



Sclavo-EIA HCV Ab

Ref ELI903001

Istruzioni d'uso

Rev. D ELI903001-05-2022



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

A. USO CONSIGLIATO

Sclavo-EIA HCV Ab è un kit ELISA di quarta generazione per la rilevazione di anticorpi (IgG e IgM) contro il virus dell'epatite C (HCV) nel plasma e nel siero umani.

Questo kit può essere utilizzato per lo screening di campioni di donatori di sangue nelle banche del sangue e per il follow-up dei pazienti con infezione da HCV nei laboratori diagnostici.

B. INTRODUZIONE

L'HCV, identificato nel 1988 attraverso tecniche di biologia molecolare, è un virus a RNA a filamento positivo che appartiene al genere Hepacivirus della famiglia Flaviviridae di cui sono stati identificati sei genotipi principali. L'HCV è una delle principali cause di malattie del fegato (epatite, cirrosi, epatocarcinoma) in tutto il mondo; si stima che più di 170 milioni di persone nel mondo abbiano un'infezione da virus dell'epatite C, di cui più di 70 milioni hanno un'infezione cronica.

L'HCV si trasmette per via parenterale, fra cui la trasfusione di sangue infetto e derivati del sangue e la condivisione di siringhe contaminate per la somministrazione endovenosa di droghe d'abuso sono le più frequenti.

I principali test utilizzati per determinare l'esposizione all'infezione da HCV e l'evidenza di infezione da HCV passata o attuale si basano sul rilevamento di anticorpi anti-HCV mediante test sierologici, come l'ELISA.

La rilevazione di anticorpi anti-HCV nel plasma o nel siero si basa sull'uso di ELISA, che rileva gli anticorpi prodotti contro vari epitopi antigenici immunodominanti HCV. Specifici antigeni ricombinanti vengono utilizzati per catturare gli anticorpi circolanti anti-HCV nei pozzetti delle piastre per microtitolazione. La presenza di anticorpi anti-HCV è rivelata da anticorpi anti-IgG e IgM umane coniugati con perossidasi, che catalizza la trasformazione di un substrato incolore in un prodotto colorato, misurabile con un fotometro.

C. PRINCIPIO DEL METODO

Le proteine ricombinanti conservate e immunodominanti del core e le proteine non strutturali (NS3, NS4 e NS5) vengono utilizzate nella fase solida (pozzetti per microtitolazione).

Durante la prima fase di incubazione del test, i campioni diluiti vengono aggiunti al pozzetto sensibilizzato e gli anticorpi (IgG e IgM) vengono legati alle proteine ricombinanti, se presenti.

Dopo una fase di lavaggio per rimuovere le proteine non legate, il coniugato policlonale anti-IgG umane e IgM HRP viene aggiunto al pozzetto della microtitolazione. Se gli anticorpi sono stati catturati dagli antigeni ricombinanti, il coniugato si legherà al pozzetto da microtitolazione.

Il coniugato enzimatico non legato viene rimosso mediante una fase di lavaggio e la presenza dei complessi coniugato-antigene viene rivelata aggiungendo il substrato incolore TMB per avviare la reazione colorimetrica. Il colore che si sviluppa è proporzionale alla quantità di anticorpo legato alla fase solida.

D. COMPONENTI DEL KIT E LORO PREPARAZIONE

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

Micropiastra

MICROPIASTRA

12 strisce x 8 pozzetti rivestiti con proteine HCV Core ricombinanti, NS2, NS3 e NS5 in un sacchetto richiudibile con sacchetto essiccante.

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

Riposizionare le strisce inutilizzate nella busta richiudibile con l'indicatore di umidità, premere per rimuovere l'aria, chiudere saldamente la busta e conservare a 2–8°C.

Dopo la prima apertura, le strisce possono essere utilizzate fino a quando l'indicatore di umidità nel sacchetto non è virato da giallo a verde.

Controllo negativo

CONTROLLO –



GHS07

1 fialone x 2 ml. Pronto all'uso. Agitare accuratamente su vortex prima dell'uso.

Tampone Na-citrato 10 mM pH 6.0 contenente l'1% di siero di capra e lo 0,5% di Tween 20. Conservanti: sodio azide (0,09%) e Proclin™ 300 (0,045%).

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

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

Controllo positivo**CONTROLLO +****GHS07**

1 fialone x 2 ml. Pronto all'uso. Agitare accuratamente su vortex prima dell'uso.

Tampone Na-citrato 10 mM pH 6,0 contenente siero umano positivo per anticorpi HCV e 0,5% Tween 20. Conservanti: sodio azide (0,09%) e Proclin™ 300 (0,045%).

Il siero anti-HCV è stato inattivato chimicamente per ridurre il titolo di virus potenzialmente infettivo. Tuttavia, nessun metodo di prova può escludere il rischio di potenziale infezione; trattare come potenzialmente infettivo.

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

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

Calibratore**CAL****GHS07**

1 fialone. Liofilizzato. Da ricostituire con il volume di acqua di grado EIA riportato in etichetta. Agitare accuratamente su vortex prima dell'uso. Tampone Na-citrato 10 mM pH 6.0 contenente proteine fetali di capra e anticorpi umani anti-HCV, calibrato contro lo standard di lavoro NIBSC (rif. 99 / 588-003-WI). Conservanti: 0,3 mg / mL di gentamicina solfato e Proclin™ 300 (0,045%).

Il siero anti-HCV è stato inattivato chimicamente per ridurre il titolo di virus potenzialmente infettivo. Tuttavia, nessun metodo di prova può escludere il rischio di potenziale infezione; trattare come potenzialmente infettivo.

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

Avvertenza: **ATTENZIONE** - Sensibilizzante (H317; H411; P261; P273; P280; P333+P313; P321; P501).

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

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

1 bottiglia x 60 ml. Concentrato 20 volte. Portare al volume finale di 1200 ml utilizzando acqua di grado EIA.

Una volta diluito, contiene tampone fosfato 10 mM pH 7.0, Tween 20 0,5%, Na-azide (0,09%) e Proclin™ 300 (0,045%).

Verificare attentamente che non vi siano cristalli di sale non disciolti, se necessario, mescolare fino a completa dissoluzione.

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

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

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

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

Coniugato-HRP**CONJ****GHS07**

1 fialone x 16 ml. Pronto all'uso. Agitare accuratamente su vortex prima dell'uso.

Anticorpi policlonali di capra coniugati con perossidasi anti-IgG e IgM umane in tampone Tris 10 mM pH 6,8 e 5% di BSA. Conservanti: 0,02% gentamicina solfato e Proclin™ 300 (0,045%).

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

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

Substrato**SUBS TMB**

1 fialone x 16 ml. Pronto all'uso. Agitare accuratamente su vortex prima dell'uso.

0,03% di tetrametilbenzidina (TMB), 4% di dimetilsolfossido e 0,02% di perossido di idrogeno (H₂O₂) stabilizzati in tampone citrato 50 mM (pH 3,8).

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

Diluyente per analisi DILAS



GHS07

1 flacone x 15 ml. Pronto all'uso. Agitare accuratamente su vortex prima dell'uso.

Soluzione tamponata tris 10 mM pH 8.0. Conservante: Proclin™ 300 (0,045%). Da utilizzare per il pretrattamento di campioni e controlli nella micropietra, bloccando le interferenze.

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

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

Acido solforico

H_2SO_4 0.3 M



GHS05

1 flacone x 16 ml. Pronto all'uso. Mescolare per inversione prima dell'uso.

Soluzione 0.3 M H_2SO_4 .

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

Contiene Acido Solforico (CAS 7664-93-9)

Diluyente del campione

DILSPE



GHS07

1 flacone x 50 ml. Pronto all'uso. Agitare accuratamente su vortex prima dell'uso.

Tampone Na-citrato 10 mM pH 6.0, contenente l'1% di proteine del siero di capra e lo 0,5% di Tween 20. Conservanti: sodio azide (0,09%) e Proclin™ 300 (0,045%).

Da utilizzare per la diluizione dei campioni.

Importante: *il diluente del campione diventa verde bluastrò scuro da verde oliva quando il campione viene aggiunto.*

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

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

Legenda:

Dichiarazioni di avvertenza H:

H314 – Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari.

H317 – Può provocare una reazione allergica cutanea.

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

Dichiarazioni precauzionali P:

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

P102 – Tenere fuori dalla portata dei bambini.

P103 – Leggere attentamente e seguire tutte le istruzioni.

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

P273 – Non disperdere nell'ambiente.

P280 – Indossare guanti di protezione.

P310 – Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico.

P321 – Trattamento specifico (vedere su questa etichetta)

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

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

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

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

P405 – Conservare sotto chiave.

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

Pellicole adesive per coprire la micropiastra 2

Libretto istruzioni per l'uso 1

E. Materiali necessari ma non forniti

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

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

Acqua distillata di grado EIA.

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

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

Lavatore ELISA multicanale calibrato.

Agitatore a vortice o similare.

Timer.

Carta assorbente per asciugare la micropiastra.

F. PRECAUZIONI E AVVERTENZE

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

1. Il kit deve essere utilizzato solo da personale tecnico qualificato e adeguatamente formato, sotto la supervisione di un medico responsabile del laboratorio.
2. Quando il kit è utilizzato per lo screening di unità ematiche ed emocomponenti, deve essere utilizzato in un laboratorio certificato e qualificato dall'autorità nazionale del settore (Ministero della Salute o entità simile) per effettuare questo tipo di analisi.
3. Tutto il personale coinvolto nell'esecuzione del test deve indossare indumenti protettivi da laboratorio, guanti privi di talco e occhiali. Evitare l'uso di dispositivi affilati (aghi) o taglienti (lame). Tutto il personale coinvolto deve essere formato sulle procedure di biosicurezza, come raccomandato dal Center for Disease Control, Atlanta, USA e riportato nella pubblicazione del National Institute of Health: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
4. Tutto il personale coinvolto nella manipolazione dei campioni deve essere vaccinato per HBV e HAV, i cui vaccini sono disponibili, sicuri ed efficaci.
5. L'ambiente del laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminanti come polvere o agenti microbici presenti nell'aria, quando si aprono le fiale del kit e le micropiastre e durante l'esecuzione del test. Proteggere il cromogeno/substrato dalla luce intensa ed evitare vibrazioni della superficie del banco su cui viene eseguito il test.
6. Al ricevimento, conservare il kit a 2-8°C in un frigorifero o in una cella frigorifera a temperatura controllata.
7. Dopo apertura, la stabilità dei singoli reagenti è quella riportata nella sezione D.
8. Non scambiare componenti tra lotti diversi dei kit.
9. Verificare che i reagenti siano limpidi e non contengano particelle pesanti o aggregati visibili. In caso contrario, consigliare al supervisore del laboratorio di avviare le procedure necessarie per la sostituzione del kit.
10. Evitare la contaminazione incrociata tra campioni di siero/plasma utilizzando puntali monouso e sostituendoli dopo ogni campione. Non riutilizzare le punte usa e getta.
11. Evitare la contaminazione incrociata tra i reagenti del kit utilizzando puntali monouso e cambiandoli tra l'uso di ognuno di essi. Non riutilizzare le punte usa e getta.
12. Non utilizzare il kit integro dopo la data di scadenza indicata sul contenitore esterno e sulle etichette interne (flaconcini).
13. Trattare tutti i campioni come potenzialmente infettivi. Tutti i campioni di siero umano devono essere manipolati al livello di biosicurezza 2, come raccomandato dal Center for Disease Control, Atlanta, Stati Uniti, in conformità a quanto riportato nella pubblicazione dell'Institutes of Health: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.5. L'ambiente del laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminanti come polvere o agenti microbici presenti nell'aria, quando si aprono le fiale del kit e le micropiastre e durante l'esecuzione del test. Proteggere il cromogeno/substrato dalla luce intensa ed evitare vibrazioni della superficie del banco su cui viene eseguito il test.
14. Si raccomanda l'uso di utensili monouso in plastica nella preparazione dei componenti liquidi o nel trasferimento dei componenti in postazioni di lavoro automatizzate, al fine di evitare contaminazioni incrociate.
15. I rifiuti prodotti durante l'uso del kit devono essere smaltiti in conformità alle direttive e alle leggi nazionali relative ai rifiuti di laboratorio di sostanze chimiche e biologiche. In particolare, i rifiuti liquidi generati dalla procedura di lavaggio, dai residui dei controlli e dai campioni devono essere trattati come materiale potenzialmente infettivo e inattivati prima di essere smaltiti. Le procedure di inattivazione suggerite sono il trattamento con una concentrazione finale del 10% di candeggina per uso domestico per 16-18 ore o l'inattivazione al calore in autoclave a 121°C per 20 minuti.

16. Fuoriuscite accidentali da campioni e operazioni devono essere assorbite con fazzoletti di carta imbevuti di candeggina domestica e poi con acqua. I fazzoletti devono quindi essere eliminati in contenitori adeguati designati ai rifiuti di laboratorio / ospedale.
17. L'acido solforico è un irritante. In caso di fuoriuscite, lavare la superficie con abbondante acqua.
18. Altri materiali di scarto generati dall'uso del kit (esempio: puntali usati per campioni e controlli, micropiastre usate) devono essere trattati come potenzialmente infettivi e smaltiti secondo le direttive nazionali e le leggi relative ai rifiuti di laboratorio.

G. CAMPIONE: TIPO, PREPARAZIONE E RACCOMANDAZIONI.

1. Il sangue viene prelevato in modo asettico mediante prelievo venoso e il plasma o il siero vengono preparati utilizzando le tecniche standard di preparazione dei campioni per le analisi cliniche di laboratorio. L'uso di anticoagulanti come citrato, EDTA ed eparina non interferisce con il test.
2. Evitare qualsiasi aggiunta di conservanti ai campioni; in particolare sodio azide poiché questa sostanza chimica influirebbe sull'attività enzimatica del coniugato, generando risultati falsi negativi.
3. I campioni devono essere chiaramente identificati con codici o nomi per evitare interpretazioni errate dei risultati. Quando il kit viene utilizzato per lo screening delle unità di sangue, l'etichettatura con codice a barre e la lettura elettronica sono fortemente raccomandate.
4. I campioni emolizzati (rossastri) e visibilmente fortemente lipemici ("lattiginosi") devono essere scartati in quanto potrebbero generare falsi risultati. I campioni contenenti residui di fibrina o particelle pesanti o filamenti e corpi microbici devono essere scartati in quanto potrebbero dare origine a falsi risultati.
5. I sieri ed il plasma possono essere conservati a 2°-8°C in provette di raccolta primaria per un massimo di cinque giorni dopo la raccolta. Non congelare le provette di raccolta primaria. Per periodi di conservazione più lunghi, i campioni di siero e plasma, accuratamente rimossi dalla provetta di raccolta primaria, possono essere conservati congelati a -20°C secondo le procedure di conservazione dei campioni validate dal Laboratorio. I campioni congelati non devono essere congelati / scongelati più di una volta poiché ciò potrebbe generare particelle che potrebbero influenzare il risultato del test.
6. Se sono presenti particelle, centrifugare a 2.000 rpm per 20 minuti o filtrare utilizzando filtri da 0,2-0,8 micron per chiarificare il campione per il test.

H. STRUMENTI UTILIZZATI IN ABBINAMENTO AL KIT

1. Le micropipette devono essere calibrate per dispensare il volume corretto richiesto dal test e devono essere sottoposte a regolare decontaminazione (alcool domestico, soluzione di candeggina al 10%, disinfettanti ospedalieri) di quelle parti che potrebbero entrare accidentalmente in contatto con il campione. Dovrebbero inoltre essere regolarmente mantenute per mostrare una precisione dell'1% e una veridicità del $\pm 2\%$. Anche la decontaminazione delle fuoriuscite o dei residui dei componenti del kit deve essere eseguita regolarmente.
2. L'incubatore ELISA deve essere impostato a +37°C (tolleranza di $\pm 0,5^\circ\text{C}$) e controllato regolarmente per garantire il mantenimento della temperatura corretta.
3. Il lavatore ELISA è estremamente importante per le prestazioni complessive del test. Il lavatore deve essere attentamente convalidato in anticipo, controllato per l'erogazione del giusto volume di erogazione e regolarmente sottoposto a manutenzione secondo le istruzioni per l'uso del produttore. In particolare il lavatore, al termine del carico di lavoro quotidiano, deve essere ampiamente ripulito dai sali con acqua deionizzata. Prima dell'uso, il lavatore deve essere ampiamente pretrattato con la soluzione di lavaggio diluita. Lo strumento deve essere sottoposto settimanalmente a decontaminazione secondo il suo manuale (suggerita decontaminazione NaOH 0,1 M). Cinque (5) cicli di lavaggio (aspirazione + erogazione di 350ul / pozzetto di soluzione di lavaggio + 20 sec di attesa = 1 ciclo) sono sufficienti per garantire l'analisi con le prestazioni dichiarate. Se l'attesa non è possibile fare un ciclo di lavaggio in più. Un ciclo di lavaggio errato o aghi bloccati dal sale sono la principale causa di reazioni false positive.
4. I tempi di incubazione hanno una tolleranza del $\pm 5\%$.
5. Il lettore di micropiastre ELISA deve essere dotato di un filtro di lettura di 450nm e di un secondo filtro di 620-630nm, obbligatorio per scopi di blanking. Le sue prestazioni standard dovrebbero essere (a) larghezza di banda <10 nm; (b) intervallo di assorbanza da 0 a > 2,0; (c) linearità fino a > 2,0; (d) ripetibilità > 1%. Il blanking viene eseguito sul pozzetto identificato nella sezione "Procedura di analisi". Il sistema ottico del lettore deve essere calibrato regolarmente per garantire che venga misurata la densità ottica corretta. Deve essere sottoposto a regolare manutenzione secondo le istruzioni del produttore.
6. Quando si utilizza una stazione di lavoro automatizzata ELISA, tutti i passaggi critici (dispensazione, incubazione, lavaggio, lettura, gestione dei dati) devono essere attentamente impostati, calibrati, controllati e sottoposti a regolare manutenzione al fine di corrispondere ai valori riportati nella sezione L "Controllo di qualità interno". Il protocollo del test deve essere installato nel sistema operativo dell'unità e convalidato come per il lavatore ed il lettore. Inoltre, la parte di gestione dei liquidi della stazione (dispensazione e lavaggio) deve essere convalidata e impostata correttamente. Particolare attenzione deve essere posta per evitare eventi di trascinarsi negli aghi utilizzati per l'erogazione e per il lavaggio. Questo deve

essere studiato e controllato per ridurre al minimo la possibilità di contaminazione dei pozzetti adiacenti. L'uso di stazioni di lavoro automatiche ELISA è consigliato per lo screening del sangue quando il numero di campioni da testare supera le 20-30 unità per analisi.

7. Quando si utilizzano dispositivi automatici, nel caso in cui il supporto del flaconcino dello strumento non si adatti ai flaconcini forniti nel kit, trasferire la soluzione in contenitori appropriati ed etichettarli con la stessa etichetta staccata dal flaconcino originale. Questa operazione è importante per evitare che il contenuto delle fiale non corrisponda durante il trasferimento. Al termine del test, riportare i contenitori etichettati secondari a 2°-8°C, ben chiusi.

I. CONTROLLI E OPERAZIONI PRELIMINARI

1. Verificare la data di scadenza del kit stampata sull'etichetta esterna della confezione del kit. Non utilizzare i reagenti oltre la data di scadenza indicata.
2. Verificare che i componenti liquidi non siano contaminati da particelle o aggregati visibili ad occhio nudo. Verificare che il cromogeno / substrato sia incolore o blu pallido aspirandone un piccolo volume con una pipetta di plastica trasparente sterile. Verificare che non si siano verificate rotture durante il trasporto e che non siano presenti fuoriuscite di liquido all'interno della scatola. Verificare che la busta di alluminio, contenente la micropiastra, non sia forata o danneggiata.
3. Diluire tutto il contenuto della soluzione di lavaggio concentrata 20x come descritto sopra.
4. Sciogliere il calibratore come descritto sopra.
5. Lasciare che tutti gli altri componenti raggiungano la temperatura ambiente (circa 1 ora) e poi mescolare come descritto.
6. Impostare l'incubatore ELISA a +37°C e preparare il lavatore ELISA pretrattandolo con la soluzione di lavaggio diluita, secondo le istruzioni del produttore. Impostare il giusto numero di cicli di lavaggio come riportato nell'apposita sezione.
7. Verificare che il lettore ELISA sia stato acceso almeno 20 minuti prima della lettura.
8. Se si utilizza una stazione di lavoro automatizzata, accenderla, controllare le impostazioni e assicurarsi di utilizzare il protocollo di analisi corretto.
9. Verificare che le micropipette siano impostate sul volume richiesto.
10. Verificare che tutte le altre apparecchiature siano disponibili e pronte all'uso.
11. In caso di problemi, non procedere oltre con il test e avvisare il supervisore.

J. PROCEDIMENTO

Il dosaggio deve essere eseguito secondo quanto riportato di seguito, è importante mantenere lo stesso tempo di incubazione per tutti i campioni in prova.

Analisi automatizzata:

Seguire il manuale utente del sistema ELISA automatizzato per programmare il metodo di test Sclavo-EIA HCV Ab.

Nel caso in cui il test venga eseguito in modo automatizzato, si consiglia di far aspirare allo strumento prima 200 µl di diluente del campione e poi 10 µl di campione.

Il campione così diluito viene quindi dispensato con cura direttamente nell'apposito pozzetto del campione della micropiastra. Prima di aspirare il campione successivo, gli aghi devono essere accuratamente lavati per evitare qualsiasi contaminazione incrociata tra i campioni.

Non diluire i controlli/calibratori poiché sono pronti per l'uso. Dispensare 200 µl di controlli/calibratori nei pozzetti di controllo/calibrazione appropriati.

Nota importante: *monitorare visivamente che i campioni siano stati diluiti e dispensati nei pozzetti appropriati: controllare che il colore dei campioni dispensati sia diventato verde bluastro scuro mentre il colore del controllo negativo sia rimasto verde oliva.*

Per le operazioni successive seguire le istruzioni operative riportate di seguito per l'analisi manuale.

Si raccomanda vivamente di verificare che il tempo intercorso tra la dispensazione del primo e dell'ultimo campione venga calcolato dallo strumento e preso in considerazione ritardando di conseguenza la prima operazione di lavaggio.

Analisi manuale:

1. Posizionare il numero richiesto di strip da 8 nella cornice dei micropozzetti. Lasciare il primo pozzetto (A1) vuoto per il bianco.
2. Dispensare 200 µl di controllo negativo in triplicato, 200 µl di calibratore in duplicato e 200 µl di controllo positivo in singolo nei pozzetti appropriati. Non diluire i controlli e il calibratore poiché sono prediluiti, pronti per l'uso!
3. Aggiungere 200 µl di diluente per campioni (DILSPE) a tutti i pozzetti del campione; quindi dispensare 10 µl di campione in ogni pozzetto adeguatamente identificato. Mescolare delicatamente la piastra, evitando di traboccare e contaminare i pozzetti adiacenti, in modo da disperdere completamente il campione nel suo diluente.

Nota importante: *Verificare che il colore del diluente del campione, dopo l'aggiunta del campione, cambi da verde chiaro a verde bluastro scuro, monitorando che il campione sia stato realmente aggiunto.*

4. Dispensare 50 µl di diluente per analisi (DILAS) in tutti i controlli/calibratore e nei pozzetti dei campioni. Verificare che il colore dei campioni sia diventato blu scuro.

5. Incubare la micropiastra per 45 min a +37°C.

Nota importante: Le strisce devono essere sigillate con la pellicola sigillante adesiva fornita solo quando il test viene eseguito manualmente. Non coprire le strisce quando si utilizzano strumenti automatici ELISA.

6. Lavare la micropiastra con un dispositivo di lavaggio automatico erogando e aspirando 350 µl / pozzetto di soluzione di lavaggio diluita come riportato in precedenza (sezione H.3).

7. Pipettare 100 µl di coniugato enzimatico in ogni pozzetto, eccetto nel primo pozzetto, e coprire con la pellicola adesiva. Verificare che questo componente di colore rosa/rosso sia stato erogato in tutti i pozzetti, tranne che nell'A1.

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

8. Incubare la micropiastra per 45 min a +37°C.

9. Lavare i pozzetti come al punto 6.

10. Pipettare 100 µl di miscela di cromogeno/substrato in ogni pozzetto, compreso il pozzetto del bianco. Quindi incubare la micropiastra a temperatura ambiente (18-24°C) per 15 minuti.

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

11. Pipettare 100 µl di acido solforico in tutti i pozzetti utilizzando la stessa sequenza di pipettaggio del passaggio 10 per arrestare la reazione enzimatica. L'aggiunta di acido trasformerà il controllo positivo e i campioni positivi da blu a giallo/marrone.

12. Misurare l'intensità del colore della soluzione in ciascun pozzetto, come descritto nella sezione H.5, utilizzando un filtro da 450 nm (lettura) e da 620-630 nm (sottrazione del bianco).

Note importanti:

1. Assicurarsi che non siano presenti impronte digitali sul fondo del micropozzetto prima della lettura. Le impronte digitali potrebbero generare risultati falsi positivi alla lettura.

2. La lettura deve essere eseguita subito dopo l'aggiunta della soluzione bloccante e comunque non oltre 20 minuti dalla sua aggiunta. Può verificarsi una certa autoossidazione del cromogeno che porta ad un elevato rumore di fondo.

3. È stato dimostrato che l'agitazione a 350 ± 150 rpm durante l'incubazione aumenta la sensibilità del test di circa il 20%.

4. Il calibratore (CAL) non influisce sul calcolo del cut-off e quindi sul calcolo dei risultati del test. Il calibratore può essere utilizzato solo quando è richiesto un controllo di qualità interno del Laboratorio CQ.

K. SCHEMA DEL TEST

Metodo	Operazioni
Controlli & Calibratore	200 µl (pronti all'uso)
Campioni	200 µl diluente del campione +10 µl
Diluente per analisi (DILAS)	50 µl in tutti i pozzetti tranne l'A1
1° incubazione	45 min
Temperatura	+37°C
Fase di lavaggio	n°5 cicli con 20" di attesa OPPURE
Coniugato	n°6 cicli senza attesa 100 µl ad eccezione dell'A1
2° incubazione	45 min
Temperatura	+37°C
Fase di lavaggio	n°5 cicli con 20" di attesa OPPURE
TMB/H ₂ O ₂	n°6 cicli senza attesa 100 µl
3° incubazione	15 min

Temperatura	RT
Acido solforico	100 µl
Letture OD	450nm / 620-630nm entro 20 minuti

Di seguito è riportato un esempio di schema di dispensazione:

Micropiastra

	1	2	3
A	BLK	S2	
B	NC	S3	
C	NC	S4	
D	NC	S5	
E	CAL	S6	
F	CAL	S7	
G	PC	S8	
H	S1	S9	

Legenda:

BLK = Bianco
 NC = Controllo negativo
 CAL = Calibratore
 PC = Controllo positivo
 S = Campione

L. CONTROLLO DI QUALITÀ INTERNO

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

Controllo	Requisiti
Pozzetto bianco	Valore < 0.100 OD450nm
Controllo negativo (NC)	Valore medio < 0.050 OD450nm
Calibratore	S/CO > 1.1
Controllo positivo	Valore > 1.000 OD450nm

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

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

Problema	Controllo
Bianco (A1) > 0.100 OD450nm	1. che la soluzione di cromogeno / substrato non sia stata contaminata durante il test.
Controllo negativo (NC) > 0.050 OD450nm	1. che la procedura di lavaggio e le impostazioni del lavatore siano convalidate nello studio di prequalifica; 2. che sia stata utilizzata la soluzione di lavaggio adeguata e che il lavatore sia stato pretrattato con essa prima dell'uso; 3. che non è stato commesso alcun errore nella procedura del test (dispensazione del controllo positivo invece di quello negativo); 4. che non si sia verificata alcuna contaminazione del controllo negativo o dei pozzetti a causa di campioni positivi, fuoriuscite o coniugato enzimatico; 5. che le micropipette non sono state contaminate con campioni positivi o con il coniugato enzimatico; 6. che gli aghi del lavatore non siano bloccati o parzialmente ostruiti.
Calibratore S/CO < 1.1	1. Che la procedura sia stata eseguita correttamente; 2. che non sia stato commesso alcun errore nella sua distribuzione (es.: dispensazione del controllo negativo al posto del siero di controllo); 3. che la procedura di lavaggio e le impostazioni del lavatore siano convalidate nello studio di prequalifica; 4. che non si sia verificata alcuna contaminazione esterna del controllo del calibratore.
Controllo positivo < 1.000 OD450nm	1. Che la procedura sia stata eseguita correttamente; 2. che non è stato commesso alcun errore nella distribuzione dei controlli (dispensazione del controllo negativo anziché del controllo positivo. In questo caso, anche il controllo negativo avrà un valore OD450nm > 0,150);

	<p>3. che la procedura di lavaggio e le impostazioni del lavatore siano convalidate nello studio di prequalifica;</p> <p>4. che non si sia verificata alcuna contaminazione esterna del controllo positivo.</p>
--	---

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

M. CALCOLO DEL CUT-OFF

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

$$NC + 0.350 = \text{Cut-Off (CO)}$$

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

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

N. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

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

S/CO	Interpretazione
<0.9	Negativo
0.9-1.1	Equivoco
>1.1	Positivo

Un risultato negativo indica che il paziente non è stato infettato da HCV o che l'unità di sangue può essere trsfusa.

Ogni paziente che mostra un risultato ambiguo deve essere nuovamente testato su un secondo campione prelevato a distanza di 1-2 settimane. L'unità di sangue non deve essere trsfusa.

Un risultato positivo è indicativo di infezione da HCV e quindi il paziente deve essere trattato di conseguenza o l'unità di sangue deve essere scartata.

Note importanti:

1. L'interpretazione dei risultati deve essere eseguita sotto la supervisione del responsabile del laboratorio per ridurre il rischio di errori di giudizio e interpretazioni errate.

2. Qualsiasi risultato positivo deve essere confermato da un metodo alternativo in grado di rilevare gli anticorpi IgG e IgM (test di conferma) prima di formulare una diagnosi di epatite virale.

3. Come dimostrato nella Valutazione delle Prestazioni del prodotto, il test è in grado di rilevare la sierconversione ad anticorpi core anti-HCV prima di alcuni altri kit commerciali. Pertanto, un risultato positivo, non confermato con questi kit commerciali, non deve essere escluso come risultato falso positivo! Il campione deve comunque essere sottoposto ad un test di conferma.

4. Dato che il test è in grado di rilevare anche gli anticorpi IgM, possono essere presenti alcuni risultati discrepanti con altri prodotti commerciali per la rilevazione di anticorpi anti-HCV - privi di coniugato anti-IgM nella formulazione del tracciante enzimatico e quindi privi di reattività IgM. La reale positività del campione per gli anticorpi anti-HCV dovrebbe poi essere confermata esaminando anche la reattività IgM, importante per la diagnosi di infezione da HCV.

5. Quando i risultati dei test vengono trasmessi dal laboratorio a un centro informatico, è necessario prestare attenzione per evitare trasferimenti di dati errati.

6. La diagnosi di infezione da epatite virale deve essere valutata e confermata al paziente solo da un medico qualificato.

Di seguito è riportato un esempio di calcolo:

I dati della seguente tabella devono essere considerati solo come esempio.

CONTROLLO NEGATIVO	OD 450 nm 0,019 – 0,020 – 0,020
Valore medio OD 450 nm: 0,020	Inferiore a 0,050
ACCETTATO	
CONTROLLO POSITIVO	OD 450 nm 2,189
OD 450 nm superiore a 1,000	
ACCETTATO	
CUT-OFF	0,020 + 0,350 = 0,370
CALIBRATORE	OD 450 nm 0,550 – 0,530
Valore medio OD 450 nm: 0,540	S/CO = 1,4 superiore a 1,1
ACCETTATO	
Campione 1 OD 450 nm: 0,070	S/CO < 0,9
NEGATIVO	
Campione 2 OD 450 nm: 1,690	S/CO > 1,1
POSITIVO	

O. PRESTAZIONI

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

O.1. Limite di rilevabilità

Il limite di rilevamento del test è stato calcolato mediante il British Working Standard for anti-HCV, codice NIBSC 99 / 588-003-WI. La tabella seguente riporta i valori medi di OD450nm di questo standard quando diluito in plasma negativo e poi esaminato.

Diluizione	Lotto # 1	Lotto # 2
Fattore	S/CO	S/CO
1 X	2.0	2.0
2 X	1.1	1.2
4 X	0.7	0.8
8 X	0.5	0.5
Plasma negativo	0.3	0.3

Inoltre, il campione codificato Accurun 1 - serie 3000 - fornito da Boston Biomedica Inc., USA, è stato valutato "in toto" mostrando i risultati di seguito:

Sclavo HCV ID del lotto	Accurun 1 Serie	S/CO
1201	3000	1.5
0602	3000	1.5
1202	3000	1.9

Inoltre, n°7 campioni, risultati positivi per HCV Ab con Ortho HCV 3.0 SAVE, codice 930820, lotto # EXE065-1, sono stati diluiti in plasma negativo agli anticorpi anti-HCV per generare diluizioni limitanti e quindi testati nuovamente su Sclavo-EIA HCV Ab, lotto. # 1202 e Ortho.

La seguente tabella riporta i dati ottenuti:

Campione n°	Fattore di diluizion e	Sclavo HCV S/CO	Ortho 3.0 S/CO
1	256 X	1.9	1.3
2	256 X	1.9	0.7
3	256 X	2.4	1.0
4	128 X	2.5	3.2
5	85 X	3.3	1.4

6	128 X	2.2	0.8
7	135 X	3.2	2.2

O.2. Specificità diagnostica:

È definita come la probabilità del test di ottenere un risultato negativo in assenza di analita specifico. Oltre al primo studio, nel quale sono stati esaminati un totale di 5043 donatori di sangue non selezionati (inclusi i donatori per la prima volta), 210 pazienti ospedalizzati e 162 campioni potenzialmente interferenti (altre malattie infettive, anticorpi E. coli positivi, pazienti affetti da malattie epatiche non virali, pazienti in dialisi, donne in gravidanza, emolizzati, lipemici, ecc.), la specificità diagnostica è stata recentemente valutata testando un totale di 2876 donatori di sangue negativi su sei diversi lotti. È stato trovato un valore di specificità del 100%.

Non è stata osservata alcuna falsa reattività dovuta al metodo di preparazione del campione. Sia il plasma, derivato con diverse tecniche standard di preparazione (citrato, EDTA ed eparina), sia il siero sono stati utilizzati per determinare il valore di specificità.

Anche i campioni congelati sono stati testati per verificare la presenza di interferenze dovute alla raccolta e alla conservazione. Non è stata osservata alcuna interferenza.

O.3. Sensibilità diagnostica:

È definita come la probabilità del test di ottenere un risultato positivo in presenza di un analita specifico.

La sensibilità diagnostica è stata valutata esternamente su un numero totale di 359 campioni; è stata riscontrata una sensibilità diagnostica del 100%. Internamente sono stati testati altri 50 campioni positivi, fornendo un valore di sensibilità diagnostica di nuovo del 100%. Sono stati testati anche campioni positivi ad infezioni sostenute da diversi genotipi di HCV.

Inoltre, sono stati studiati la maggior parte dei pannelli di sierconversione disponibili da Boston Biomedica Inc., USA, (PHV) e Zeptomatrix, USA, (HCV).

Di seguito sono riportati i risultati per alcuni di essi:

Pannello	N° di campioni	Sclavo*	Ortho* **
PHV 901	11	9	9
PHV 904	7	2	4
PHV 905	9	3	4
PHV 906	7	7	7
PHV 907	7	3	2
PHV 908	13	10	8
PHV 909	3	2	2
PHV 910	5	3	3
PHV 911	5	3	3
PHV 912	3	1	1
PHV 913	4	2	2
PHV 914	9	5	5
PHV 915	4	3	0
PHV 916	8	4	3
PHV 917	10	6	6
PHV 918	8	2	0
PHV 919	7	3	3
PHV 920	10	6	6
HCV 10039	5	2	0
HCV 6212	9	6	7
HCV 10165	9	5	4

Nota: * campioni positivi rilevati

** HCV v.3.0

Infine, il prodotto è stato testato sul pannello EFS Ac HCV, lotto n°01/08.03.22C/01/A, fornito dall'Etablissement Francais Du Sang (EFS), Francia, con i seguenti risultati:

EFS Pannello Ab HCV

Campione	Lotto # 1 S/CO	Lotto # 2 S/CO	Lotto # 2 S/CO	Risultati attesi
HCV 1	2.2	2.4	2.6	Positivo
HCV 2	1.6	2.0	2.1	Positivo
HCV 3	1.5	1.7	1.6	Positivo

HCV 4	5.2	6.5	5.5	Positivo
HCV 5	1.6	1.8	1.6	Positivo
HCV 6	0.4	0.4	0.4	Negativo

O.4. Precisione:

È stato calcolato su due campioni, uno negativo e uno debolmente positivo, esaminati in 16 repliche in tre sessioni separate. I risultati sono riportati come segue:

Lotto # 1202 Campione negativo (N = 16)

Valori medi	1° analisi	2° analisi	3° analisi	Valore medio
OD 450nm	0.094	0.099	0.096	0.096
Deviazione standard	0.008	0.007	0.008	0.007
CV %	8.7	6.6	7.9	7.7

Cal # 2 – 7K (N = 16)

Valori medi	1° analisi	2° analisi	3° analisi	Valore medio
OD 450nm	0.396	0.403	0.418	0.406
Deviazione standard	0.023	0.029	0.027	0.026
CV %	5.9	7.1	6.4	6.5
S/Co	1.1	1.1	1.2	1.1

Lotto # 0602

Campione negativo (N = 16)

Valori medi	1° analisi	2° analisi	3° analisi	Media
OD 450nm	0.097	0.096	0.094	0.096
Deviazione standard	0.009	0.010	0.008	0.009
CV %	8.9	10.1	8.4	9.1

Cal # 2 – 7K (N = 16)

Valori medi	1° analisi	2° analisi	3° analisi	Valore medio
OD 450nm	0.400	0.395	0.393	0.396
Deviazione standard	0.021	0.025	0.026	0.024
CV %	5.4	6.2	6.6	6.1
S/CO	1.2	1.2	1.1	1.2

Lotto # 0602/2

Campione negativo (N = 16)

Valori medi	1° analisi	2° analisi	3° analisi	Media
OD 450nm	0.087	0.091	0.088	0.089
Deviazione standard	0.009	0.007	0.008	0.008
CV %	10.0	8.2	8.6	8.9

Cal # 2 – 7K (N = 16)

Valori medi	1° analisi	2° analisi	3° analisi	Media
OD 450nm	0.386	0.390	0.391	0.389
Deviazione standard	0.023	0.021	0.023	0.022
CV %	6.0	5.3	5.8	5.7
S/CO	1.1	1.2	1.2	1.2

La variabilità mostrata nelle tabelle precedenti non ha comportato un'errata classificazione del campione.

P. LIMITAZIONI

I risultati falsi positivi ripetibili, non confermati dal RIBA o da tecniche di conferma simili, sono stati valutati come meno dello 0,1% della popolazione normale.

È stato osservato che campioni congelati contenenti particelle di fibrina o aggregati dopo lo scongelamento hanno generato alcuni risultati errati.

BIBLIOGRAFIA

1. **CDC**. Public Health Service inter-agency guidelines for screening donors of blood, plasma, organs, tissues, and semen for evidence of hepatitis B and hepatitis C. *MMWR* 1991;40(No. RR-4):1-17.
2. **Alter MJ**. Epidemiology of hepatitis C. *Hepatology* 1997; 26:62S-5S.
3. **McQuillan GM, Alter MJ, Moyer LA, Lambert SB, Margolis HS**. A population based serologic study of hepatitis C virus infection in the United States. In Rizzetto M, Purcell RH, Gerin JL, Verme G, eds. *Viral Hepatitis and Liver Disease*, Edizioni Minerva Medica, Turin, 1997, 267-70.
4. **Dufour MC**. Chronic liver disease and cirrhosis. In Everhart JE, ed. *Digestive diseases in the United States: epidemiology and impact*. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. Washington, DC: US Government Printing Office, 1994; NIH publication no. 94-1447, 615-45.
5. **Alter MJ, Hadler SC, Judson FN, et al**. Risk factors for acute non-A, non-B hepatitis in the United States and association with hepatitis C virus infection. *JAMA* 1990;264:2231-35.
6. **Alter HJ, Holland PV, Purcell RH, et al**. Posttransfusion hepatitis after exclusion of commercial and hepatitis-B antigen-positive donors. *Ann Intern Med* 1972;77:691-9.
7. **Alter HJ, Purcell RH, Holland PV, Feinstone SM, Morrow AG, Moritsugu Y**. Clinical and serological analysis of transfusion-associated hepatitis. *Lancet* 1975;2:838-41.
8. **Seeff LB, Wright EC, Zimmerman HJ, McCollum RW, VA Cooperative Studies Group**. VA cooperative study of post-transfusion hepatitis and responsible risk factors. *Am J Med Sci* 1975;270:355-62.
9. **Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV**. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med* 1975;292:767-70.
10. **Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW**. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989;244:359-62.
11. **Kuo G, Choo QL, Alter HJ, et al**. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 1989;244:362-4.
12. **Alter HJ, Purcell RH, Shih JW, et al**. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 1989;321:1494-1500.
13. **Aach RD, Stevens CE, Hollinger FB, et al**. Hepatitis C virus infection in post-transfusion hepatitis. An analysis with first- and second-generation assays. *N Engl J Med* 1991;325:1325-9.
14. **Alter MJ, Margolis HS, Krawczynski K, Judson, FN, Mares A, Alexander WJ, et al**. The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. *N Engl J Med* 1992;327:1899-1905.
15. **Alter, MJ**. Epidemiology of hepatitis C in the west. *Semin Liver Dis* 1995;15:5-14.
16. **Donahue JG, Nelson KE, Muñoz A, et al**. Antibody to hepatitis C virus among cardiac surgery patients, homosexual men, and intravenous drug users in Baltimore, Maryland. *Am J Epidemiol* 1991;134:1206-11.
17. **Zeldis JB, Jain S, Kuramoto IK, et al**. Seroepidemiology of viral infections among intravenous drug users in northern California. *West J Med* 1992;156:30-5.
18. **Fingerhood MI, Jasinski DR, Sullivan JT**. Prevalence of hepatitis C in a chemically dependent population. *Arch Intern Med* 1993;153:2025-30.
19. **Garfein RS, Vlahov D, Galai N, Doherty, MC, Nelson, KE**. Viral infections in short-term injection drug users: the prevalence of the hepatitis C, hepatitis B, human immunodeficiency, and human T-lymphotropic viruses. *Am J Pub Health* 1996;86:655-61.
20. **Brettler DB, Alter HJ, Deinstag JL, Forsberg AD, Levine PH**. Prevalence of hepatitis C virus antibody in a cohort of hemophilia patients. *Blood* 1990;76:254-6.
21. **Troisi CL, Hollinger FB, Hoots WK, et al**. A multicenter study of viral hepatitis in a United States hemophilic population. *Blood* 1993;81:412-8.
22. **Kumar A, Kulkarni R, Murray DL, et al**. Serologic markers of viral hepatitis A, B, C, and D in patients with hemophilia. *J Med Virology* 1993;41:205-9.
23. **Tokars JI, Miller ER, Alter MJ, Arduino MJ**. National surveillance of dialysis associated diseases in the United States, 1995. *ASAIO Journal* 1998;44:98-107.

24. **Osmond DH, Charlebois E, Sheppard HW, et al.** Comparison of risk factors for hepatitis C and hepatitis B virus infection in homosexual men. *J Infect Dis* 1993;167:66-71.
25. **Weinstock HS, Bolan G, Reingold AL, Polish LB:** Hepatitis C virus infection among patients attending a clinic for sexually transmitted diseases. *JAMA* 1993;269:392-4.
26. **Guss D, Sherigar J, Rosen P, Mohanty SR.** Diagnosis and Management of Hepatitis C Infection in Primary Care Settings. *J Gen Intern Med.* 2018 Apr;33(4):551-557. doi: 10.1007/s11606-017-4280-y. Epub 2018 Jan 19. PMID: 29352420; PMCID: PMC5880771.
27. **Wilkins T, Akhtar M, Gititu E, Jalluri C, Ramirez J.** Diagnosis and Management of Hepatitis C. *Am Fam Physician.* 2015 Jun 15;91(12):835-42. PMID: 26131943.
28. **Ansaldi F, Orsi A, Sticchi L, Bruzzone B, Icardi G.** Hepatitis C virus in the new era: perspectives in epidemiology, prevention, diagnostics and predictors of response to therapy. *World J Gastroenterol.* 2014 Aug 7;20(29):9633-52. doi: 10.3748/wjg.v20.i29.9633. PMID: 25110404; PMCID: PMC4123355.
29. **Carloni G, Crema A, Valli MB, Ponzetto A, Clementi M.** HCV infection by cell-to-cell transmission: choice or necessity? *Curr Mol Med.* 2012 Jan;12(1):83-95 doi: 10.2174/156652412798376152. PMID: 22082483.
30. **Baldo V, Baldovin T, Trivello R, Floreani A.** Epidemiology of HCV infection. *Curr Pharm Des.* 2008;14(17):1646-54. doi: 10.2174/138161208784746770. PMID: 18673187. Erensoy S. Diagnosis of hepatitis C virus (HCV) infection and laboratory monitoring of its therapy. *J Clin Virol.* 2001 Jun;21(3):271-81. doi: 10.1016/s1386-6532(00)00170-0. PMID: 11397664.

Simboli utilizzati

 = Dispositivo medico diagnostico in vitro

 = Numero di catalogo

 = Numero del lotto

 = Fabbricante

 = Data di scadenza

 = Temperatura di conservazione

 = Istruzioni d'uso