



Alcuni dei diversi antigeni elencati in questa tabella derivano dallo stesso precursore proteico e potrebbero avere epitopi sovrapposti. Ciò va tenuto in considerazione nell'interpretazione del profilo, ad esempio:

1. È improbabile individuare gp41 in assenza di gp160, in quanto gp160 è la forma polimerica di gp41 e la concentrazione di gp160 è maggiore di quella di gp41 sull'HIV BLOT 2.2 di MP Diagnostics. Il gp41 appare come banda diffusa. Un'eventuale banda evidente non marcata nella regione gp41 non dovrà essere interpretata come banda gp41. Numerosi campioni non infettati da HIV e campioni sani sono risultati reattivi a questo antigene non HIV la cui origine va ricercata verosimilmente nella linea cellulare umana utilizzata per la crescita del virus HIV.

2. La banda p55 è il precursore della p24 e p17. La banda p55 viene generalmente rilevata in presenza di una forte reattività a p24 e/o p17 e appare normalmente come una banda sottile appena sopra la banda p51. Talvolta queste due bande sono indistinguibili e possono apparire come un'unica banda. Le bande osservate come p42 e p39 sono entrambe frammenti di GAG e non vanno interpretate come gp41 (ENV).

3. La proteina p24 è abbondante nella striscia dell'HIV Blot 2.2. Per la sieroconversione dei campioni, è noto che l'anti-p24 è il primo ad apparire nelle analisi di Western Blot. L'aspetto della striscia p24 nei pazienti affetti da HIV soddisferebbe i criteri di interpretazione positiva per la proteina GAG da parte dell'OMS, di CDC e altri criteri internazionali.

4. Le bande POL p66, p51 e p31 vengono in genere rilevate contemporaneamente. Tuttavia, la sensibilità di p66 e p31 è maggiore di quella di p51.

5. La reattività crociata ad HIV-2 è variabile, ma solitamente si manifesta con gli antigeni GAG e/o POL. Tuttavia, in alcuni casi può verificarsi reattività crociata con la banda gp160, ma raramente con gp41.

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

Il procedimento di interpretazione comporta quanto segue:

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

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

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

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

15. Constantine, N. T. and H. Zink. 2005. HIV testing technologies after two decades of evolution. Indian J Med Res. 121:519-538.

16. World Health Organization. 2004. Guidelines for HIV Diagnosis and monitoring of antiretroviral therapy. Regional Office for South-East Asia, New Delhi, India.

17. Ming Guan, Frequency, causes and new challenges of indeterminate results in Western Blot Confirmatory Testing for Antibodies to Human Immunodeficiency Virus. Clinical and Vaccine Immunology, June 2007, Vol.14, No.6, p649-659.

**MP Biomedicals Asia Pacific Pte Ltd.**  
2 Pioneer Place  
Singapore 627885  
N. tel. : + 65 6775 0008  
N. fax : + 65 6774 6146  
E-mail : enquiry\_ap@mpbio.com

**MP Biomedicals Germany GmbH**  
Thüringer Straße 15  
37269 Eschwege  
Germania  
N. tel. : +49 5651 921 204  
N. fax : +49 5651 921 181  
E-mail : diagnostics@mpbio.com

Sedi regionali:

**MP Biomedicals Germany GmbH**  
Thüringer Straße 15  
37269 Eschwege  
Germania  
N. tel. : +49 5651 921 204  
N. fax : +49 5651 921 181  
E-mail : diagnostics@mpbio.com

\* Brevetto degli Stati Uniti 5.721.095

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

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

PROFILO	INTERPRETAZIONE
Assenza di specifiche bande virali	NEGATIVO
Determinazione di anticorpi p17 <b>SOLTANTO</b> , nessun'altra banda	NEGATIVO
Determinazione di 2 ENV (gp160/gp41 e gp120) e GAG (p17, p24, p55) o POL (p31, p51, p66)	POSITIVO ALL'HIV-1
Determinazione di 2 ENV (gp160/gp41 e gp120) e GAG (p17, p24, p55) o POL (p31, p51, p66) e banda HIV-2-specifica visibile	POSITIVO ALL'HIV-1 con INDICAZIONE DI HIV-2
Presenza di una delle bande virali specifiche, ma il profilo non ha i requisiti di POSITIVO	INDETERMINATO <sup>2</sup>
Presenza di una delle bande virali specifiche, ma il profilo non ha i requisiti per essere POSITIVO. Banda HIV-2-specifica visibile.	INDETERMINATO <sup>2</sup> con INDICAZIONE DI HIV-2

#### <sup>2</sup>CRITERI PER INTERPRETARE IL TEST COME INDETERMINATO

Un test INDETERMINATO non può essere considerato determinante per una diagnosi di infezione da HIV-1. Poiché la maggior parte dei soggetti con un risultato inizialmente INDETERMINATO sviluppano anticorpi anti-HIV entro 1 mese, se sono stati infettati dall'HIV-1, il CDC degli USA (2001)

raccomanda che questi soggetti ripetano il test per l'infezione da HIV-1 dopo ≤ 1 mese. I soggetti che continuano a presentare un test INDETERMINATO dopo 1 mese presentano una scarsa probabilità di essere stati infettati dall'HIV, a meno che non si sospetti un'esposizione recente all'HIV.

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

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

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

#### LIMITI DELLA PROCEDURA

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

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

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

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

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

#### CARATTERISTICHE SPECIFICHE DI ESECUZIONE

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

Tabella 1 : Studio sulla sensibilità basato sul livello di reattività degli antigeni virali HIV-1 con campioni sieropositivi di HIV-1. (Campioni testati = 201)

PROFILO SIEROLOGICO	HIV BLOT 2.2	DUPONT/ORTHO HIV-1 WB
GAG, POL ed ENV	97,5%	95,4%
p24, p31, gp41 e/o gp120/gp160	94,9%	90,9%
ENV e GAG o POL	100,0%	100,0%

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

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

\*Tutti apparsi soltanto come banda p24 o p17.

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

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

<sup>2</sup> I sieri sono stati definiti positivi in base ai risultati ottenuti con il New LAV Blot 2 della Pasteur.

I dati sono stati forniti dal Dott. Oliviero E. Varnier e dalla Dr.ssa Flavia Lillo, del Laboratorio per lo Studio dei Retrovirus Umani, Università di Genova.

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

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

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

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

#### ESCLUSIONE DI GARANZIA E GARANZIA LIMITATA ESPRESSA

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

## TAVOLA DI INDIVIDUAZIONE GUASTI

