



Sclavo-EIA HTLV I/II Ab Screen

Ref ELI904001

Istruzioni d'uso

Rev. D ELI904001-05-2022



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 HTLV I/II Ab screen è un kit ELISA per lo screening simultaneo degli anticorpi totali contro il virus T linfotropico umano di tipo 1 e 2 nel plasma e nel siero umani.

Questo kit può essere utilizzato per lo screening di campioni di donatori di sangue nelle banche del sangue e per il follow-up di pazienti infetti da HTLV 1 e 2 nei laboratori diagnostici.

B. INTRODUZIONE

Il virus T linfotropico umano di tipo 1 (HTLV-1) è stato il primo retrovirus umano scoperto nel 1980; è l'agente eziologico della leucemia a cellule T adulte e della mielopatia / paraparesi spastica tropicale associata a HTLV-1. Il virus della leucemia a cellule T umane di tipo 2 (HTLV-2) è stato isolato per la prima volta da un paziente con leucemia a cellule capellute nel 1982. Esistono tre modalità principali di trasmissione dell'HTLV: verticale (per esempio al momento del parto o dell'allattamento al seno), parenterale (per esempio trasfusione di sangue o derivati del sangue contaminati, trapianto di organi infetti o condivisione di siringhe infette tra tossicodipendenti per via endovenosa) e sessuale.

L'HTLV 1 è endemico in alcune parti del mondo (Giappone sudoccidentale, Sud America, Bacino caraibico, Medio Oriente, Australo - Melanesia, Indie occidentali, Giamaica), così come nell'Africa equatoriale. L'HTLV-2 è meno diffuso rispetto al tipo 1 ed è endemico nell'Africa centrale e occidentale, nelle popolazioni native amerindi nel Nord, Centro e Sud America e tra i consumatori di droghe per via endovenosa negli Stati Uniti e in Europa.

ELISA è stato applicato alla diagnosi sierologica di HTLV I/II rilevando anticorpi specifici nel plasma e nel siero.

C. PRINCIPIO DEL METODO

La fase solida (pozzetti per microtitolazione) è sensibilizzata con antigeni immunodominanti sintetici specifici per HTLV 1 e 2 derivati da gp46-I, gp46-II e gp21.

I campioni vengono aggiunti nei pozzetti della microtitolazione e, se nel campione sono presenti anticorpi specifici per HTLV 1 o HTLV 2 (IgG, IgM o IgA), formeranno complessi stabili con gli antigeni ricombinanti rivestiti nella fase solida.

Dopo una fase di lavaggio per rimuovere le proteine non legate, i complessi antigene-anticorpo vengono rilevati mediante l'aggiunta di antigeni sintetici specifici derivati da gp46-I, gp46-II e gp21, marcati con perossidasi (HRP).

La presenza di anticorpi anti-HTLV 1 e anti-HTLV 2 viene rivelata aggiungendo il substrato incolore TMB per avviare la reazione colorimetrica. Il colore blu che si sviluppa è proporzionale alla quantità di anticorpo/antigene legato alla fase solida. La reazione enzimatica viene bloccata con una soluzione acida e il colore della miscela di reazione passa dal blu al giallo.

D. COMPONENTI DEL KIT E LORO PREPARAZIONE

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

Micropiastra

MICROPLATE

12 strisce x 8 pozzetti rivestiti con antigeni immunodominanti sintetici specifici di HTLV 1 e 2 derivati da gp46-I, gp46-II e gp21 in una busta richiudibile con sacchetto essiccante.

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

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

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

Controllo negativo

CONTROL -



GHS07

1 fialone x 2 ml. Pronto all'uso. Codice colore: giallo-marrone. Agitare accuratamente su vortex prima dell'uso.

Tampone fosfato 10 mM pH 7,4 contenente BSA 5%. 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

CONTROL +



GHS07

1 fialone x 2 ml. Pronto all'uso. Codice colore: verde chiaro. Agitare accuratamente su vortex prima dell'uso.

Tampone fosfato 10 mM pH 7,4 contenente siero umano inattivato positivo per HTLV Ab, BSA 5%. 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)

Calibratore

CAL



GHS07

1 flacone. Liofilizzato. Da ricostituire con il volume di acqua di grado EIA riportato in etichetta. Agitare accuratamente su vortex prima dell'uso.

Anticorpi anti HTLV I/III inattivati, calibrati contro Seracare Accurun 24, 4% BSA, 2% mannitolo, tampone Tris 50 mM pH 7,8. Conservanti: gentamicina solfato (0,02%) e Proclin™ 300 (0,045%).

Importante: una volta ricostituito, il calibratore non è stabile. Preparare aliquote e conservare a -20°C fino a 6 mesi.

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

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

Tampone di lavaggio concentrato

WASHBUF 20X



GHS09



GHS07

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

Una volta diluito contiene 10 mM di tampone fosfato pH 7.0, 0,5% Tween 20 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 risultati falsi.

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

CONJ



GHS07

1 flacone x 16 ml. Pronto all'uso. Codice colore: rosa/rosso. Mescolare delicatamente prima dell'uso.

Tampone Tris 10 mM pH 6,8, miscela di antigeni sintetici HTLV, etichettati con HRP, BSA 5% Conservanti: gentamicina solfato (0,02%) 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 flacone 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. fumi di ipoclorito), superfici metalliche; conservare al riparo dalla luce.

Acido solforico

H₂SO₄ 0.3 M



GHS05

1 flacone x 15 ml. Pronto all'uso. Mescolare per inversione prima dell'uso.

Soluzione 0.3 M H₂SO₄.

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

Contiene Acido Solforico (CAS 7664-93-9)

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

Vetreria di 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.

Lettore 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 vortex o similare.

Timer.

Carta assorbente per asciugare la micropiastra.

F. PRECAUZIONI E AVVERTENZE

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

1. Il kit deve essere utilizzato solo da personale tecnico qualificato e adeguatamente formato, sotto la supervisione di un medico responsabile del laboratorio.

2. Quando il kit è utilizzato per lo screening di unità ematiche ed emocomponenti, deve essere utilizzato in un laboratorio certificato e qualificato dall'autorità nazionale del settore (Ministero della Salute o entità simile) per effettuare questo tipo di analisi.

3. Tutto il personale coinvolto nell'esecuzione del test deve indossare indumenti protettivi da laboratorio, guanti privi di talco e occhiali. Evitare l'uso di dispositivi affilati (aghi) o taglienti (lame). Tutto il personale coinvolto deve essere formato nelle procedure di biosicurezza, come raccomandato dal Center for Disease Control, Atlanta, USA e riportato nella pubblicazione del National Institute of Health: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.

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

G. CAMPIONE: TIPO, PREPARAZIONE E RACCOMANDAZIONI.

1. Il sangue viene prelevato in modo asettico mediante prelievo venoso e il plasma o il siero vengono preparati utilizzando tecniche standard di preparazione dei campioni per analisi cliniche di laboratorio. L'uso di anticoagulanti come citrato, EDTA ed eparina non interferisce con 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 consigliate.
4. I campioni emolizzati (rossastri) e visibilmente fortemente lipemici ("lattiginosi") devono essere scartati in quanto potrebbero generare risultati falsi. I campioni contenenti residui di fibrina o particelle pesanti o filamenti e corpi microbici devono essere scartati in quanto potrebbero dare origine a risultati falsi.
5. I sieri e il plasma possono essere conservati a 2°-8°C in provette di raccolta primaria per un massimo di cinque giorni dopo la raccolta.
Non congelare le provette primarie di raccolta. Per periodi di conservazione più lunghi, i campioni di siero e plasma, accuratamente rimossi dalla provetta di raccolta primaria, possono essere conservati congelati a -20°C secondo le procedure di conservazione dei campioni validate dal Laboratorio. I campioni congelati non devono essere congelati/scongelati più di una volta poiché ciò potrebbe generare particelle che potrebbero influenzare il risultato del test.
6. Se sono presenti particelle, centrifugare a 2.000 rpm per 20 minuti o filtrare utilizzando filtri da 0,2-0,8 micron per chiarificare il campione per il test.

H. STRUMENTI UTILIZZATI IN ABBINAMENTO AL KIT

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

I. CONTROLLI E OPERAZIONI PRELIMINARI

1. Verificare la data di scadenza del kit stampata sull'etichetta esterna della confezione del kit. Non utilizzare i reagenti oltre la data di scadenza indicata.
2. Verificare che i componenti liquidi non siano contaminati da particelle o aggregati visibili ad occhio nudo. Verificare che il cromogeno/substrato sia incolore o blu pallido aspirandone un piccolo volume con una pipetta di plastica trasparente sterile. Verificare che non si siano verificate rotture durante il trasporto e che non siano presenti fuoriuscite di liquido all'interno della scatola. Verificare che la busta di alluminio, contenente la micropiastre, non sia forata o danneggiata.
3. Diluire tutto il contenuto della soluzione di lavaggio concentrata 20x come descritto sopra.
4. Sciogliere il calibratore liofilizzato 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 ed 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 HTLV I/II Ab.

Nel caso in cui il test venga eseguito in modo automatizzato, si consiglia di dispensare il campione direttamente nell'apposito pozzetto della micropiastra.

Prima di aspirare il campione successivo, gli aghi devono essere adeguatamente lavati per evitare qualsiasi contaminazione incrociata tra i campioni.

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

Analisi manuale:

1. Posizionare il numero richiesto di strip da 8 nella cornice dei micropozzetti in funzione del n° di campioni da analizzare. Identificare attentamente i pozzetti per controlli, calibratore e campioni. Lasciare il primo pozzetto (A1) vuoto per il bianco.
2. Dispensare 100 µl di controllo negativo in triplicato, 100 µl di calibratore in duplicato, 100 µl di controllo positivo in singolo seguito da 100 µl per ogni campione nei pozzetti appropriati.
3. Incubare la micropiastra, sigillata con la pellicola adesiva in dotazione, per 45 minuti a 37°C.
4. 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).
5. Pipettare 100 µl coniugato in ogni pozzetto, tranne nel pozzetto A1 (bianco) e coprire con la pellicola adesiva.
Nota importante: fare attenzione a non toccare la superficie interna in plastica del pozzetto con la punta riempita con il coniugato enzimatico. Potrebbe verificarsi contaminazione.
6. Incubare la micropiastra, sigillata con la pellicola adesiva in dotazione, per 45 minuti a 37°C.
7. Lavare la micropiastra come al punto 5.
8. Pipettare 100 µl di miscela di cromogeno/substrato in ogni pozzetto, compreso il pozzetto del bianco (A1). Quindi incubare la micropiastra a temperatura ambiente (18-24°C) per 15 minuti.
Avviare il conto alla rovescia dal momento in cui il reagente viene dispensato nel primo pozzetto di reazione.
Nota importante: Non esporre a una forte illuminazione diretta: potrebbe generarsi un risultato falso.
9. Pipettare 100 µl di acido solforico in tutti i pozzetti utilizzando la stessa sequenza di pipettaggio del passaggio 8 per arrestare la reazione enzimatica. L'aggiunta di acido trasformerà il controllo positivo e i campioni positivi da blu a giallo/marrone.
10. Misurare l'intensità del colore della soluzione in ogni pozzetto, come descritto nella sezione H.5, utilizzando un filtro da 450 nm (lettura) e da 620-630 nm (sottrazione del background), oscurando lo strumento su A1 (obbligatorio).

Note importanti:

1. Assicurarsi che non siano presenti impronte sul fondo del micropozzetto prima della lettura. Le impronte digitali potrebbero generare risultati falsi positivi alla lettura.
2. La lettura deve essere eseguita subito dopo l'aggiunta della soluzione bloccante e comunque non oltre 20 minuti dalla sua aggiunta. Può verificarsi una certa autoossidazione del cromogeno che porta ad un elevato background.
3. Il calibratore (CAL) non influisce sul calcolo del cut-off e quindi sul calcolo dei risultati del test. Il calibratore può essere utilizzato solo quando è richiesto un controllo di qualità interno del Laboratorio CQ.
4. È stato dimostrato che l'agitazione a 350 ± 150 rpm durante l'incubazione aumenta la sensibilità del test di circa il 20%.

K. SCHEMA DEL TEST

Operazioni	Procedura
Controlli, Calibratore, Campioni	100 µl
1° incubazione	45 min
Temperatura	+37°C
Fase di lavaggio	n°5 cicli con 20" di attesa OPPURE n°6 cicli senza attesa
Coniugato	100 µl in tutti i pozzetti tranne l'A1
2° incubazione	45 min
Temperatura	+37°C
Fase di lavaggio	n°5 cicli con 20" di attesa OPPURE n°6 cicli senza attesa
TMB/H ₂ O ₂	100 µl in tutti i pozzetti

3° incubazione	15 min
Temperatura	Ambiente (18-24°C)
Acido solforico	100 µl in tutti i pozzetti
Letture OD	450nm / 620-630nm

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

Ad ogni utilizzo del kit viene effettuato un controllo sui controlli e sul calibratore per verificare se i loro valori OD450nm sono quelli attesi e riportati nella tabella sottostante.

Parametro	Requisiti
Bianco	Valore <0,100 OD 450 nm
Controllo negativo (NC)	<0,150 valore medio OD450nm dopo la sottrazione del bianco.
Calibratore	Index S/CO > 1,5
Controllo positivo	>1,000 OD 450 nm

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
Pozzetto bianco > 0.100 OD450nm	1. che la soluzione di cromogeno/substrato non sia stata contaminata durante l'analisi.

<p>Controllo negativo (NC) > 0,150 OD 450 nm</p>	<ol style="list-style-type: none"> 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 che di quello negativo); 4. che non si sia verificata alcuna contaminazione del controllo negativo o dei pozzetti in cui è stato dispensato il controllo a causa di fuoriuscite di campioni positivi o del coniugato enzimatico; 5. che le micropipette non siano state contaminate con campioni positivi o con il coniugato enzimatico; 6. che gli aghi del lavatore non siano bloccati o parzialmente ostruiti.
--	---

<p>Calibratore S/CO < 1,500</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. che la procedura sia stata eseguita correttamente; 2. che non si sia verificato alcun errore durante la sua distribuzione (es.: dispensazione del controllo negativo invece che del controllo positivo); 3. che la procedura di lavaggio e le impostazioni del lavatore siano convalidate nello studio di qualificazione; 4. che non si sia verificata alcuna contaminazione esterna del calibratore.
<p>Controllo positivo < 1,000 OD 450 nm</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. che la procedura sia stata eseguita correttamente; 2. che non si sia verificato alcun errore durante la distribuzione del controllo (dispensazione del controllo negativo al posto del calibratore. In questo caso anche il controllo negativo avrà un valore OD450nm > 0.200); 3. che la procedura di lavaggio e le impostazioni del lavatore siano convalidate nello studio di prequalificazione; 4. che non si sia verificata alcuna contaminazione esterna del controllo positivo.

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

M. CALCOLO DEL CUT-OFF

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

$$NC + 0,200 = \text{Cut-Off (CO)}$$

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

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 HTLV I/II o che l'unità di sangue può essere trasfusa.

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 trasfusa.

Un risultato positivo è indicativo di infezione da HTLV I/II e pertanto il paziente deve essere trattato di conseguenza o l'unità ematica 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 anticorpi anti HTLV (RIBA o simili), ed eventualmente con un test di biologia molecolare, prima di formulare una diagnosi di infezione da HTLV.
3. Quando i risultati dei test vengono trasmessi dal laboratorio a un altro reparto, è necessario prestare attenzione per evitare trasferimenti di dati errati.
4. La diagnosi di infezione da HTLV deve essere valutata e confermata al paziente da un medico adeguatamente qualificato.

Di seguito è riportato un esempio di calcolo:

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

CONTROLLO NEGATIVO	OD 450 nm: 0,079 – 0,080 – 0,081
Valore medio OD 450 nm: 0,080	Inferiore a 0,150
ACCETTATO	
CUT-OFF	$0,200 + 0,080 = 0,280$
CONTROLLO POSITIVO	OD 450 nm: 2,479-2,481
Valore medio OD 450 nm: 2,480	Superiore a 1,000
ACCETTATO	
CALIBRATORE	OD 450 nm: 1,105 – 1,115
Valore medio OD 450 nm: 1,110 S/CO = 3,96	S/CO superiore a 1,5
ACCETTATO	
Campione 1 OD 450 nm: 0,048 S/CO = 0,17	S/CO < 0,9
NEGATIVO	
Campione 2 OD 450 nm: 1,48 S/CO = 5,29	S/CO > 1,1
POSITIVO	

O. PRESTAZIONI

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

O.1. Sensibilità analitica

Il limite di rilevabilità dell'analisi è stato calcolato mediante il preparato Accurun 24, lotto n.118956, prodotto da Seracare Life Sciences, USA.

La tabella sottostante riporta i risultati ottenuti per questo materiale con tre lotti di prodotti (P1, P2 e P3).

Accurun 24 è stato diluito in siero negativo per anticorpi anti-HTLV ed esaminato in 4 repliche.

Fattore di diluizione	Lotto P1	Lotto P2	Lotto P3
	OD 450 nm		
1:4	2,981	2,957	3,455
1:8	1,964	1,856	1,992
1:16	0,935	0,820	0,971
1:32	0,551	0,453	0,562
1:64	0,318	0,357	0,434
1:128	0,201	0,195	0,251
Diluent	0,040	0,059	0,055

O.2. Specificità e sensibilità diagnostica.

La valutazione delle prestazioni del dispositivo è stata effettuata in una prova condotta su più di 5000 campioni totali, secondo i requisiti del CTS: 2009.

Ulteriori test sono stati effettuati internamente su pannelli disponibili in commercio di campioni positivi caratterizzati.

O.3. Specificità diagnostica:

È definita come la probabilità del test di ottenere un risultato negativo in assenza di analita specifico. Nella prima parte dello studio sono stati esaminati un totale di più di 5000 campioni, inclusi donatori non selezionati, pazienti ospedalizzati e campioni potenzialmente cross-reattivi, corrispondenti ai requisiti di CTS: 2009, la specificità risultante è stata del 100%. In uno studio successivo sono stati testati un totale di 3354 campioni negativi su cinque diversi lotti. Anche in questo caso è stato osservato un valore di specificità del 100%.

Sono stati testati sia plasma, derivato con diverse tecniche standard di preparazione (citrato, EDTA ed eparina), sia siero per garantire l'assenza di interferenze dovute alla preparazione del campione. Anche i campioni congelati sono stati testati per verificare la presenza di interferenze dovute alla raccolta e alla conservazione.

Non è stata osservata alcuna falsa reattività dovuta al metodo di preparazione del campione.

O.4. 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 nella Valutazione Interna delle Prestazioni su un numero totale di oltre 400 campioni provenienti sia da pazienti infetti da HTLV I (n = 305) che da HTLV II (n = 112).

La sensibilità diagnostica è stata inoltre valutata su:

- Il pannello codice PRP 207 / M fornito da BBI, USA;
- Due pannelli prodotti da EFS, Francia, e basati su campioni di origine europea;
- NIBSC UK - Campione di monitoraggio per anti-HTLV-I, lotto 03 / 104-009.

utilizzando il kit HTLV I/II ELISA prodotto da Murex come riferimento (valori riportati nel foglio illustrativo del pannello o testati internamente utilizzando il kit Murex); i campioni sono stati valutati in duplicato (n = 2).

È stata rilevata una sensibilità diagnostica del 100%.

I risultati ottenuti sui pannelli sono riportati di seguito:

Codice pannello BBI PRP 207/M

EFS – Pannello Ac HTLV lotto # 07.140625

Membro N°	Kit S/CO	Murex S/CO
1	1.5	4.2
2	7.6	6.9
3	4.7	8.6
4	4.0	8.1
5	2.5	4.5
6 (diluente)	0.2	0.2

EFS – Pannello Ac HTLV lotto # 05/08.2012.22C

Membro N°	Kit S/CO	Murex S/CO	Tipo
1	3.4	10.1	p19I/p24/gp46I
2	12.2	13.3	p19I/gp46I/gp21
3	10.6	9.4	gp46I
4	11.1	9.6	gp46II

NIBSC – Lotto 03/104-009

Campione N°	Risultato	Sclavo S/CO	Murex S/CO
1	POS	15.1	11.8
2	POS	8.0	11.6
3	POS	13.3	11.6
4	POS	17.4	11.8
5	POS	17.4	11.6
6	/	/	/
7	POS	17.4	11.6
8	POS	17.4	11.6
9	POS	17.4	11.6
10	POS	17.0	11.6
11	POS	10.4	11.8
12	POS	17.4	11.6
13	POS	17.4	11.6
14	POS	17.4	11.6
15	NEG	0.5	0.2

P1	P2	P3	Murex
S/CO	S/CO	S/CO	S/CO
1.8	1.3	1.9	2.1

O.5 Precisione

Il controllo negativo (NC), il calibratore (CAL) e il controllo positivo (PC) del dispositivo sono stati esaminati in 16 replicati per tre volte (totale n = 48) su tre diversi lotti del prodotto.

Sono stati calcolati i coefficienti di variazione (% CV) per le analisi intermedie ed interne.

Dai valori OD450nm ottenuti sono stati derivati i seguenti valori medi:

	NC	CAL	PC
OD450nm	0.095	1.135	2.495
DEV.ST.	0.010	0.070	0.074
%CV	9.6	6.2	3.0

La variabilità riportata in tabella non porta ad alcun fraintendimento in particolare di un campione chiuso alla soglia diagnostica dell'analisi.

P. LIMITAZIONI

Risultati falsi positivi ripetibili, non confermati da Western Blot o tecniche di conferma simili, sono stati valutati come meno dello 0,1% della popolazione normale.

Secondo le linee guida internazionali (CLSI C56-A) con campioni contenenti particelle di fibrina o aggregati, è possibile ottenere risultati falsi. Si consiglia, in questi casi, di centrifugare i campioni prima dell'utilizzo








Q. BIBLIOGRAFIA

1. **Abbaszadegan MR, Jafarzadeh N, Sankian M, Varasteh A, Mahmoudi M, Sadeghizadeh M, Khatami F, Mehramiz N.** Truncated MTA-1: A Pitfall in ELISA-Based Immunoassay of HTLV-1 Infection. *J Biomed Biotechnol.* 2008; 2008: 846371. doi: 10.1155/2008/846371.
2. **Lee H, Burczak JD and Shih,** Manual of Clinical Microbiology, 6th ed, Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, et al, eds, Washington, DC: American Society for Microbiology, 1995, 1115-20, Progressive Multifocal.
3. **Stoeckle W,** Introduction – Type C Oncoviruses including Human T-Cell Lymphotropic Viruses Types I and II, Pricipals an Practice of Infectious Diseases, 4th ed, Mandell GL, Bennett JE, and Dolin R, eds, New York, NY, Churchill Livingstone, 1955, 1579-84.
4. **Mangano AM, Remesar M, del Pozo A, Sen L.** Human T lymphotropic virus types I and II proviral sequences in Argentinian blood donors with indeterminate Western blot patterns. *J Med Virol.* 2004;74(2):323-7.
5. **Araujo AQ.** Neurological Aspects of HIV-1/HTLV-1 and HIV-1/HTLV-2 Coinfection. *Pathogens.* 2020 Mar 28;9(4):250. doi: 10.3390/pathogens9040250. PMID: 32231144 PMCID: PMC7238008.
6. **Pham D, Nguyen D, Nguyen TA, Tran C, Tran L, Devare S, Tran A, Bhatnagar S.** Seroprevalence of HTLV-1/2 Among Voluntary Blood Donors in Vietnam. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2019 Apr;35(4):376-381. doi: 10.1089/AID.2018.0240. Epub 2019 Jan 29. PMID: 30565470.
7. **Pilotti E, Bianchi MV, De Maria A, Bozzano F, Romanelli MG, Bertazzoni U, Casoli C.** HTLV-1/-2 and HIV-1 co-infections: retroviral interference on host immune status. *Front Microbiol.* 2013 Dec 23;4:372. doi: 10.3389/fmicb.2013.00372. PMID: 24391628; PMCID: PMC3870298.
8. **Medeiros ACM, Vidal LRR, Von Linsingen R, Ferin AN, Bessani Strapasson T, de Almeida SM, Raboni SM, Carvalho NS, Bordignon Nogueira M.** Confirmatory molecular method for HTLV-1/2 infection in high-risk pregnant women. *J Med Virol.* 2018 May;90(5):998-1001. doi: 10.1002/jmv.25014. Epub 2018 Jan 30. PMID: 29288577.
9. **Campos KR, Alves FA, Lemos MF, Moreira RC, Marcusso RMN, Caterino-de-Araujo A.** The reasons to include the serology of human T-lymphotropic virus types 1 and 2 (HTLV-1 and HTLV-2) in the clinical follow-up of patients with viral hepatitis B and C in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.* 2020 May 26;14(5):e0008245. doi: 10.1371/journal.pntd.0008245. PMID: 32453768; PMCID: PMC7274452.
10. **Roy U, Simpson SA, Mondal D, Eloby-Childress S, Winsor EL, Beilke MA.** Upregulation of HTLV-1 and HTLV-2 expression by HIV-1 in vitro. *J Med Virol.* 2008 Mar;80(3):494-500. doi: 10.1002/jmv.21089. PMID: 18205225; PMCID: PMC2769251.
11. **Treviño A, Aguilera A, Caballero E, Toro C, Eiros JM, Ortiz de Lejarazu R, Rodríguez-Calviño JJ, Tuset C, Gómez-Hernando C, Rodríguez-Iglesias M, Ramos JM, Rodríguez-Díaz JC, Benito R, Trigo M, García-Campello M, Calderón E, Garcia J, Rodríguez C, Soriano V.** Seroprevalence of HTLV-1/2 infection among native and immigrant pregnant women in Spain. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2009 Jun;25(6):551-4. doi: 10.1089/aid.2008.0268. PMID: 19544594.
12. **Hoarau G, Gaüzère BA, Renard H, Aubry P.** HTLV-1 infection in Reunion. *Med Mal Infect.* 2017 Sep;47(5):349-351. doi: 10.1016/j.medmal.2017.05.004. Epub 2017 Jun 23. PMID: 28651832.
13. **Campos KR, Gonçalves MG, Costa NA, Caterino-de-Araujo A.** Comparative performances of serologic and molecular assays for detecting human T lymphotropic virus type 1 and type 2 (HTLV-1 and HTLV-2) in patients infected

with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *Braz J Infect Dis.* 2017 May- Jun;21(3):297-305. doi: 10.1016/j.bjid.2017.02.005. Epub 2017 Mar 24. PMID: 28343818.

14. **Fuzii HT, da Silva Dias GA, de Barros RJ, Falcão LF, Quaresma JA.** Immunopathogenesis of HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). *Life Sci.* 2014 May 28;104(1-2):9-14. doi: 10.1016/j.lfs.2014.03.025. Epub 2014 Apr 3. PMID: 24704970.
15. **Malm K, Kjerstadius T, Andersson S.** Evaluation of a new screening assay for HTLV-1 and -2 antibodies for large-scale use. *J Med Virol.* 2010 Sep;82(9):1606-11. doi: 10.1002/jmv.21867. PMID: 20648617.
16. **Araújo AQ, Leite AC, Lima MA, Silva MT.** HTLV-1 and neurological conditions: when to suspect and when to order a diagnostic test for HTLV-1 infection? *Arq Neuropsiquiatr.* 2009 Mar;67(1):132-8. doi: 10.1590/s0004-282x2009000100036. PMID: 19330234.
17. **Honarbaksh S, Taylor GP.** High prevalence of bronchiectasis is linked to HTLV-1-associated inflammatory disease. *BMC Infect Dis.* 2015 Jul 6;15:258. doi: 10.1186/s12879-015-1002-0. PMID: 26143070; PMCID: PMC4491414.

Simboli utilizzati

-  = Dispositivo medico diagnostico in vitro
-  = Numero di catalogo
-  = Numero del lotto
-  = Fabbicante
-  = Data di scadenza
-  = Temperatura di conservazione
-  = Istruzioni d'uso