsi dei campioni. Evitare la contaminazione microbica o di qualsiasi altro tipo dei reagenti.
8. Se durante il saggio inavvertitamente un campione non venisse aggiunto, ovvero un pozzetto venisse saltato, i risultati del saggio per il campione potrebbero essere interpretati incorrettamente come non reattivi.
9. Evitare di aprire lo sportello dell'incubatore (37 °C) durante il periodo di incubazione.
10. Evitare la contaminazione chimica di reagenti e attrezzatura. Si raccomanda la manutenzione regolare del sistema di aspirazione/lavaggio, per prevenire il trascinarsi di anticorpi da campioni altamente reattivi a campioni non reattivi.
11. I lavatori per micropiastre devono essere lavati con abbondanti quantità di acqua dopo aver completato il lavaggio finale del saggio. Consultare le raccomandazioni del produttore riguardanti la manutenzione del sistema di gestione del liquido dei processori per micropiastre automatici.

12. Il lavaggio manuale delle piastre deve essere convalidato prima dell'uso. Si raccomanda l'uso di un lavatore per piastre automatico (per i requisiti del lavatore automatico, fare riferimento alla sezione **Materiali aggiuntivi ma non forniti**). Un lavaggio incompleto influisce negativamente sui risultati del test.
13. Il saggio deve essere completato senza interruzioni e nei tempi limite indicati nel foglio illustrativo.
14. Non versare nuovamente nei flaconi originali eventuali reagenti avanzati.
15. Non toccare la superficie esterna inferiore dei micropozzetti. Le impronte digitali o graffi possono interferire con la lettura dei micropozzetti.
16. Controllare che le **strisce microElisa** siano a livello nel porta-strisce durante l'esecuzione del test. Se necessario, pulire il fondo delle **strisce microElisa** con attenzione con una salvietta assorbente morbida senza filaccia per rimuovere eventuale umidità, polvere o detriti prima della lettura. Se necessario, si può rimuovere eventuale tampone essiccato dal fondo delle **strisce microElisa** passandolo con un panno morbido inumidito con dell'acqua e quindi con una salvietta morbida asciutta senza filaccia prima della lettura.
17. Valori di controllo negativi o positivi che non rientrano nell'intervallo previsto (vedere la sezione Controllo di qualità) possono indicare un problema tecnico o un deterioramento del prodotto.
18. Tutto il materiale per la pipettatura deve essere usato con cura, calibrato regolarmente e sottoposto a manutenzione secondo le istruzioni del produttore.
19. Il lettore per piastre microelisa può contenere un filtro di riferimento a 620 nm o 630 nm. Se viene usato uno strumento senza filtro di riferimento, aree sul fondo dei micropozzetti opache, graffiate o irregolari possono determinare letture inaccurate.
20. La presenza di bollicine nei pozzetti della **striscia microElisa** può determinare letture inaccurate dei micropozzetti. Prestare attenzione a controllare che non siano presenti bollicine.
21. Usare solo attrezzatura calibrata correttamente.

Procedura di lavaggio

1. Un lavaggio incompleto influenza negativamente i risultati del test. Il **tampone di lavaggio** deve essere a temperatura ambiente (15-30 °C) prima dell'uso.
2. Aspirare il contenuto del pozzetto in una beuta di scarto. Riempire quindi i pozzetti (circa 0,3 ml) con **tampone di lavaggio** e lasciarli immersi 30 ± 5 secondi, salvo sia stato convalidato un tempo diverso. Aspirare e ripetere il lavaggio e l'immersione altre tre volte, per un totale di quattro lavaggi.
3. Assicurarsi che le **strisce microElisa** siano aspirate completamente dopo l'aspirazione finale. Capovolgere il porta-strisce e picchiettarlo fermamente su un tovagliolo di carta pulito per assorbire eventuale **tampone di lavaggio** in eccesso, se necessario.

Procedura del test

1. Inserire nel porta-strisce il numero necessario di **strisce microElisa**. Se sono necessarie meno di dodici **strisce**, usare strisce non rivestite per completare la piastra se si usa un lavatore a 96 pozzetti.
2. Diluire 1:5 ciascun campione da analizzare e i **controlli** usando uno dei procedimenti indicati di seguito. Includere su ogni piastra tre pozzetti del **controllo negativo**, un pozzetto del **controllo positivo per HTLV-I** e un pozzetto del **controllo positivo per HTLV-II**, a prescindere dal numero di strisce usate. Miscelare con cura i **controlli** (es. con agitatore vortex) prima di pipettarli o di aliquotarli per l'uso automatico.

Attenzione. Non lasciare che i pozzetti delle **strisce microElisa** si essicchino dopo che il test è iniziato.

Aggiunta diretta del campione

Metodo manuale. Con una pipetta calibrata, aggiungere in ciascun pozzetto del test microElisa 80 µl di **diluyente per il campione**. Aggiungere 20 µl di campione o di **controllo** con un puntale per micropipetta monouso. Miscelare il campione e il **diluyente per campioni** aspirando ed erogando ripetutamente il campione (almeno 3-4 volte) con ciascuna aggiunta.

Metodo automatico. Il diluitoro/erogatore calibrato deve essere programmato in modo da erogare una diluizione 1:5, di solito 20 µl di campione o di **controllo** con 80 µl di **diluyente per campione** in ciascun pozzetto della **striscia microElisa**. La ritenzione dei puntali per pipetta deve essere calcolata, verificata e incorporata nella programmazione dello strumento.

Nota. Il campione può essere aggiunto al **diluyente per campione** come descritto nel metodo manuale.

Aggiunta indiretta del campione

Metodo manuale. Pipettare in una provetta pulita 120 µl di **diluyente per campione** seguiti da 30 µl di campione o **controllo**. Miscelare bene il contenuto. I campioni diluiti in provette tappate possono essere conservati a 2-8 °C per un massimo di 24 ore, ma devono essere a temperatura ambiente (15-30 °C) al momento del test. Pipettare 100 µl del campione diluito in ciascun pozzetto della **striscia microElisa**.

3. Coprire le **strisce** con pellicola sigillante adesiva per piastre o un prodotto equivalente. Se si usa **pellicola sigillante per piastre**, assicurarsi che tutti i pozzetti siano coperti. Entro 30 minuti, incubare a 37 ± 2 °C per 60 ± 5 minuti.
4. Dopo l'incubazione, eliminare la pellicola sigillante per piastre dopo l'uso, se del caso. Non riutilizzarla. Lavare e lasciare immerso ogni pozzetto in **tampone di lavaggio** quattro volte (vedere la "Procedura di lavaggio").
5. Pipettare in ciascun pozzetto 100 µl di **soluzione di lavoro EnzAbody**. (Per istruzioni vedere la sezione "PREPARAZIONE DEI REAGENTI").

Attenzione. Non lasciare che il **concentrato EnzAbody** o la **soluzione di lavoro EnzAbody** contaminino il **substrato TMB**. Se si usa lo stesso strumento per aggiungere entrambi i reagenti, si devono utilizzare nuovi puntali monouso.

6. Coprire le **strisce** con **pellicola sigillante per piastre** adesiva o un prodotto equivalente. Se si usa **pellicola sigillante per piastre**, assicurarsi che tutti i pozzetti siano coperti. Incubare a 37 ± 2 °C per 60 ± 5 minuti.

Se si usa il Sistema Summit ORTHO® (OSS), incubare a 37 ± 2 °C per 30 ± 5 minuti.

7. Dopo l'incubazione, eliminare la **pellicola sigillante per piastre** dopo l'uso, se del caso. Non riutilizzarla. Lavare e lasciare immerso ogni pozzetto in **tampone di lavaggio** quattro volte. Vedere la sezione "Procedura di lavaggio".
8. Pipettare in ciascun pozzetto 100 µl di **substrato TMB**. Non coprire con pellicola sigillante adesiva per piastre. (Per istruzioni vedere la sezione "PREPARAZIONE DEI REAGENTI").
9. Incubare a temperatura ambiente (15-30 °C) per 30 ± 5 minuti.
10. Fermare la reazione aggiungendo a ciascun pozzetto 100 µl di **acido solforico 2N** (mantenere la stessa sequenza e gli stessi intervalli di tempo utilizzati per l'aggiunta del **substrato TMB**). **Le piastre devono essere lette entro due ore.**
11. Azzerare il lettore microElisa rispetto all'aria (senza porta-strisce e **strisce**) e leggere l'assorbanza della soluzione in ciascun pozzetto a $450 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$ (singola lunghezza d'onda) o $450 \pm 5 \text{ nm}$ e $620/630 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$ come riferimento (doppia lunghezza d'onda).

Controllo di qualità

Convalida dei valori del controllo negativo (CN). L'assorbanza del CN deve essere maggiore o uguale a 0,000 e inferiore o uguale a 0,120. Eliminare eventuali valori per il CN che non rientrano in questo intervallo. Se due o più valori sono inferiori a 0,000 o superiori a 0,120, il test non è valido e deve essere ripetuto. Calcolare la media del CN (CNX) dei valori di controllo rimanenti.

Convalida dei valori del controllo positivo per HTLV-I (CP-I) e HTLV-II (CP-II). L'assorbanza dei CP-I e CP-II deve essere maggiore o uguale a 0,500. Se il valore del CP-I e/o del CP-II è inferiore alla specifica, il test non è valido e deve essere ripetuto.

Validità del test. Un test è valido se i valori del controllo positivo e negativo sono convalidati e

$$(CP-I) - CNX \geq 0,380 \quad (CP-II) - CNX \geq 0,380$$

Se i risultati non soddisfano questi criteri, la tecnica potrebbe essere sospetta e il test non è valido e deve essere ripetuto.

RISULTATI

Calcoli

I calcoli devono essere eseguiti separatamente per ciascun porta-strisce.

Valore soglia. Se il test è valido, calcolare il valore soglia come segue:

$$\text{Valore soglia} = CNX = 0,330$$

Un campione analizzato è non reattivo se la sua assorbanza è maggiore o uguale a 0,000 e inferiore al valore soglia.

Un campione analizzato è reattivo se la sua assorbanza è maggiore o uguale al valore soglia.

Calcoli esemplificativi

Assorbanza (singola lunghezza d'onda)

CN	=	0,065, 0,070, 0,075
CNX	=	0,070
CP-I	=	1,110
CP-II	=	1,050

Assorbanza (doppia lunghezza d'onda)

CN	=	0,034, 0,030, 0,035
CNX	=	0,033
CP-I	=	1,073
CP-II	=	1,013

Criteri di accettabilità

Eliminare eventuali valori di assorbanza dei controlli che non soddisfano i seguenti criteri:

$0,000 \leq CN \leq 0,120$	Nessuno eliminato
$CP-I \geq 0,500$	Nessuno eliminato
$CP-II \geq 0,500$	Nessuno eliminato

Controllare che i seguenti valori rientrino nei criteri di accettabilità specificati.

(Singola lunghezza d'onda)

$(CP-I) - CNX \geq 0,380$	
$(CP-II) - CNX \geq 0,380$	
$1,110 - 0,070 = 1,040$	Superato
$1,050 - 0,070 = 0,980$	Superato

(Doppia lunghezza d'onda)

$1,073 - 0,033 = 1,040$	Superato
$1,013 - 0,033 = 0,980$	Superato

Validità del test (Singola lunghezza d'onda)

Superato

Validità del test (doppia lunghezza d'onda)

Superato

Calcolare il valore soglia (singola lunghezza d'onda)

$$\begin{aligned} \text{Valore soglia} &= CNX + 0,330 \\ &= 0,070 + 0,330 \\ &= 0,400 \end{aligned}$$

Calcolare il valore soglia (doppia lunghezza d'onda)

$$\begin{aligned} \text{Valore soglia} &= CNX + 0,330 \\ &= 0,033 + 0,330 \\ &= 0,363 \end{aligned}$$

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

1. I campioni con valori di assorbanza pari o superiori a 0,000 e inferiori al valore soglia sono ritenuti non reattivi in base ai criteri del test per HTLV-I/II Avioq e possono essere ritenuti negativi per gli anticorpi anti-HTLV-I e HTLV-II. Un risultato negativo del test non esclude la possibilità di esposizione a HTLV-I/II o di infezione da HTLV-I/II.
2. I risultati dei campioni con valori di assorbanza inferiori a 0,000 devono essere analizzati nuovamente individualmente per verificare il risultato iniziale. Se ripetendo il test il campione presenta un valore di assorbanza inferiore al valore soglia può essere ritenuto negativo per gli anticorpi anti-HTLV-I e HTLV-II in base ai criteri del test per HTLV-I/II Avioq.
3. I campioni con valori di assorbanza pari o superiori al valore soglia sono ritenuti inizialmente reattivi in base ai criteri del test per HTLV-I/II Avioq, ma prima dell'interpretazione il campione deve essere nuovamente analizzato in duplicato utilizzando il saggio per HTLV-I/II Avioq. Se uno qualsiasi dei test ripetuti in duplicato è reattivo, il campione è ritenuto ripetutamente reattivo per gli anticorpi anti-HTLV-I e/o HTLV-II in base al Sistema microElisa per HTLV-I/II Avioq.
4. Campioni inizialmente reattivi che non reagiscono in entrambi i test ripetuti in duplicato sono ritenuti negativi per gli anticorpi anti-HTLV-I/II.
5. Nella maggior parte dei casi è opportuno analizzare ripetutamente i campioni reattivi mediante test aggiuntivi più specifici (**LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA**). I campioni che risultano ripetutamente reattivi mediante ELISA e positivi mediante ulteriori test più specifici sono ritenuti positivi per gli anticorpi anti-HTLV-I e/o HTLV-II. L'interpretazione dei risultati di campioni risultati ripetutamente reattivi mediante ELISA e negativi o non determinati in ulteriori test più specifici è poco chiara; ulteriori chiarimenti possono essere ottenuti analizzando un altro campione prelevato dallo stesso individuo da tre a sei mesi più tardi.

LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

Attenersi rigorosamente alle sezioni "PROCEDURA DEL TEST" e "INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI" del Sistema microElisa per HTLV-I/II Avioq quando si valuta la presenza di anticorpi anti-HTLV-I e/o HTLV-II in plasma o siero di singoli soggetti. Il saggio è progettato e convalidato per l'uso con siero o plasma umano di singoli pazienti e campioni di donatori e da campioni di siero o plasma raccolto da donatori cadavere. Le prestazioni non sono state valutate in altri tipi di campioni (ossia, fluido pleurico, saliva, fluido orale, eluati di gocce di sangue essiccato, campioni non umani, ecc.), sangue aggregato o plasma trattato e prodotti ottenuti a partire da questi aggregati.

Se l'aggiunta del campione non avviene come indicato nella sezione "PROCEDURA DEL TEST", il test potrebbe dare un risultato falso negativo.

Il Sistema microElisa per HTLV-I/II Avioq rileva anticorpi anti-HTLV-I e/o HTLV-II nel sangue ed è pertanto utile come strumento di screening del sangue donato per prevenire la trasmissione di HTLV-I e/o HTLV-II a riceventi di emocomponenti cellulari e come ausilio nella diagnosi clinica dell'infezione da HTLV-I o HTLV-II e delle patologie correlate. È noto che l'infezione da HTLV-I acquisita tramite trasfusione di emoderivati infetti può provocare malattie nei riceventi.³⁶

Le linee guida⁴⁰ pubblicate dal Servizio Sanitario Nazionale statunitense raccomandano di analizzare i campioni ripetutamente reattivi mediante ulteriori test più specifici quali Western Blot (WB) e radioimmunoprecipitazione (RIPA). Questi test supplementari devono essere usati in aggiunta a test con peptide specifico per tipo di virus o test con sonda per differenziare HTLV-I e HTLV-II. L'interpretazione di tali test deve essere conforme a tali linee guida pubblicate.

Una persona il cui plasma risulta reattivo sia nel test ELISA sia in un ulteriore test più specifico è ritenuta infetta con il virus HTLV-I o HTLV-II. Le implicazioni mediche della sieropositività a HTLV-II sono sconosciute. Offrire consulenza e valutazioni mediche appropriate, in conformità alle linee guida pubblicate dal Servizio Sanitario Nazionale.⁴⁰ Tale valutazione deve essere ritenuta una parte importante del test per gli anticorpi anti-HTLV-I/II e deve includere la conferma dei risultati del test su un campione prelevato di fresco.

L'ATL e la TSP/HAM sono sindromi cliniche, la cui diagnosi può essere effettuata solo clinicamente. La sola analisi con il Sistema microElisa per HTLV-I/II Avioq non può essere usata per diagnosticare queste condizioni, anche se l'indagine raccomandata dei campioni reattivi conferma la presenza di anticorpi anti-HTLV-I. Un risultato negativo del test in qualsiasi momento durante l'indagine sierologica non preclude la possibilità di esposizione ad HTLV-I o HTLV-II o di infezione da HTLV-I o HTLV-II. Valutare la ripetizione del test usando il Sistema microElisa per HTLV-I/II Avioq in caso di sospetto clinico di infezione da HTLV-I o HTLV-II. Risultati negativi del saggio in soggetti con pregressa esposizione a HTLV-I e/o HTLV-II possono essere dovuti a livelli di anticorpi inferiori al limite di rilevazione del saggio o a una mancanza di reattività degli anticorpi agli antigeni di HTLV usati nel saggio stesso.

Sono da attendersi risultati falsi positivi con un kit di questo tipo. La percentuale di falsi reattivi dipende dalla prevalenza di anticorpi anti-HTLV-I e/o HTLV-II nella popolazione esaminata e dalla sensibilità e dalla specificità del kit di analisi del produttore utilizzato.

RISULTATI PREVISTI

La percentuale di campioni che risultano ripetutamente reattivi in una normale popolazione di donatori differisce a seconda della prevalenza di anticorpi anti-HTLV-I o HTLV-II in quella particolare area geografica. Aree ad elevata prevalenza di HTLV-I includono: parti dell'Africa, Micronesia, Giappone, le isole Hawaii e le isole caraibiche. Aree ad elevata prevalenza di HTLV-II includono: popolazioni di tossicodipendenti per via endovenosa e varie tribù amerindie in Nord e Sud America. L'esperienza con donatori di sangue esaminati negli USA è riportata nella sezione Specificità. L'esperienza su popolazioni con malattia da HTLV-I o ad alto rischio di infezione da HTLV-I o HTLV-II è riepilogata nelle sezioni Sensibilità e Popolazioni endemiche.

PRESTAZIONI DEL SAGGIO

Riproducibilità

Replicati di campioni positivi per gli anticorpi anti-HTLV-I e HTLV-II con reattività di vario grado, campioni negativi e controlli dei kit sono stati analizzati presso vari centri (n=3), usando vari lotti di kit (n=3) e vari tecnici (n=2), in giorni diversi (n=4). La precisione totale, inter-saggio e intra-saggio è riportata nella Tabella 1 seguente.

Tabella 1. Riproducibilità del saggio

ID	N	Media	Totale		Inter-saggio		Intra-saggio	
			DS	CV	DS	CV	DS	CV
HTLV-I S1	288	2,93	0,346	11,8	0,328	11,2	0,115	3,9
HTLV-I S2	288	1,95	0,246	12,6	0,231	11,8	0,090	4,6
HTLV-I S3	288	1,55	0,228	14,7	0,214	13,8	0,080	5,2
HTLV-I S4	288	1,62	0,206	12,7	0,196	12,1	0,067	4,1
HTLV-I S5	288	0,19	0,024	12,6	0,018	9,5	0,016	8,4
HTLV-II S1	288	3,13	0,348	11,1	0,331	10,6	0,113	3,6
HTLV-II S2	288	2,13	0,270	12,7	0,241	11,3	0,123	5,8
HTLV-II S3	288	2,16	0,248	11,5	0,234	10,8	0,084	3,9
HTLV-II S4	288	1,41	0,201	14,3	0,184	13,0	0,082	5,8
HTLV-II S5	288	0,18	0,029	15,9	0,020	11,1	0,021	11,7
CN	216	0,18	0,027	15,0	0,021	11,7	0,018	10,0
CP HTLV-I	72	2,69	0,338	12,6				

ID Identificazione membro pannello
N Numero di replicati
MEDIA Rapporto segnale/soglia (SCR) medio
DS Deviazione standard del SCR
CV Coefficiente di variazione del SCR

Specificità

La specificità del saggio è stato valutata esaminando 11.415 campioni normali di siero e plasma umano prelevati presso vari centri. Un resoconto dettagliato dei dati, in base al centro e al tipo di campione, è riepilogato nella Tabella 2 seguente. Assumendo una prevalenza nulla di anticorpi anti-HTLV-I e HTLV-II nei donatori umani normali, la specificità stimata globale del dosaggio è risultata del 99,95% (limiti di confidenza al 95% di 99,89%-99,98%). Per ogni popolazione sono inclusi anche i limiti di confidenza al 95% per il tasso di campioni ripetutamente reattivi e la specificità stimata per ciascun centro e tipo di campione.

Tabella 2. Specificità stimata in popolazioni di donatori random di sangue intero e plasma e plasma originale

	Numero esaminato	Inizialmente non reattivi	Inizialmente reattivi	Ripetutamente reattivi (%)	Ripetutamente reattivi (%)	Limiti di confidenza al 95% dei ripetutam. reattivi** (%)		Positivi a ulteriori test***	*Specificità stimata (%)	Limiti di confidenza al 95% della specificità** (%)	
						0,004	0,334			99,58	99,99
Centro 1 Siero	1315	1314	1	1	0,08	0,004	0,334	0	99,92	99,58	99,99
Centro 2 Siero	3754	3753	1	1	0,03	0,002	0,117	0	99,97	99,85	99,99
Centro 1 Plasma	1255	1255	0	0	0,00	0,000	0,153	0	100,00	99,71	100,00
Centro 2 Plasma	3812	3809	3	3	0,08	0,020	0,204	0	99,92	99,77	99,98
Centro Plasma originale	1279	1276	3	1	0,08	0,004	0,344	0	99,92	99,57	99,99

* =
$$\frac{(\text{Numero esaminato} - \text{Numero di campioni ripetutamente reattivi}) \times 100}{(\text{Numero esaminato} - \text{Numero di positivi confermati})}$$

** = I limiti di confidenza per la specificità sono stati calcolati usando il metodo esatto.

*** = Un risultato positivo in questi studi è stato definito come la presenza di anticorpi a due prodotti genici (gag, p19 e/o p24 ed env, gp46 e/o 61/68) usando Western Blot e/o RIPA.

Ulteriori test supplementari e la differenziazione tra tipo HTLV-I e HTLV-II sono stati effettuati usando i seguenti saggi per uso di ricerca: reattività ai peptidi gp46-I o gp46-II ricombinanti o nativi su Western Blot, saggi immunoenzimatici (EIA) del peptide di HTLV-I e HTLV-II, saggio di immunofluorescenza (IFA) di HTLV-I e HTLV-II e/o PCR (usando primer specifici per le regioni *tax* e *pol*).

Reattività con patologie mediche potenzialmente interferenti

Con il saggio sono stati esaminati campioni di soggetti affetti da patologie mediche che possono provocare reattività non specifica. I campioni esaminati sono indicati nella Tabella 3 seguente. Tutti i campioni sono risultati non reattivi.

Tabella 3. Reattività su campioni di soggetti con patologie mediche non correlate all'infezione da HTLV-I o HTLV-II

Categoria del campione	Numero di campioni esaminati	Numero di campioni inizialmente reattivi
Anticorpi anti-citomegalovirus	10	0
Anticorpi anti-virus di Epstein-Barr	10	0
Anticorpi anti-herpes simplex	10	0
Anticorpi anti-HIV-1	10	0
Anticorpi anti-HIV-2	10	0
Antigene di superficie dell'epatite B	10	0
Anticorpi anti-sifilide	10	0
Anticorpi antinucleo	10	0
Trasfusioni multiple	10	0
Donne multipare	10	0
Fattore reumatoide	10	0
Anticorpi anti-HCV	10	0
Ipergammaglobulinemia IgG	10	0
Ipergammaglobulinemia IgM	10	0
Anticorpi anti-toxoplasmosi	10	0
Riceventi di vaccino antinfluenzale	36	0

Reattività su campioni contenenti sostanze potenzialmente interferenti

Campioni lipemici (n=10), emolizzati (n=10) o contenenti bilirubina innalzata (n=10) sono stati analizzati per reattività non specifica nel saggio. Tutti i campioni sono risultati non reattivi. Inoltre, siccome il saggio include una proteina ricombinante prodotta in *E. coli*, una serie di ventidue (22) campioni risultati precedentemente positivi per la presenza di anticorpi anti *E. coli* è stata esaminata per valutare la potenziale reattività crociata nel sistema del test. Tutti i campioni sono risultati non reattivi.

Sensibilità

La sensibilità del saggio è stata valutata esaminando i campioni risultati sieropositivi mediante ulteriori test per uso di ricerca (Western Blot, RIPA, IFA e in alcuni casi PCR). I campioni provenivano da popolazioni con patologie associate a HTLV, popolazioni di tossicodipendenti per via endovenosa e donatori di sangue con infezione da HTLV. Un elenco dei risultati è fornito nella Tabella 4 seguente. Il saggio è risultato reattivo con tutti i 636 campioni positivi agli ulteriori test per uso di ricerca. Il saggio ha una sensibilità stimata del 100% (intervallo 99,97%-100%) per i 636 campioni positivi nei test supplementari per uso di ricerca mediante la distribuzione binomiale a una confidenza del 95%.

Tabella 4. Reattività in test supplementari di campioni positivi per gli anticorpi anti-HTLV-I, HTLV-II e HTLV-I/II

Gruppo	Risultato del test supplementare ^a	N. esaminato	N. ripetutamente reattivi con test per HTLV-I approvati	N. ripetutamente reattivi con il test per HTLV-I/II Avioq
Leucemia a cellule T dell'adulto	HTLV-I	47	47	47
Paraparesi spastica tropicale	HTLV-I	43	43	43
Linfoma nasofaringeo	HTLV-I	1	1	1
Tossicodipendenti per via endovenosa	HTLV-I	5	5	5
	HTLV-II	95	94 ^c	95
Pazienti ricoverati in ospedale ^b	HTLV-I	107	107	107
	HTLV-II	38	38	38
Donatori di sangue	HTLV-I	146	146	146
	HTLV-II	138	138	138
	HTLV-I/II	16	16	16
TOTALE		636	635	636

^a Un risultato positivo in questi studi è stato definito come la presenza di anticorpi a due prodotti genici (gag, p19 e/o p24 ed env, gp46 e/o 61/68) usando Western Blot e/o RIPA.

Ulteriori test supplementari e la differenziazione tra tipo HTLV-I e HTLV-II sono stati effettuati usando i seguenti saggi per uso di ricerca: reattività ai peptidi gp46-I o gp46-II ricombinanti o nativi su Western Blot, saggi immunoenzimatici (EIA) del peptide di HTLV-I e HTLV-II, immunofluorescenza (IFA) di HTLV-I e HTLV-II e/o PCR (usando primer specifici per le regioni *tax* e *pol*).

^b Asintomatici e con alcuni sintomi che suggerivano malattia da HTLV.

^c Il test per HTLV-I approvato non ha rilevato un tossicodipendente per via endovenosa (valori segnale/soglia 0,8, 0,9, 0,9) con risultato indeterminato mediante Western Blot (solo p21) e caratterizzato come HTLV-II mediante PCR.

Popolazioni in aree endemiche per HTLV-I e HTLV-II

Le prestazioni del saggio sono state valutate su campioni di una popolazione proveniente da un'area endemica per HTLV-I e su due popolazioni provenienti da aree endemiche per HTLV-II. Per la popolazione proveniente dall'area endemica per HTLV-I sono stati valutati 532 campioni da una popolazione delle isole del Pacifico ad alta prevalenza. 20 campioni in questa popolazione sono risultati positivi per gli anticorpi anti-HTLV-I mediante metodi supplementari per uso di ricerca (Western Blot, IFA o RIPA). Tutti i 20 campioni positivi per gli anticorpi anti-HTLV-I sono risultati ripetutamente reattivi mediante il presente saggio e un saggio per HTLV-I approvato. Altri 3 campioni ripetutamente reattivi mediante il test per HTLV-I approvato sono risultati non reattivi con il presente saggio; nessuno di questi 3 campioni è risultato positivo per anticorpi anti-HTLV-I nei test supplementari utilizzati. I risultati di questo studio sono riepilogati nella tabella seguente.

Negli studi delle aree endemiche per HTLV-II, è stato ottenuto un totale di 525 campioni da una popolazione di nativi americani in New Mexico (361) e da una tribù amazzonica, Kapayo, in Brasile (164). In entrambe le popolazioni, 60 campioni sono risultati positivi per HTLV-II mediante test supplementari per uso di ricerca (Western Blot, IFA, RIPA o in alcuni casi PCR). 58 campioni sono risultati ripetutamente reattivi con il presente saggio. I due campioni non reattivi mediante il presente saggio appartenevano alla popolazione di indiani Kapayo. Tutti i campioni positivi per HTLV-II mediante test supplementari sulla popolazione di nativi americani sono risultati ripetutamente reattivi in questo saggio. Un campione della popolazione di nativi americani è risultato ripetutamente reattivo in questo saggio, ma non è risultato positivo per anticorpi anti-HTLV-II nei test supplementari (Western Blot). I risultati di questo studio sono riepilogati nella Tabella 5 seguente.

Tabella 5. Reattività su campioni da popolazioni in aree endemiche per HTLV-I e HTLV-II

Area endemica	N. esaminato	N. di positivi mediante test supplementari ^a	N. ripetutamente reattivi	N. (percentuale) di positivi nei test supplementari ripetutamente reattivi all'EIA
Isole del Pacifico (HTLV-I)	532	20 ^b	20	20 (100%)
New Mexico (HTLV-II)	361	7 ^c	8	7 (100%)
Brasile (HTLV-II)	164	53 ^c	51 ^d	51 (96,2%)

^a Un risultato positivo in questi studi è stato definito come la presenza di anticorpi a due prodotti genici (gag, p19 e/o p24 ed env, gp46 e/o 61/68) usando Western Blot e/o RIPA.

Ulteriori test supplementari e la differenziazione tra tipo HTLV-I e HTLV-II sono stati effettuati usando i seguenti saggi per uso di ricerca: reattività ai peptidi gp46-I o gp46-II ricombinanti o nativi su Western Blot, saggio immunoenzimatico (EIA) del peptide di HTLV-I e HTLV-II, immunofluorescenza (IFA) di HTLV-I e HTLV-II e/o PCR (usando primer specifici per le regioni tax e pol).

^b Il numero di campioni positivi nei test supplementari è basato sui risultati dei test per uso di ricerca Western Blot, IFA e RIPA per HTLV-I/HTLV-II di eventuali campioni ripetutamente reattivi o inizialmente reattivi entro una zona grigia negativa del 20% mediante ELISA.

^c Il numero di campioni positivi nei test supplementari è basato sui risultati dei test per uso di ricerca Western Blot, IFA e RIPA per HTLV-I/HTLV-II di tutti i campioni (361 dal New Mexico e 164 dal Brasile).

^d Due campioni sono risultati indeterminati mediante Western Blot, positivi per gli anticorpi anti-HTLV mediante RIPA, positivi per gli anticorpi anti-HTLV-II mediante IFA e positivi per HTLV DNA mediante PCR.

PRESTAZIONI DEL SAGGIO PRODOTTO PRESSO IL NUOVO SITO

Il Sistema microElisa per HTLV-I/II Avioq è identico al Sistema microElisa per HTLV-I/II Vironostika® precedentemente prodotto da bioMerieux, Inc., con un cambiamento del sito di produzione. Studi condotti per valutare le prestazioni del Sistema microElisa per HTLV-I/II Avioq prodotto presso il nuovo sito hanno dimostrato riproducibilità, specificità e sensibilità comparabili ai kit del test prodotti nel sito originale.

Riproducibilità

Allo scopo di dimostrare la riproducibilità del Sistema microElisa per HTLV-I/II Avioq prodotto nel nuovo sito, un pannello composto da campioni positivi per gli anticorpi anti-HTLV-I e HTLV-II con reattività di vario grado (quattro HTLV-I e quattro HTLV-II) e due campioni negativi sono stati esaminati con tre lotti di kit in un periodo di quattro giorni usando due analisti che si sono avvalsi del metodo manuale. Ogni campione è stato analizzato quattro volte in ciascuno dei quattro giorni. Il CV totale per i campioni positivi usando i tre lotti di convalida era compreso tra 8,9 e 19,7% (n=96) rispetto al CV totale di 11,1-15,9% per i campioni positivi con il saggio prodotto nel sito precedente (n=288, 3 siti, 3 lotti, 2 operatori, 4 giorni e test eseguiti quattro volte).

Tabella 6. Riepilogo dello studio di riproducibilità del Sistema microElisa per HTLV-I/II Avioq (metodo manuale)

ID pannello	Stato	N	S/C medio	Totale				Inter-saggio		Intra-saggio	
				DS	%CV	S/C IC 95% inferiore	S/C IC 95% superiore	DS	%CV	DS	%CV
HTLV-I S1	Pos	96	3,0	0,276	8,9	3,04	3,15	0,244	7,9	0,136	4,4
HTLV-I S2	Pos	96	2,92	0,300	10,3	2,85	2,98	0,246	8,4	0,176	6,0
HTLV-I S3	Pos	96	2,50	0,312	12,5	2,44	2,56	0,259	10,4	0,180	7,2
HTLV-I S4	Pos	96	2,18	0,226	10,4	2,13	2,22	0,190	8,7	0,126	5,8
HTLV-I S5 ^a	Neg	96	0,25	0,023	9,2	0,24	0,25	0,020	8,0	0,012	4,8
HTLV-II S1	Pos	96	3,29	0,561	17,1	3,17	3,40	0,482	14,7	0,298	9,1
HTLV-II S2	Pos	96	3,15	0,569	18,1	3,03	3,26	0,537	17,1	0,210	6,7
HTLV-II S3	Pos	96	2,46	0,486	19,7	2,36	2,56	0,462	18,8	0,170	6,9
HTLV-II S4	Pos	96	2,22	0,364	16,4	2,14	2,29	0,300	13,5	0,214	9,6
HTLV-II S5 ^a	Neg	96	0,23	0,020	8,7	0,22	0,23	0,016	7,2	0,012	5,4

^a Campione negativo per anticorpi anti-HTLV-I e anticorpi anti-HTLV-II

Specificità

Allo scopo di dimostrare che la specificità clinica del Sistema microElisa per HTLV-I/II Avioq prodotto presso il nuovo sito è comparabile a quella del test approvato originariamente, campioni di siero (n = 1000) e plasma (n = 1000) di stato sconosciuto provenienti da popolazioni a basso rischio (donatori di sangue) sono stati esaminati con tre lotti di kit usando il metodo manuale. Ogni lotto è stato usato per analizzare numeri simili di campioni. Tra i 2000 campioni esaminati, due sono risultati ripetutamente reattivi (vedere la Tabella 7). Entrambi i campioni sono risultati negativi mediante IFA e Western Blot per HTLV-I e HTLV-II per uso di ricerca. Pertanto, la specificità stimata del dosaggio Avioq osservata in questo studio è di 1998/2000 = 99,90% (IC 95% 99,44-100%), rispetto a 11409/11415 = 99,95% (IC 95% di 99,89-99,98%) per il saggio prodotto nel sito precedente.

Tabella 7. Specificità stimata del Sistema microElisa per HTLV-I/II Avioq in donatori di sangue random

	Numero esaminato	Non reattivi	Ripetutamente reattivi	Positivi nei test supplementari	Specificità stimata (%)	Limiti di confidenza al 95% della specificità**	
Siero	1000	999	1	0	99,90	99,44	100,00
Plasma	1000	999	1	0	99,90	99,44	100,00

Sensibilità

Allo scopo di valutare se la sensibilità clinica del Sistema microElisa per HTLV-I/II Avioq prodotto presso il nuovo sito sia comparabile a quella del test approvato originariamente, un pannello di 200 campioni di siero o plasma da bioteca sieropositivi (100 HTLV-I e 100 HTLV-II) è stato esaminato con tre lotti di kit usando il metodo manuale (Tabella 8). Tutti i campioni sono precedentemente risultati reattivi a un test di screening di donatori per HTLV-I/II approvato dalla FDA e sono stati confermati positivi per gli anticorpi anti-HTLV-I/II con un test supplementare per uso di ricerca (WB, IFA e/o RIPA). L'ottantasette per cento dei campioni proveniva da donatori di sangue statunitensi e nessuno era stato analizzato usando il saggio Vironostika precedentemente approvato. La sensibilità stimata del saggio osservata in questo studio è stata di 200/200 = 100% (IC 95% 98,17-100%) rispetto a 636/636 = 100% (IC 95% di 99,97-100%) per il saggio prodotto nel sito precedente.

Tabella 8. Reattività del Sistema microElisa per HTLV-I/II Avioq su campioni da bioteca sieropositivi

Numero esaminato	Numero ripetutamente reattivi	Numero non reattivi	Sensibilità stimata (%)	Limiti di confidenza al 95% della sensibilità (%)	
200	200	0	100,00	98,17	100,00

PRESTAZIONI DEL SISTEMA SUMMIT ORTHO® (OSS) CON IL SISTEMA DI MANIPOLAZIONE DEI CAMPIONI SUMMIT ORTHO® (PIPETTATORE SUMMIT)

Riproducibilità

La riproducibilità del Sistema microElisa per HTLV-I/II Avioq mediante lo strumento OSS è stata valutata usando un pannello di 10 campioni esaminati in duplicato (quattro HTLV-I positivi, quattro HTLV-II-positivi e due negativi). Lo studio è stato condotto presso due centri con un totale di tre strumenti due volte al giorno per quattro giorni, usando un lotto di convalida del kit del saggio ed è stato confrontato con l'analisi del pannello usando il metodo manuale con lo stesso lotto di convalida. I risultati di questo studio sono riepilogati in Tabella 9.

Tabella 9. Riepilogo dello studio di riproducibilità per il Sistema microElisa per HTLV-I/II Avioq mediante OSS (metodo automatico)

ID pannello	Stato	N	S/C medio	Totale				Inter-centro		Intra-centro	
				DS	%CV	S/C IC 95% inferiore	S/C IC 95% superiore	DS	%CV	DS	%CV
HTLV-I S1	Pos	96	4,54	0,375	8,3	4,47	4,62	0,305	6,7	0,226	5,0
HTLV-I S2	Pos	96	4,03	0,366	9,1	3,95	4,10	0,288	7,1	0,232	5,8
HTLV-I S3	Pos	96	3,63	0,325	8,9	3,57	3,70	0,253	7,0	0,208	5,7
HTLV-I S4	Pos	96	2,84	0,283	10,0	2,78	2,89	0,218	7,7	0,184	6,5
HTLV-I S5 ^a	Neg	96	0,26	0,052	20,3	0,25	0,27	0,045	17,5	0,028	10,8
HTLV-II S1	Pos	96	5,86	0,421	7,2	5,77	5,94	0,323	5,5	0,276	4,7
HTLV-II S2	Pos	96	5,75	0,347	6,0	5,68	5,82	0,270	4,7	0,224	3,9
HTLV-II S3	Pos	96	4,95	0,463	9,4	4,85	5,04	0,385	7,8	0,268	5,4
HTLV-II S4	Pos	96	4,22	0,332	7,9	4,16	4,29	0,277	6,6	0,189	4,5
HTLV-II S5 ^a	Neg	96	0,13	0,028	20,7	0,13	0,14	0,023	17,0	0,016	12,1

^a Campione negativo per anticorpi anti-HTLV-I e anticorpi anti-HTLV-II

Lo studio di riproducibilità ha dimostrato che la variabilità totale per i campioni positivi varia dal 6% al 10% usando il metodo OSS rispetto all'8,9-19,7% per i campioni positivi usando il metodo manuale (vedere Tabella 6).

Sensibilità analitica

Per dimostrare che la sensibilità analitica del Sistema microElisa per HTLV-I/II Avioq mediante lo strumento OSS è comparabile al metodo manuale, otto pannelli di diluizione (diluizioni seriali 1:2 di quattro campioni positivi per gli anticorpi anti-HTLV-I e quattro positivi per anticorpi anti-HTLV-II fino al valore soglia del saggio) sono stati analizzati usando sia il metodo manuale sia quello automatico. Per valutare la correlazione tra i due metodi è stata effettuata l'analisi di regressione di Deming. Questa analisi ha dimostrato che esiste un'elevata correlazione per il rapporto segnale/soglia (S/CO) per entrambi i formati, con un coefficiente di correlazione di 0,94. Per dimostrare l'equivalenza del rapporto S/CO tra i due metodi è stato effettuato un t-test appaiato. Il S/CO globale medio per il metodo manuale è risultato di 3,143 (n=459) rispetto a una media generale di 4,198 (n=459) con lo strumento OSS. Sebbene questa differenza sia statisticamente significativa, la sensibilità alle diluizioni di endpoint era comparabile per i due metodi (ossia il saggio con lo strumento OSS non presentava una minore sensibilità).

Sensibilità

Un pannello di 100 campioni di donatori di sangue ripetutamente reattivi con un test approvato dalla FDA è stato analizzato usando il Sistema microElisa per HTLV-I/II Avioq mediante entrambi i metodi (metodo manuale e metodo automatico con lo strumento OSS). Novantacinque (95) campioni sono risultati ripetutamente reattivi (concordanza del 100%) usando entrambi i metodi del saggio (manuale e automatico). Cinque (5) dei 100 campioni nel pannello sono risultati non reattivi usando il saggio Avioq (con entrambi il metodo manuale e automatico). Ulteriori test di conferma su questi cinque campioni hanno indicato che nessuno era positivo in base a un test supplementare. Va notato che questi campioni sono stati sottoposti precedentemente a cicli di congelamento/scongelo prima dell'analisi; i dati ottenuti con il test Avioq indicano che i campioni possono essere congelati e scongelati una volta senza perdita di reattività.

Il rapporto S/CO dei 95 campioni rilevati mediante il saggio Avioq variava tra 1,058 e 8,400 per il metodo manuale e 1,280 e 7,403 per il metodo automatico con OSS; il coefficiente di correlazione per il rapporto S/CO era 0,94. Ventinove (29) di questi campioni erano positivi per gli anticorpi anti-HTLV-I e 46 erano positivi per gli anticorpi anti-HTLV-II mediante un test supplementare usato in ambito di ricerca e 20 erano positivi per gli anticorpi anti-HTLV-I/II (non specificato).

Specificità clinica

È stato effettuato uno studio presso due centri per valutare la specificità del saggio usato con il Sistema Summit ORTHO® (OSS) automatico. È stato esaminato un totale di 16.339 campioni di siero e plasma prelevati casualmente da donatori di sangue volontari. I risultati di questa analisi sono indicati in Tabella 10.

Tabella 10. Riepilogo dei risultati di specificità clinica per il Sistema microElisa per HTLV-I/II Avioq mediante OSS (metodo automatico)

	Centro 1			Centro 2			Tutti i centri/lotti combinati
	Lotto 10003	Lotto 10004	Lotto 10005	Lotto 10003	Lotto 10004	Lotto 10005	
Numero esaminato	1366	1366	1358	4160	4080	4009	16.339
Non reattivi	1364	1366	1358	4157	4078	4007	16.330
Inizialm. reattivi	2	0	1	3	3	2	11
Ripetutamente reattivi	2	0	0	3	2	2	9
Positivi confermati	0	ND	ND	0	0	0	0
Totale falsi positivi	2			7			9
Totale analizzato	4.090			12.249			16.339
Specificità stimata	99,95%			99,94%			99,94%
IC 95%	99,82%-99,99%			99,88%-99,98%			99,90%-99,97%
Specificità stimata globale	99,95%						
IC 95%	99,89% - 99,98%						

Tra i 16.339 campioni di donatori analizzati, nove sono risultati ripetutamente reattivi. Tutti e nove sono stati classificati come falsi positivi in base ai risultati del test usando Western Blot (Centro 1) o IFA (centro 1) per uso di ricerca. Gli intervalli di confidenza della specificità stimata per il saggio Avioq per tutti i tre lotti presso ogni centro e per tutti i centri e lotti combinati sono comparabili a quelli del saggio Vironostika (IC 95%: 99,89-99,98%). La specificità stimata generale del saggio per HTLV-I/II Avioq mediante OSS era $16.330/16.339 = 99,94\%$ (IC 95%: 99,90-99,97%) rispetto a $11.409/11.415 = 99,95\%$ (IC 95%: 99,89-99,98%) usando il metodo manuale.

Questi studi hanno dimostrato che le prestazioni del Sistema microElisa per HTLV-I/II Avioq mediante lo strumento OSS sono comparabili a quelle ottenute usando il metodo manuale.

PRESTAZIONI DEL SISTEMA SUMMIT ORTHO® (OSS) CON IL PIPETTATORE ORTHO VERSEIA®

Riproducibilità

La riproducibilità del Sistema microElisa per HTLV-I/II Avioq usando OSS con il pipettatore ORTHO VERSEIA® è stata esaminata usando un pannello composto da tre campioni positivi per HTLV-I, due campioni positivi per HTLV-II e un campione negativo. Lo studio è stato condotto presso tre centri su un totale di cinque strumenti VERSEIA® e, per confronto, su pipettatori SUMMIT, ciascuno dei quali ha analizzato sei volte i campioni in due analisi al giorno in un periodo di cinque giorni consecutivi. I risultati di questo studio sono riepilogati in Tabella 11. Lo studio di riproducibilità ha dimostrato che la variabilità totale dei due tipi di strumenti è comparabile.

Tabella 11. Studio di riproducibilità del Sistema microElisa per HTLV-I/II Avioq mediante OSS

ID pannello	Pipettatore SUMMIT						Pipettatore VERSEIA®					
	N	Media	DS	%CV	S/C IC 95%		N	Media	DS	%CV	S/C IC 95%	
					Infe- riore	Supe- riore					Infe- riore	Supe- riore
A (HTLV-I)	150	2,549	0,515	20,2	2,468	2,631	150	2,602	0,503	19,3	2,524	2,680
B (HTLV-I)	150	2,623	0,480	18,3	2,548	2,699	150	2,708	0,491	18,1	2,632	2,785
C (HTLV-I)	150	1,718	0,416	24,2	1,653	1,783	149	1,869	0,448	24,0	1,798	1,939
D (HTLV-II)	150	2,802	0,562	20,1	2,713	2,891	150	2,823	0,601	21,3	2,728	2,918
E (HTLV-II)	150	1,985	0,365	18,4	1,928	2,042	150	2,114	0,421	19,9	2,049	2,180
F (Negativo)	150	0,061	0,016	26,0	0,059	0,064	149	0,060	0,016	26,6	0,058	0,063

Sensibilità analitica

Per dimostrare se la sensibilità analitica del Sistema microElisa per HTLV-I/II Avioq mediante OSS con il pipettatore VERSEIA® sia comparabile a quella del pipettatore SUMMIT, dieci pannelli di diluizione (quattro diluizioni con S/C target variabile tra 0,5 e 3,0 di cinque campioni positivi per anticorpi anti-HTLV-I e cinque campioni positivi per anticorpi anti-HTLV-II fino al valore soglia del saggio) sono stati analizzati usando entrambi gli strumenti. Per valutare la correlazione dei due metodi è stata effettuata l'analisi di regressione di Deming. Questa analisi ha dimostrato che esiste un'elevata correlazione per il rapporto S/CO per entrambi gli strumenti, con una pendenza di 1,00, un'intercetta di 0,01 e un coefficiente di correlazione di Pearson (r) di 1,00.

Sensibilità

Per la valutazione della sensibilità è stato usato un pannello composto da 104 campioni positivi congelati per gli anticorpi anti-HTLV (52 campioni positivi per anticorpi anti-HTLV-I e 52 campioni positivi per anticorpi anti-HTLV-II). Questi campioni sono stati generati mediante diluizione di campioni positivi congelati, per

creare una combinazione di campioni con reattività da bassa a moderata. Pertanto, si prevede che alcuni di questi campioni con valori segnale su soglia pari a quasi 1,000 varieranno da sopra (positivo) a sotto (negativo) la soglia.

I campioni sono stati analizzati in triplicato in ciascuno dei tre centri usando i pipettatori SUMMIT e VERSEIA®. È stato ottenuto un totale di 935 risultati validi, usati per l'analisi dei dati di ciascuno strumento. Tra le 935 osservazioni, il 98,1% (917/935) dei risultati con lo strumento Summit è risultato reattivo, mentre il 98,5% (921/935) dei risultati con lo strumento VERSEIA® è risultato reattivo. Il test di McNemar per risultati discordanti non evidenzia alcuna differenza significativa tra i due pipettatori, con un valore p di 0,3438, a indicare che il Sistema microElisa per HTLV-I/II Avioq è compatibile con il pipettatore VERSEIA®.

Specificità clinica

Un totale di 3.146 campioni di siero e plasma da donatori random è stato analizzato una sola volta usando entrambi i tipi di strumento (SUMMIT e VERSEIA®) in tre centri, ciascuno dei quali ha esaminato numeri simili di campioni. Dei 3.146 campioni analizzati, 3.140 sono risultati non reattivi con entrambi i tipi di strumento. Dei 6 campioni rimanenti, 5 erano reattivi con entrambi i pipettatori, mentre uno ha evidenziato risultati del test discordanti tra i due tipi di pipettatore (reattivo con VERSEIA®, ma non reattivo con Summit); tutti e sei i campioni sono risultati indeterminati mediante analisi con Western Blot. Assumendo che tutti i campioni fossero negativi per gli anticorpi anti-HTLV, la specificità del saggio è stata del 99,81% (IC 95%: 99,59%-99,93%) e del 99,84% (IC 95%: 99,63%-99,95%) se usato rispettivamente con lo strumento VERSEIA® e Summit (Tabella 12). L'analisi statistica non ha evidenziato alcuna differenza significativa nella specificità dei due tipi di strumento (99,81% vs. 99,84%).

Tabella 12. Riepilogo dei risultati di specificità clinica

		Pipettatore SUMMIT		Totale
		Positivi	Negativi	
Pipettatore VERSEIA®	Positivi	5	1	6 (0,19%)
	Negativi	0	3140	3140 (99,81%)
	Totale	5(0,16%)	3141 (99,84%)	3146 (100,00%)

PRESTAZIONI DELLE ANALISI DEI CAMPIONI CADAVERICI

Riproducibilità

La riproducibilità è stata valutata utilizzando 20 campioni cadaverici non reattivi (10 siero/10 plasma) e 20 campioni di donatori viventi non reattivi (10 siero/10 plasma). Da ciascuna origine di donatore (cadaverico e vivente) 5 campioni di siero e 5 campioni di plasma sono stati arricchiti con materiale di origine anti-HTLV-I o anti-HTLV-II fino a una reattività target di rapporto segnale/soglia (S/CO) pari a 2,0. Ciascun campione è stato analizzato una volta in sei giorni diversi in ognuno dei tre lotti di kit in un sito. I CV percentuali erano comparabili tra i campioni dei donatori cadaverici e quelli dei donatori viventi.

Tabella 13 – Riproducibilità del saggio in campioni plasmatici di donatori cadaverici e viventi

Pre / Post	Tipo	matrice	N	Media	95% inferiore	95% superiore	ds totale	cv totale	inter-ds	inter-cv	intra-ds	intra-cv
POST	HTLV-I	Plasma	90	2,13	2,05472	2,21510	0,383	17,9	0,324	15,2	0,215	10,1
		Siero	90	2,31	2,20140	2,41140	0,501	21,7	0,430	18,7	0,273	11,8
	HTLV-II	Plasma	90	2,09	2,00987	2,17973	0,405	19,4	0,348	16,6	0,221	10,6
		Siero	90	1,94	1,86472	2,02168	0,375	19,3	0,288	14,8	0,248	12,8

Pre / Post	Tipo	matrice	N	Media	95% inferiore	95% superiore	ds totale	cv totale	inter-ds	inter-cv	intra-ds	intra-cv
PRE	HTLV-I	Plasma	90	1,89	1,81144	1,96652	0,370	19,6	0,290	15,4	0,238	12,6
		Siero	90	1,97	1,89267	2,05320	0,383	19,4	0,322	16,3	0,219	11,1
	HTLV-II	Plasma	90	2,22	2,11903	2,32092	0,482	21,7	0,373	16,8	0,315	14,2
		Siero	90	1,96	1,88779	2,03181	0,344	17,5	0,280	14,3	0,208	10,6

Sensibilità

I campioni analizzati comprendevano un numero approssimativamente uguale di campioni sierici e plasmatici sia da campioni post-mortem (C) (n=91; 46 siero, 45 plasma) sia da campioni di donatori normali (N) (n=91; 45 siero, 46 plasma). I campioni sono stati precedentemente analizzati per la presenza di HTLV-I/II e sono risultati non reattivi. I campioni sono stati utilizzati per preparare pannelli arricchiti con HTLV-I e HTLV-II. Ogni campione è stato suddiviso in due e arricchito con una quantità predeterminata di sieri di anticorpi HTLV-I o HTLV-II positivi. La sensibilità è stata valutata analizzando i campioni sieropositivi a HTLV-I e HTLV-II sia di donatori post-mortem che normali con tre lotti di kit HTLV-I/II presso due centri di analisi. I risultati negativi ottenuti con il test ELISA sono stati considerati falsi negativi. La sensibilità e gli intervalli di confidenza al 95% sono stati calcolati per i campioni di entrambi i donatori, normali e post-mortem, arricchiti con anticorpo positivo a HTLV-I e HTLV-II come mostrato nella Tabella 14 di seguito. Il Sistema microElisa per HTLV-I/II Avioq ha una sensibilità complessiva stimata del 100% nei campioni cadaverici arricchiti con un intervallo di confidenza al 95% di 92,29-100,00% per il siero e 92,13-100,00% per il plasma.

Tabella 14 – Reattività contro campioni di donatori post-mortem e normali arricchiti

Sito	Numero lotto	Tipo campione e (siero)	Numero esaminato	Inizialm. non reattivi	Inizialm. reattivi	Percentuale reattivi	Limiti di confidenza al 95%
1	1	C	46	0	46	100%	92,29-100,00
		N	45	0	45	100%	92,13-100,00
	2	C	46	0	46	100%	92,29-100,00
		N	45	0	45	100%	92,13-100,00
	3	C	46	0	46	100%	92,29-100,00
		N	45	0	45	100%	92,13-100,00
2	1	C	46	0	46	100%	92,29-100,00
		N	45	0	45	100%	92,13-100,00
	2	C	46	0	46	100%	92,29-100,00
		N	45	0	45	100%	92,13-100,00
	3	C	46	0	46	100%	92,29-100,00
		N	45	0	45	100%	92,13-100,00
Sito	Numero lotto	Tipo campione e (plasma)	Numero esaminato	Inizialm. non reattivi	Inizialm. reattivi	Percentuale reattivi	Limiti di confidenza al 95%
1	1	C	45	0	45	100%	92,13-100,00
		N	46	0	46	100%	92,29-100,00
	2	C	45	0	45	100%	92,13-100,00

	3	N	46	0	46	100%	92,29-100,00
		C	45	0	45	100%	92,13-100,00
		N	46	0	46	100%	92,29-100,00
2	1	C	45	0	45	100%	92,13-100,00
		N	46	0	46	100%	92,29-100,00
	2	C	45	0	45	100%	92,13-100,00
		N	46	0	46	100%	92,29-100,00
	3	C	45	0	45	100%	92,13-100,00
		N	46	0	46	100%	92,29-100,00

Specificità

Ciascun campione di plasma dei donatori sia post-mortem (C) (n= 45) sia normali (N) viventi (n= 45; prelevati da una popolazione a basso rischio (banca del sangue)) è stato analizzato seguendo le indicazioni del foglietto illustrativo del Sistema microElisa per HTLV-I/II Avioq, con tre lotti di kit HTLV-I/II presso due centri di analisi. La specificità e gli intervalli di confidenza al 95% sono stati calcolati per i campioni di entrambi i donatori, normali e post-mortem, come mostrato nella Tabella 15 di seguito. Il Sistema microElisa per HTLV-I/II Avioq ha una specificità complessiva stimata del 100% nei campioni cadaverici plasmatici con un intervallo di confidenza al 95% di 92,13-100,00%.

Tabella 15 – Specificità stimata in campioni plasmatici post-mortem e random

Sito	Lotto	Tipo campione (Plasma)	Numero esaminato	Non reattivi	Ripetutam. reattivi	Specificità stimata (%)*	Limiti di confidenza al 95% della specificità (%)**
Sito 1	Lotto 1	Cadaverico	45	45	0	100	92,13-100,0
		Normale	45	45	0	100	92,13-100,0
	Lotto 2	Cadaverico	45	45	0	100	92,13-100,0
		Normale	45	45	0	100	92,13-100,0
	Lotto 3	Cadaverico	45	45	0	100	92,13-100,0
		Normale	45	45	0	100	92,13-100,0
Sito 2	Lotto 1	Cadaverico	45	45	0	100	92,13-100,0
		Normale	45	45	0	100	92,13-100,0
	Lotto 2	Cadaverico	45	45	0	100	92,13-100,0
		Normale	45	45	0	100	92,13-100,0
	Lotto 3	Cadaverico	45	45	0	100	92,13-100,0
		Normale	45	45	0	100	92,13-100,0

* = (Numero esaminato – Numero di campioni ripetutamente reattivi) X 100

(Numero esaminato – Numero di positivi confermati)

** = I limiti di confidenza per la specificità sono stati calcolati usando il metodo esatto.

I campioni sierici di 218 singoli donatori post-mortem sono stati esaminati seguendo le indicazioni del foglietto illustrativo del Sistema microElisa per HTLV-I/II Avioq con uno dei tre lotti di kit HTLV-I/II (ca. 1/3 dei campioni per lotto) in un unico sito. La specificità e gli intervalli di confidenza al 95% sono stati calcolati come mostrato nella Tabella 16 di seguito. Il Sistema microElisa per HTLV-I/II Avioq ha una specificità complessiva stimata del 100% nei campioni cadaverici con un intervallo di confidenza al 95% di 98,32-100,00%.

Tabella 16 – Specificità stimata in campioni sierici post-mortem

Lotto	Tipo campione (Siero)	Numero Testati***	Inizialm. non reattivi	Ripetutam. reattivi	Specificità stimata (%)*	Limiti di confidenza al 95% della specificità (%)**
Lotto 1	Cadaverico	73	73	0	100	95,07-100,0
Lotto 2	Cadaverico	73	73	0	100	95,07-100,0
Lotto 3	Cadaverico	72	71	0	100	95,01-100,0
Totale		218	217	0	100	98,32-100,0

* = $(\text{Numero esaminato} - \text{Numero di campioni ripetutamente reattivi}) \times 100$
(Numero esaminato – Numero di positivi confermati)

** = I limiti di confidenza per la specificità sono stati calcolati usando il metodo esatto.

*** = In uno studio separato, campioni sierici di 46 donatori normali viventi e 46 cadaverici sono stati analizzati utilizzando tre diversi lotti di kit HTLV-I/II presso due siti. Un campione cadaverico è stato ripetutamente reattivo in tutti e 3 i lotti di kit in entrambi i siti. Un secondo campione cadaverico è stato ripetutamente reattivo in tutti e 3 i lotti di kit presso un sito e in due lotti di kit presso un altro sito.

Bibliografia

1. Poiesz BJ, *et al.* Detection and Isolation of type C Retrovirus Particles from Fresh and Cultured Lymphocytes of a Patient with Cutaneous T-Cell Lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77 (12): 7415-7419.
2. Blattner WA, *et al.* Epidemiology of Human T-Cell Leukemia/Lymphoma Virus. *J Infect Dis* 1983; 147(3): 406-416.
3. Hinuma Y, *et al.* Antibodies of Adult T-Cell Leukemia-Virus-Associated Antigen (ATLA) in Sera from Patients with ATL and Controls in Japan: A Nationwide Sero-epidemiologic Study. *Int J Cancer* 1982; 29: 631-635.
4. Tajima K, *et al.* HTLV-I Carriers Among Migrants from an ATL-Endemic Area to ATL Non-Endemic Metropolitan Areas in Japan. *Int J Cancer* 1986; 37: 383-387.

5. Mann DL, *et al.* HTLV-I associated B-cell CLL: indirect role for retrovirus in leukemogenesis. *Science* 1987; 236: 1103-6.
6. Manns A, *et al.* The epidemiology of HTLV-I and -II: etiologic role in human disease. *Transfusion* 1991; 31(1): 67-75.
7. D'Aquila RT: Newly recognized human viruses. *Mediguide to Inf. Diseases* 1993; 12(4): 2-6.
8. Manns A, *et al.* Role of HTLV-I in development of NHL in Jamaica and Trinidad and Tobago. *The Lancet* 1993; 342: 1447-50.
9. Morgan OS, *et al.* HTLV-I and polymyositis in Jamaica. *Lancet*, 1989; 2:1184-87.
10. Sato K, *et al.* Arthritis in patients infected with HTLV-I. *Arthritis and Rheumatism* 1991; 34(6): 714-21.
11. Sato K, *et al.* HTLV-I and Arthritis. *Rheumatol. Rev.* 1992; 1: 185-92.
12. Zucker-Franklin, *et al.* KS in a HIV negative patient with asymptomatic HTLV-I infection: *J. Infect. Dis.* 1993; 167: 987-89.
13. Mochizuki M, *et al.* Uveitis associated with HTLV-I: seroepidemiologic, clinical and virologic studies. *J. Inf. Diseases* 1992; 166: 943-46.
14. Zucker-Franklin D, *et al.* Human Lymphotropic Retroviruses Associated With Mycosis Fungoides: Evidence That Human T-Cell Lymphotropic Virus Type II (HTLV-II) as Well as HTLV-I May Play a Role in the Disease. *Blood* 1992; 80(6): 1537-45.
15. Bazarbachi A, *et al.* HTLV-I provirus and mycosis fungoides. *Science* 1993; 259: 1470-71.
16. Clark J, *et al.* Seroepidemiologic Studies of Human T-Cell Leukemia/Lymphoma Virus Type I in Jamaica. *Int J Cancer* 1985; 36: 37-41.
17. Manzari V, *et al.* HTLV-I is Endemic in Southern Italy: Detection of the First Infectious Cluster in a White Population. *Int J Cancer* 1985; 36: 557-559.
18. Blayney DW, *et al.* The Human T-Cell Leukemia-Lymphoma Virus in the Southeastern United States. *JAMA* 1983; 250(8): 1048-1052.
19. Botha MC, *et al.* Distribution and Possible Spread of Human T-Cell Leukemia Virus Type I in Human Communities in the Northern and Eastern Transvaal. *South African Med J* 1985; 67: 668-671.
20. Wong-Staal F and Gallo RC: Human T-lymphotropic Retroviruses. *Nature* 1985; 317: 395-403.
21. Yoshida M: Human Leukemia Virus Associated with Adult T-Cell Leukemia. *Gann* 1983; 74: 777-789.
22. Levine P, *et al.* HTLV-II infection in Florida Indians. *Aids Res. and Human Retroviruses* 1993; 9(2): 123-27.
23. Hjelle B, *et al.* Endemic HTLV-II infection in southwestern US Indians involves two prototype variants of virus. *J. Infect. Diseases* 1993; 168: 737-40.
24. Lal RB, *et al.* Sequence variation within the immunodominant epitope-coding region from external glycoprotein of HTLV-II in isolates from Seminole Indians. *J. Infect. Diseases* 1994; 169: 407-11.
25. Maloney EM, *et al.* Endemic HTLV-II infection among isolated Brazilian Amerindians. *J. Infect. Diseases* 1992; 166: 100-107.
26. Lee H, *et al.* High rate of HTLV-II infection in seropositive drug abusers in New Orleans. *Science*, 1989; 244: 471-5.
27. DeRossi A, *et al.* Serological and molecular evidence of infection by HTLV-II in Italian drug addicts by use of synthetic peptides and PCR. *Eur. J. Cancer* 1991; 27: 835-8.

28. Zella D, *et al.* Molecular characterization of two isolates from HTLV-II from Italian drug abusers and comparison of genome structure with other isolates. *J. Gen. Virol.* 1993; 74: 437-44.
29. Loughran TP, *et al.* Detection of HTLV-II in a patient with LGL. *Blood* 1992; 80(5): 1116-19.
30. Sohn CC, *et al.* Leukopenic chronic T-cell leukemia: association with human retroviruses. *Blood* 1986; 67(4): 949-56.
31. Cervantes J, *et al.* T-Prolymphocytic Leukemia associated with HTLV-II. *Clin. Res.* 1986; (2): 454.
32. Hjelle B, *et al.* Chronic neurodegenerative disease associated with HTLV-II infection. *The Lancet* 1992; 339: 645-46.
33. Jacobson S, *et al.* Isolation of HTLV-II from a patient with chronic, progressive neurological disease clinically indistinguishable from HAM/TSP. *Ann. Neurol.* 1993; 33(4): 392.
34. Murphy EL, *et al.* HTLV-II associated myelopathy in 43-year-old woman. *The Lancet* 1993; 341: 757-58.
35. Harrington WJ, *et al.* Spastic Ataxia associated with HTLV-II infection. *Annals of Neurology* 1993; 33(4): 411-15.
36. Kaplan JE, *et al.* United States: Epidemiologic and Molecular Evidence Linking Donor and Recipient. *Neurology* 1991; 41 (2): 192-197.
37. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Clinical Laboratory Waste Management: Approved Guidelines*. NCCLS Document GPS-A. Villanova, PA: NCCLS, 1993.
38. U.S. Environmental Protection Agency. *EPA guide for infectious waste management*. Publication No. EPA / 530-5w-86-014, Washington DC: U.S. Environmental Protection Agency, 1986.
39. The U.S. Pharmacopoeia 23 / National Formulary 18: 1995; Purified Water: pg. 1637 and 1984.
40. Centers for Disease Control, U.S. Public Health Service Working Group. Guidelines for counseling persons infected with human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) and type II (HTLV-II). *Ann. Intern. Med.* 118(6):448-454, 1993.
41. National Committee for Clinical Laboratory Standards: *Preparation and Testing of Reagent Water in the Clinical Laboratory*. Approved Guidelines – Third Edition. Villanova, PA: October 1997, NCCLS C3-A3: Vol. 17 No. 18.

DISPONIBILITÀ

Avioq Inc.

Sistema microElisa per HTLV-I/II Avioq

Kit di 192 test

REF

Numero di prodotto 500192

Kit di 576 test

REF

Numero di prodotto 500576

Kit di 9600 test

REF

Numero di prodotto 509600

Tampone di lavaggio, 1 flacone da 100 ml

REF

Numero di prodotto 559879

Tampone di lavaggio, 4 flaconi da 100 ml

REF

Numero di prodotto 559880

Per assistenza tecnica negli USA, rivolgersi al Servizio clienti di Avioq, al numero +1-919- 314- 5535.

Per assistenza tecnica fuori dagli Stati Uniti d'America, rivolgersi ad Emergo Europe al (31)(0)70345-8570.

EnzAbody è un marchio registrato di bioMérieux negli USA e in altri Paesi.



Avioq, Inc.
76 TW Alexander Drive
PO Box 12808
Research Triangle Park, North Carolina 27709
www.Avioq.com

EC REP

EMERGO EUROPE
Westervoortsedijk 60
6827 AT, Arnhem
The Netherlands

Licenza statunitense n. 1856

Dicembre 2022

CE 2797