Rx Only

cobas® HIV-1

Test quantitativo degli acidi nucleici per l'uso sui cobas® 5800/6800/8800 Systems

Per uso diagnostico *in vitro*

cobas® HIV-1	P/N: 09040803190
cobas® HBV/HCV/HIV-1 Control Kit	P/N: 09040773190
cobas® NHP Negative Control Kit	P/N: 09051554190

Indice generale

Uso previsto **5**

Riassunto e spiegazione del test **5**

Reagenti e materiali **8**

Reagenti e controlli **cobas**® HIV-1 8

Reagenti **cobas omni** per la preparazione dei campioni 11

cobas® Specimen Pre-Extraction Reagent 12

Requisiti per la conservazione dei reagenti 13

Altri materiali necessari per il **cobas**® 5800 System 15

Altri materiali necessari per i **cobas**® 6800/8800 Systems 15

Strumentazione e software necessari 16

Precauzioni e requisiti per l'uso **17**

Avvertimenti e precauzioni 17

Manipolazione dei reagenti 18

Buone pratiche di laboratorio 18

Raccolta, trasporto e conservazione dei campioni di plasma **19**

Campioni di plasma EDTA 19

Campioni PSC 20

Istruzioni per l'uso **22**

Note sulla procedura 22

Preparazione dei campioni PSC e procedura pre-analitica 22

Esecuzione del test **cobas**® HIV-1 sul **cobas**® 5800 System 27

Esecuzione del test **cobas**® HIV-1 sui **cobas**® 6800/8800 Systems 29

Risultati **30**

Controllo di qualità e validità dei risultati sul **cobas**® 5800 System 30

Risultati dei controlli sul **cobas**® 5800 System 30

Controllo di qualità e validità dei risultati sui **cobas**® 6800/8800 Systems 30

Avvisi dei controlli sui **cobas**® 6800/8800 Systems 31

Interpretazione dei risultati 31

Interpretazione dei risultati sul **cobas**® 5800 System 32

Interpretazione dei risultati sul **cobas**® 6800/8800 Systems 32

Limiti della procedura 33

Valutazione delle prestazioni non cliniche **34**

Caratteristiche chiave delle prestazioni con i campioni di plasma EDTA sui **cobas**® 6800/8800 Systems 34

Limite di sensibilità (LoD) 34

Intervallo lineare 35

Precisione intra-laboratorio 37

Verifica del sottotipo 38

Specificità 40

Specificità analitica 40

Specificità analitica e sostanze interferenti 40

Metodo di correlazione - confronto delle prestazioni con il test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 v2.0 42

Tasso globale d'errore del sistema 42

Contaminazione crociata 43

Caratteristiche delle prestazioni con i campioni PSC 43

Limite di sensibilità (LoD) per i campioni PSC 43

Intervallo lineare con i campioni PSC 45

Verifica del sottotipo con i campioni PSC 46

Specificità con i campioni PSC 46

Tasso globale d'errore del sistema con i campioni PSC 47

Prestazioni dei campioni PSC rispetto ai campioni di plasma 47

Valutazione delle prestazioni cliniche **48**

Riproducibilità 48

Validazione della quantificazione della carica virale 49

Valutazione clinica 52

Conclusioni 54

Equivalenza dei sistemi / confronto tra sistemi 54

Informazioni supplementari **55**

Caratteristiche del test con i campioni di plasma EDTA 55

Caratteristiche del test con i campioni PSC 55

Simboli 56

Assistenza tecnica 57

Produttore e importatore 57

Marchi e brevetti 57

Copyright 57

Bibliografia 58

Revisione del documento 60

Uso previsto

Il test **cobas**® HIV-1 è un test di amplificazione degli acidi nucleici *in vitro* che consente di quantificare il virus dell'immunodeficienza umana di tipo 1 (HIV-1) in un campione di plasma EDTA o in uno spot di plasma essiccato (**cobas**® Plasma Separation Card, PSC) ottenuto da soggetti infetti da HIV-1.

Il test è destinato all'uso in associazione con la presentazione clinica e con altri marker di laboratorio per la gestione clinica dei pazienti con infezione da HIV-1. Questo test può essere utilizzato per confermare l'infezione da HIV-1 in soggetti reattivi agli anticorpi e per valutare la prognosi dei pazienti misurando il livello basale dell'HIV-1, oppure per monitorare gli effetti della terapia antiretrovirale tramite la misurazione delle variazioni dei livelli di RNA di HIV-1 durante il trattamento con i farmaci antiretrovirali.

Riassunto e spiegazione del test

Premessa

Il virus dell'immunodeficienza umana (HIV) è l'agente eziologico della sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS). Dopo la sieroconversione, i soggetti infetti entrano in genere in una fase relativamente asintomatica e clinicamente stabile che può protrarsi per anni. Il periodo asintomatico è caratterizzato da una viremia plasmatica persistente in corrispondenza dei setpoint determinati dalla genetica dell'ospite, nonché da una graduale deplezione dei linfociti T CD4+. Sebbene nella fase asintomatica dell'infezione le concentrazioni virali nel sangue periferico siano relativamente basse, la replica e la clearance virali sembrano essere processi dinamici, in cui l'elevata velocità di riproduzione virale e di infezione dei linfociti CD4+ è bilanciata dall'elevata velocità di clearance virale, morte dei linfociti infetti e rigenerazione dei linfociti CD4+, con la conseguenza che tanto i livelli di viremia plasmatica, tanto i livelli dei linfociti CD4+ si mantengono relativamente stabili per circa 8 anni in un soggetto medio che convive con l'HIV.

Le determinazioni quantitative della viremia da HIV nel plasma indicano che l'aumento dei livelli di concentrazione virale è correlato all'aumento del rischio di progressione clinica della malattia causata dall'HIV.[1, 2] Inoltre quasi venti anni di ricerche cliniche dimostrano che, riducendo i livelli di concentrazione virale nel plasma con una terapia antiretrovirale (ART), si ottiene una riduzione significativa dei rischi di progressione clinica della malattia, tra i quali morte, sviluppo dell'AIDS, infezioni opportunistiche e morbilità associata con l'HIV.[3] La carica virale dell'HIV è inoltre predittiva del rischio di trasmissione dell'HIV e, come dimostrano studi clinici controllati randomizzati, iniziando tempestivamente la terapia ART con soppressione della carica virale si riduce il rischio di trasmissione dell'HIV del 96%.[4]

Perché utilizzare i test dell'HIV-1

Attualmente sono disponibili numerosi farmaci antiretrovirali che agiscono sulla proteasi, sull'integrasi, sull'envelope e sulla trascrittasi inversa del virus. Analizzando i genotipi di virus di diversi cladi, è stata dimostrata l'esistenza di variazioni nucleotidiche normalmente presenti in natura e indotte dai farmaci, polimorfismi e mutazioni secondarie che interessano le regioni della trascrittasi inversa, dell'integrasi e della proteasi relative al gene pol HIV-1. I test di resistenza sono diventati un importante strumento diagnostico per la gestione delle infezioni da HIV-1 e vengono applicati non appena la carica virale di un paziente raggiunge un livello rilevabile dai saggi di sequenziamento. È dimostrato che il monitoraggio della carica virale riduce il rischio di resistenza ai farmaci, mentre la carica virale è clinicamente considerata un indicatore sentinella della replicazione virale attiva, un fenomeno che annuncia l'evoluzione virale nei pazienti in terapia.[5, 6] Molte linee guida nazionali e internazionali raccomandano pertanto di monitorare la carica virale dell'HIV-1.[3, 7-9]

Per svariati anni, le linee guida hanno indicato come obiettivo prioritario della terapia la soppressione della carica virale dell'HIV-1 fino a livelli inferiori al limite di sensibilità di un test (ad esempio, 50 copie/ml). Nelle linee guida emanate nel 2011 dagli Stati Uniti si è iniziato ad affermare, per la prima volta, il concetto secondo il quale una carica virale fino a 200 copie/ml nei pazienti sotto ART non è indicativa di un fallimento della terapia. Infatti alcuni pazienti possono raggiungere un livello di viremia basso senza che ciò implichi un breakthrough virologico.[3] In Europa le linee guida continuano a considerare necessaria la soppressione della carica virale sotto a 50 copie/ml.[7] Le differenze nei valori minimi rilevati dai test della carica virale potrebbero quindi determinare importanti differenze nell'interpretazione clinica dei risultati della carica virale durante il monitoraggio della risposta alla terapia,[10, 11] in quanto lo scopo della terapia è la soppressione del virus fino a un livello al di sotto del quale la resistenza al farmaco dovrebbe emergere con minore probabilità (un livello non ancora del tutto definito).[12] Nel luglio del 2013 anche l'OMS ha iniziato a consigliare l'uso dei test della carica virale in ambienti in cui le risorse sono limitate, fissando a 1000 copie/ml la soglia di "fallimento virologico", cioè la soglia oltre la quale è necessario rivedere le decisioni terapeutiche. Anche l'OMS raccomanda ora l'uso di campioni su spot essiccati per poter estendere l'uso dei test della carica virale anche negli ambienti in cui le risorse sono limitate, o non c'è accesso immediato ai servizi di flebotomia o non ci sono infrastrutture adeguate per consentire il trasporto dei campioni di plasma EDTA.[8] L'uso di uno spot di plasma essiccato su cartoncino PSC, che stabilizza l'RNA di HIV nel plasma essiccato, può contribuire a diffondere i test della carica virale anche negli ambienti più difficili, consentendo il trasporto dei campioni su distanze più lunghe e in condizioni ambientali più dure rispetto al plasma EDTA.

Oltre a monitorare la risposta alla terapia, le linee guida raccomandano l'uso della valutazione della carica virale per stabilire se un paziente con una conta dei CD4+ > 500 cellule/mm^3 (carica virale > 100.000 copie/ml) debba sottoporsi a una terapia ART e anche per assicurare che il sequenziamento della farmaco-resistenza abbia successo nei pazienti idonei (pazienti con carica virale > 1.000 copie/ml o con risposta subottimale della carica virale alla terapia ART). L'uso della valutazione della carica virale dovrebbe essere adottato nella fase prenatale, per stabilire se sia o meno necessario programmare un parto cesareo in modo da prevenire la trasmissione dell'infezione da HIV da madre a figlio (donne in gravidanza con carica virale > 1000 copie/ml).

Spiegazione del test

cobas® HIV-1 è un test quantitativo eseguito su **cobas**® 5800 System, **cobas**® 6800 System o **cobas**® 8800 System. Il test **cobas**® HIV-1 consente di rilevare e quantificare l'RNA di HIV-1 nel plasma EDTA o negli spot di plasma essiccato su cartoncino PSC ottenuti da pazienti infetti. Vengono utilizzate due sonde per quantificare, ma non per discriminare, il gruppo M dell'HIV-1 con i relativi sottotipi, il gruppo O e il gruppo N dell'HIV-1. La carica virale viene quantificata rispetto ad uno standard di quantificazione costituito da Armored RNA non HIV-1 (RNA-QS), con il quale i campioni vengono arricchiti in fase di preparazione. L'RNA-QS svolge un ruolo di controllo interno, per monitorare l'intero processo di preparazione dei campioni e di amplificazione PCR. Il test utilizza inoltre tre controlli esterni: un titolo positivo alto, un titolo positivo basso e un controllo negativo. I controlli esterni positivo alto e positivo basso vengono prodotti mediante diluizione da materiale stock con un titolo tracciabile rispetto allo Standard Internazionale dell'OMS per l'HIV-1. Ogni lotto del kit di amplificazione/rilevazione è calibrato in modo tracciabile rispetto allo standard internazionale dell'OMS per l'HIV-1.

Principi della procedura

Il test **cobas**® HIV-1 si basa su una procedura completamente automatizzata per la preparazione dei campioni (estrazione e purificazione degli acidi nucleici), seguita da amplificazione e rilevazione mediante PCR. Il **cobas**® 5800 System è progettato come strumento unico integrato. I **cobas**® 6800/8800 Systems sono costituiti dal modulo di inserimento dei campioni, dal modulo di trasferimento, dal modulo di preparazione e dal modulo analitico. La gestione automatica dei dati è svolta dal software del **cobas**® 5800 System o dei **cobas**® 6800/8800 Systems, che assegna i seguenti risultati dei test: "Target not detected" (Target non rilevato), "< LLoQ" (minore del limite inferiore di quantificazione), "> ULoQ" (maggiore del limite superiore di quantificazione) o "HIV-1 RNA detected" (RNA di HIV-1 rilevato), un valore compreso nell'intervallo lineare LLoQ < x < ULoQ. I risultati possono essere visualizzati direttamente sullo schermo del sistema, esportati o stampati in un report.

Gli acidi nucleici dei campioni dei pazienti, dei controlli esterni e delle molecole di Armored RNA (RNA-QS) vengono estratti simultaneamente. In sintesi, l'acido nucleico virale viene liberato aggiungendo nel campione la proteinasi e il reagente di lisi. L'acido nucleico liberato si lega quindi alla superficie di silice delle biglie di vetro magnetiche aggiunte. Le sostanze che non formano legami e le impurità (ad esempio le proteine denaturate, i detriti cellulari e i potenziali inibitori della PCR) vengono rimosse con il reagente di lavaggio nei passaggi successivi e l'acido nucleico purificato viene eluito dalle biglie di vetro magnetiche con il tampone di eluizione a temperature elevate.

È possibile ottenere l'amplificazione selettiva dell'acido nucleico target estratto dal campione utilizzando dei primer forward e reverse virus-specifici, che vengono selezionati da regioni altamente conservate del genoma dell'HIV-1. Il gene gag dell'HIV-1 e la regione LTR dell'HIV-1 (doppio target) vengono amplificati dal test **cobas**® HIV-1. È possibile ottenere l'amplificazione selettiva dello standard di quantificazione RNA-QS utilizzando dei primer forward e reverse sequenza-specifici, che vengono selezionati in modo tale da non presentare nessuna omologia con il genoma dell'HIV-1. Un enzima DNA polimerasi termostabile viene utilizzato sia per la trascrizione inversa che per l'amplificazione PCR. Le sequenze del target virale e dello standard RNA-QS vengono amplificate simultaneamente, utilizzando un profilo di amplificazione PCR universale con valori predefiniti per temperatura e numero di cicli. La soluzione Master Mix contiene trifosfato di deossiuridina (dUTP) anziché trifosfato di deossitimidina (dTTP), che è incorporato nel DNA appena sintetizzato (amplicone).[13-15] Tutti gli ampliconi contaminanti che sono stati prodotti da sessioni di PCR precedenti vengono eliminati durante il primo passaggio del ciclo termico dall'enzima AmpErase, contenuto nella Master Mix per PCR. Gli ampliconi che si sono appena formati non vengono invece eliminati perché l'enzima AmpErase si inattiva dopo l'esposizione a temperature superiori a 55°C.

La soluzione Master Mix **cobas**® HIV-1 contiene due sonde di rilevazione specifiche per le sequenze target di HIV-1 e una sonda specifica per lo standard RNA-QS. Le sonde sono marcate con fluorocromi reporter specifici per i target, in modo da consentire la rilevazione simultanea del target HIV-1 e del RNA-QS in due diversi canali.[16, 17] Quando non è legato alla sequenza target, il segnale fluorescente delle sonde intatte viene soppresso dal fluorocromo quencher. Nella fase di amplificazione mediante PCR, l'ibridizzazione delle sonde con lo stampo specifico di DNA a filamento unico determina la scissione della sonda ad opera dell'attività esonucleasica 5'→3' della DNA polimerasi, con la conseguente separazione dei fluorocromi reporter e quencher e la produzione di un segnale fluorescente. Ad ogni ciclo di PCR vengono generate quantità crescenti di sonde scisse e, in concomitanza, il segnale cumulativo del fluorocromo reporter aumenta. È possibile ottenere la rilevazione real-time e la discriminazione dei prodotti della PCR misurando la fluorescenza dei fluorocromi reporter liberati, che rappresentano rispettivamente il target virale e il target RNA-QS.

Reagenti e materiali

Reagenti e controlli cobas® HIV-1

Tutti i reagenti e i controlli non ancora aperti devono essere conservati rispettando le condizioni indicate dalla Tabella 1 alla Tabella 5.

Tabella 1 cobas® HIV-1

cobas® HIV-1 Conservare a 2-8°C Cassetta per 192 test (P/N 09040803190)		
Componenti del kit	**Ingredienti dei reagenti**	**Quantità per kit 192 test**
Soluzione proteinasi (PASE)	Tampone Tris, < 0,05% EDTA, cloruro di calcio, acetato di calcio, 8% proteinasi (p/v) EUH210: Scheda dati di sicurezza disponibile su richiesta. EUH208: Contiene subtilisina. Può provocare una reazione allergica.	22,3 ml
Standard di quantificazione RNA (RNA-QS)	Tampone Tris, < 0,05% EDTA, < 0,001% Costrutto di Armored RNA non correlato ad HIV contenente regioni di sequenze di legame specifiche per primer e sonda (RNA non infettivo in batteriofago MS2), < 0,1% sodio azide	21,2 ml
Tampone di eluizione (EB)	Tampone Tris, 0,2% metil-4 idrossibenzoato	21,2 ml
Master Mix Reagente 1 (MMX-R1)	Acetato di manganese, idrossido di potassio, < 0,1% sodio azide	7,5 ml
Master Mix HIV-1 Reagente 2 (HIV-1 MMX-R2)	Tampone tricina, acetato di potassio, 18% dimetilsolfossido, glicerolo, < 0,1% Tween 20, EDTA, < 0,12% dATP, dCTP, dGTP, dUTP, < 0,01% primer upstream e downstream HIV, < 0,01% primer forward e reverse QS, < 0,01% sonde oligonucleotidiche fluorescenti specifiche per HIV e QS di HIV, < 0,01% aptamero oligonucleotidico, < 0,1% DNA polimerasi Z05D, < 0,10% enzima AmpErase (uracil-N-glicosilasi) (batterico), < 0,1% sodio azide	9,7 ml

Tabella 2 **cobas**® HBV/HCV/HIV-1 Control Kit

cobas® HBV/HCV/HIV-1 Control Kit Conservare a 2-8°C (P/N 09040773190)			
Componenti del kit	**Ingredienti dei reagenti**	**Quantità per kit**	**Simbolo di sicurezza e avvertimento***
Controllo positivo basso HBV/HCV/HIV-1 (HBV/HCV/HIV-1 L(+)C)	< 0,001% RNA di HIV-1 gruppo M incapsulato in proteina di rivestimento del batteriofago MS2, < 0,001% DNA sintetico (plasmide) di HBV incapsulato in proteina di rivestimento del batteriofago Lambda, < 0,001% RNA sintetico (Armored) di HCV incapsulato in proteina di rivestimento del batteriofago MS2, plasma umano normale, non reattivo in base ai test brevettati per gli anticorpi anti-HCV, anti-HIV-1/2, HBsAg, anti-HBc; RNA di HIV-1, RNA di HIV-2, RNA di HCV e DNA di HBV non rilevabili con i metodi PCR 0,1% conservante ProClin® 300**	5,2 ml (8 × 0,65 ml)	 **ATTENZIONE** H317: Può provocare una reazione allergica cutanea. H412: Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata. P261: Evitare di respirare la polvere/i fumi/i gas/ la nebbia/i vapori/gli aerosol. P273: Non disperdere nell'ambiente. P280: Indossare guanti protettivi. P333 + P313: In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico. P362 + P364: Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente. P501: Smaltire il prodotto/recipiente in un impianto d'eliminazione dei rifiuti autorizzato. 55965-84-9 Massa di reazione di: 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-one [N. CE 247-500-7] e 2-metil-2H-isotiazol-3-one [N. CE 220-239-6] (3:1).
Controllo positivo alto HBV/HCV/HIV-1 (HBV/HCV/HIV-1 H(+)C)	< 0,001% RNA sintetico (Armored), ad alto titolo, di HIV-1 gruppo M incapsulato in proteina di rivestimento del batteriofago MS2, < 0,001% DNA sintetico (plasmide) di HBV incapsulato in proteina di rivestimento del batteriofago Lambda, < 0,001% RNA sintetico (Armored) di HCV incapsulato in proteina di rivestimento del batteriofago MS2, plasma umano normale, non reattivo in base ai test brevettati per gli anticorpi anti-HCV, anti-HIV-1/2, HBsAg, anti-HBc; RNA di HIV-1, RNA di HIV-2, RNA di HCV e DNA di HBV non rilevabili con i metodi PCR 0,1% conservante ProClin® 300**	5,2 ml (8 × 0,65 ml)	 **ATTENZIONE** H317: Può provocare una reazione allergica cutanea. P261: Evitare di respirare la polvere/i fumi/i gas/ la nebbia/i vapori/gli aerosol. P272: Gli indumenti da lavoro contaminati non devono essere portati fuori dal luogo di lavoro. P280: Indossare guanti protettivi. P333 + P313: In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico. P362 + P364: Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente. P501: Smaltire il prodotto/recipiente in un impianto d'eliminazione dei rifiuti autorizzato. 55965-84-9 Massa di reazione di: 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-one [N. CE 247-500-7] e 2-metil-2H-isotiazol-3-one [N. CE 220-239-6] (3:1).

* L'etichettatura per la sicurezza dei prodotti è conforme principalmente alle indicazioni GHS dell'Unione Europea.

** Sostanza pericolosa.

Tabella 3 **cobas**® NHP Negative Control Kit

cobas® NHP Negative Control Kit Conservare a 2-8°C (P/N 09051554190)			
Componenti del kit	**Ingredienti dei reagenti**	**Quantità per kit**	**Simbolo di sicurezza e avvertimento***
Controllo negativo di plasma umano normale (NHP-NC)	Plasma umano normale, non reattivo ai test brevettati per gli anticorpi anti-HCV, anti-HIV-1/2, anti-HBc e antigene HBsAg; RNA di HIV-1, RNA di HIV-2, RNA di HCV e DNA di HBV non rilevabili con i metodi PCR < 0,1% conservante ProClin® 300**	16 ml (16 × 1 ml)	 **ATTENZIONE** H317: Può provocare una reazione allergica cutanea. P261: Evitare di respirare la polvere/i fumi/i gas/ la nebbia/i vapori/gli aerosol. P272: Gli indumenti da lavoro contaminati non devono essere portati fuori dal luogo di lavoro. P280: Indossare guanti protettivi. P333 + P313: In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico. P362 + P364: Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente. P501: Smaltire il prodotto/recipiente in un impianto d'eliminazione dei rifiuti autorizzato. 55965-84-9 Massa di reazione di: 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-one [N. CE 247-500-7] e 2-metil-2H-isotiazol-3-one [N. CE 220-239-6] (3:1).

* L'etichettatura per la sicurezza dei prodotti è conforme principalmente alle indicazioni GHS dell'Unione Europea.

** Sostanza pericolosa.

Reagenti cobas omni per la preparazione dei campioni

Tabella 4 Reagenti **cobas omni** per la preparazione dei campioni*

Reagenti	Ingredienti dei reagenti	Quantità per kit	Simbolo di sicurezza e avvertimento**
cobas omni MGP Reagent (MGP) Conservare a 2-8°C (P/N 06997546190)	Biglie di vetro magnetiche, tampone Tris, 0,1% metil-4 idrossibenzoato, < 0,1% sodio azide	480 test	Non applicabile
cobas omni Specimen Diluent (SPEC DIL) Conservare a 2-8°C (P/N 06997511190)	Tampone Tris, 0,1% metil-4 idrossibenzoato, < 0,1% sodio azide	4 × 875 ml	Non applicabile
cobas omni Lysis Reagent (LYS) Conservare a 2-8°C (P/N 06997538190)	43% (p/p) guanidina tiocianato***, 5% (p/v) polidocanolo***, 2% (p/v) ditiotreitolo, citrato di sodio diidrato	4 × 875 ml	 **PERICOLO** H302 + H332: Nocivo se ingerito o inalato. H314: Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari. H412: Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata. EUH032: A contatto con acidi libera gas molto tossici. P261: Evitare di respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol. P273: Non disperdere nell'ambiente. P280: Indossare guanti/indumenti protettivi/proteggere gli occhi/il viso. P303 + P361 + P353: IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE (o con i capelli): togliere immediatamente tutti gli indumenti contaminati. Sciacquare la pelle. P304 + P340 + P310: IN CASO DI INALAZIONE: trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione. Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI/un medico. P305 + P351 + P338 + P310: 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. Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI/un medico. 593-84-0 Guanidina tiocianato 9002-92-0 Polidocanolo 3483-12-3 (R*,R*)-1,4-dimercapto-2,3-butandiolo
cobas omni Wash Reagent (WASH) Conservare a 15-30°C (P/N 06997503190)	Citrato di sodio diidrato, 0,1% metil-4 idrossibenzoato	4,2 l	Non applicabile

* Questi reagenti non sono inclusi nel kit del test **cobas**® HIV-1. Consultare l'elenco dei materiali aggiuntivi necessari (Tabella 11).

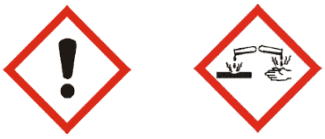
** L'etichettatura per la sicurezza dei prodotti è conforme principalmente alle indicazioni GHS dell'Unione Europea.

*** Sostanza pericolosa.

cobas® Specimen Pre-Extraction Reagent

Nota: questo reagente è opzionale e deve essere utilizzato solo insieme al cartoncino PSC per generare gli spot di plasma essiccato. Vedere il documento PSC Method Sheet ms_07963084190.

Tabella 5 **cobas**® Specimen Pre-Extraction Reagent

cobas® Specimen Pre-Extraction Reagent Conservare a 2-8°C (P/N 08064695190)			
Reagente	**Ingredienti dei reagenti**	**Quantità per kit**	**Simbolo di sicurezza e avvertimento***
cobas® Specimen Pre-Extraction Reagent (SPER)	28% (p/p) guanidina tiocianato**, 6% (p/v) polidocanolo**, 1% (p/v) ditiotreitolo, citrato di sodio diidrato	600 ml (15 × 40 ml)	 **PERICOLO** H302: Nocivo per ingestione. H314: Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari. H412: Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata. EUH032: A contatto con acidi libera gas molto tossici. P273: Non disperdere nell'ambiente. P280: Indossare guanti/indumenti protettivi/proteggere gli occhi/il viso. P301 + P330 + P331: IN CASO DI INGESTIONE: Sciacquare la bocca. NON provocare il vomito. P303 + P361 + P353: IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE (o con i capelli): togliere immediatamente tutti gli indumenti contaminati. Sciacquare la pelle. P304 + P340 + P310: IN CASO DI INALAZIONE: trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione. Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI/ un medico. P305 + P351 + P338 + P310: 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. Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI/un medico. 593-84-0 Guanidina tiocianato 9002-92-0 Polidocanolo

* L'etichettatura per la sicurezza dei prodotti è conforme principalmente alle indicazioni GHS dell'Unione Europea.

** Sostanza pericolosa.

Requisiti per la conservazione dei reagenti

I reagenti devono essere conservati e manipolati rispettando le condizioni indicate dalla Tabella 6, Tabella 7 alla Tabella 8. Il reagente **cobas**® Specimen Pre-Extraction Reagent, utilizzato nel flusso di lavoro degli spot di plasma essiccato su cartoncino PSC, deve essere conservato e manipolato rispettando le condizioni indicate nella Tabella 9. I requisiti per la conservazione e la manipolazione dei campioni PSC sono specificati nel documento **PSC Method Sheet ms_07963084190**.

I reagenti che non sono ancora stati caricati sul **cobas**® 5800 System o sui **cobas**® 6800/8800 Systems devono essere conservati alla temperatura indicata nella Tabella 6.

Tabella 6 Conservazione dei reagenti (non ancora caricati sul sistema)

Reagente	Temperatura di conservazione
cobas® HIV-1	2-8°C
cobas® HBV/HCV/HIV-1 Control Kit	2-8°C
cobas® NHP Negative Control Kit	2-8°C
cobas omni Lysis Reagent	2-8°C
cobas omni MGP Reagent	2-8°C
cobas omni Specimen Diluent	2-8°C
cobas omni Wash Reagent	15-30°C

Requisiti per la manipolazione dei reagenti per il cobas® 5800 System

Dopo il caricamento sul **cobas**® 5800 System, i reagenti sono conservati alla temperatura appropriata e la loro data di scadenza viene monitorata dal sistema. Il sistema consente l'utilizzo dei reagenti soltanto se sono rispettate tutte le condizioni descritte nella Tabella 7. Il sistema impedisce automaticamente l'uso dei reagenti scaduti. Nella Tabella 7 vengono fornite all'utente informazioni utili sulle condizioni di manipolazione dei reagenti previste per il **cobas**® 5800 System.

Tabella 7 Scadenza dei reagenti sul **cobas**® 5800 System

Reagente	Data di scadenza del kit	Stabilità del kit aperto	Numero di sedute per cui il kit può essere usato	Stabilità a bordo
cobas® HIV-1	Data non superata	90 giorni dal primo uso	Max 40 sedute	Max 36 giorni*
cobas® HBV/HCV/HIV-1 Control Kit	Data non superata	Non applicabile[a]	Non applicabile	Max 36 giorni*
cobas® NHP Negative Control Kit	Data non superata	Non applicabile[a]	Non applicabile	Max 36 giorni*
cobas omni Lysis Reagent	Data non superata	30 giorni dal caricamento*	Non applicabile	Non applicabile
cobas omni MGP Reagent	Data non superata	30 giorni dal caricamento*	Non applicabile	Non applicabile
cobas omni Specimen Diluent	Data non superata	30 giorni dal caricamento*	Non applicabile	Non applicabile
cobas omni Wash Reagent	Data non superata	30 giorni dal caricamento*	Non applicabile	Non applicabile

[a] Reagente monouso.

* Il calcolo inizia dalla prima volta che il reagente viene caricato sul **cobas**® 5800 System.

Requisiti per la manipolazione dei reagenti per i cobas® 6800/8800 Systems

Dopo il caricamento sui **cobas**® 6800/8800 Systems, i reagenti sono conservati alla temperatura appropriata e la loro data di scadenza viene monitorata dal sistema. I **cobas**® 6800/8800 Systems consentono l'uso dei reagenti solo se sono rispettate tutte le condizioni descritte nella Tabella 8. Il sistema impedisce automaticamente l'uso dei reagenti scaduti. La Tabella 8 fornisce all'utente informazioni utili sulle condizioni di manipolazione dei reagenti previste per i **cobas**® 6800/8800 Systems.

Tabella 8 Scadenza dei reagenti sui **cobas**® 6800/8800 Systems

Reagente	Data di scadenza del kit	Stabilità del kit aperto	Numero di sedute per cui il kit può essere usato	Stabilità a bordo (tempo cumulativo a bordo fuori dal frigorifero)
cobas® HIV-1	Data non superata	90 giorni dal primo uso	Max 40 sedute	Max 40 ore
cobas® HBV/HCV/HIV-1 Control Kit	Data non superata	Non applicabile[a]	Non applicabile	Max 8 ore
cobas® NHP Negative Control Kit	Data non superata	Non applicabile[a]	Non applicabile	Max 10 ore
cobas omni Lysis Reagent	Data non superata	30 giorni dal caricamento*	Non applicabile	Non applicabile
cobas omni MGP Reagent	Data non superata	30 giorni dal caricamento*	Non applicabile	Non applicabile
cobas omni Specimen Diluent	Data non superata	30 giorni dal caricamento*	Non applicabile	Non applicabile
cobas omni Wash Reagent	Data non superata	30 giorni dal caricamento*	Non applicabile	Non applicabile

[a] Reagente monouso.

* Il calcolo inizia dalla prima volta che il reagente viene caricato sui **cobas**® 6800/8800 Systems.

Il reagente **cobas**® Specimen Pre-Extraction Reagent è stabile fino alla data di scadenza indicata. Dopo l'apertura, il reagente è stabile per 30 giorni a 2-8°C, comprese 13 ore cumulative a 30°C, o fino alla data di scadenza, a seconda di quale delle due condizioni si verifica prima (vedere la Tabella 9).

Tabella 9 Condizioni di scadenza per **cobas**® Specimen Pre-Extraction Reagent

Reagente	Data di scadenza del kit	Stabilità del kit aperto	Numero di sedute per cui il kit può essere usato	Stabilità a 30°C fuori dal frigorifero (tempo cumulativo)
cobas® Specimen Pre-Extraction Reagent	Data non superata	30 giorni dal primo uso	Non applicabile	Max 13 ore

Altri materiali necessari per il cobas® 5800 System

Tabella 10 Materiali e consumabili per l'utilizzo sul **cobas**® 5800 System

Materiale	**P/N**
cobas omni Processing Plate 24	08413975001
cobas omni Amplification Plate 24	08499853001
cobas omni Liquid Waste Plate 24	08413983001
Puntale CORE TIPS con filtro, 1 ml	04639642001
Puntale CORE TIPS con filtro, 300 µl	07345607001
cobas omni Liquid Waste Container	07094388001
cobas omni Lysis Reagent	06997538190
cobas omni MGP Reagent	06997546190
cobas omni Specimen Diluent	06997511190
cobas omni Wash Reagent	06997503190
Sacchetto per rifiuti solidi oppure Sacchetto per rifiuti solidi con inserto	07435967001 oppure 08030073001

Altri materiali necessari per i cobas® 6800/8800 Systems

Tabella 11 Materiali e consumabili per l'uso sui **cobas**® 6800/8800 Systems

Materiale	**P/N**
cobas omni Processing Plate	05534917001
cobas omni Amplification Plate	05534941001
cobas omni Pipette Tips	05534925001
cobas omni Liquid Waste Container	07094388001
cobas omni Lysis Reagent	06997538190
cobas omni MGP Reagent	06997546190
cobas omni Specimen Diluent	06997511190
cobas omni Wash Reagent	06997503190
Sacchetto per rifiuti solidi e Contenitore per rifiuti solidi oppure Sacchetto per rifiuti solidi con inserto e Kit cassetto	07435967001 e 07094361001 oppure 08030073001 e 08387281001

Tabella 12 Altri materiali e consumabili richiesti soltanto per la metodica degli spot di plasma essiccato su cartoncino PSC

Materiali
cobas® Plasma Separation Card*
Pinze o pinzette sterili o monouso**
Capillari da 140 µl (ad esempio, provetta di plastica Vitrex) con erogatore compatibile (ad esempio, portapipette Vitrex)*
Pungidito monouso (ad esempio, lancetta pungidito di sicurezza Greiner Bio-one MiniCollect®, profondità di penetrazione 2,00 mm)*
Busta per campione (busta di plastica trasparente con chiusura a zip) e sacchetti di essiccante in gel di silice (per un totale di 4 grammi; per maggiori informazioni sulla conservazione e sulla spedizione dei campioni PSC, vedere il documento **PSC Method Sheet ms_07963084190**).
Busta idonea al trasporto (ad esempio, Wicoseal 180 × 60 × 240 fmm)
Pipetta (ad esempio, pipetta Multistepper)
Eppendorf Thermomixer® (ad esempio, modello R 5355 o C o equivalente) con termoblocco da 24 provette per criogenia
Provette da 5 ml, filettatura interna, diametro 12,5 mm, in polipropilene (ad esempio, Greiner Bio-one Cryo.s™) e con tappi

* Per maggiori informazioni sulla raccolta dei campioni PSC, vedere il documento **PSC Method Sheet ms_07963084190**.

** Per prevenire la contaminazione crociata, utilizzare un paio di pinzette per ogni paziente! Si consiglia di utilizzare pinzette metalliche sterilizzate in autoclave dopo ogni singolo uso.

Strumentazione e software necessari

Il software del **cobas**® 5800 System e il pacchetto di analisi **cobas**® HIV-1 per il **cobas**® 5800 System verranno installati sullo strumento **cobas**® 5800. Il software Data Manager e il PC per il **cobas**® 5800 System verranno forniti con il sistema.

Il software dei **cobas**® 6800/8800 Systems e il pacchetto di analisi **cobas**® HIV-1 per i **cobas**® 6800/8800 Systems verranno installati sugli strumenti. Per la metodica degli spot di plasma essiccato su cartoncino PSC nei **cobas**® 6800/8800 Systems, verrà installato il pacchetto di analisi **cobas**® HIV-PSC ASAP (Assay Specific Analysis Package) sullo strumento (o sugli strumenti). Il server IG (Instrument Gateway) verrà fornito con i sistemi.

Tabella 13 Strumentazione

Apparecchiatura	**P/N**
cobas® 5800 System	08707464001
cobas® 6800 System (opzione mobile)	05524245001 e 06379672001
cobas® 6800 System (fisso)	05524245001 e 06379664001
cobas® 8800 System	05412722001
Modulo di inserimento dei campioni	06301037001

Per ulteriori informazioni, consultare l'Assistenza Utente o le Guide per l'utente del **cobas**® 5800 System o dei **cobas**® 6800/8800 Systems.

Nota: contattare il rappresentante Roche locale per richiedere un listino dettagliato dei rack per campioni, dei rack per puntali otturati e dei vassoi portarack accettati dagli strumenti.

Precauzioni e requisiti per l'uso

Avvertimenti e precauzioni

Come richiesto per qualsiasi procedura di analisi, per lo svolgimento di questo test è necessario attenersi alle buone pratiche di laboratorio. Data l'elevata sensibilità di questo test, fare attenzione ad evitare la contaminazione dei reagenti e delle miscele di amplificazione.

- Solo per uso diagnostico *in vitro*.
- Il test **cobas**® HIV-1 non è approvato per l'uso come test di screening per la presenza di HIV-1 in sangue ed emoderivati.
- Tutti i campioni dei pazienti devono essere manipolati come materiale a rischio biologico, seguendo le buone procedure di laboratorio descritte in Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories e nel documento M29-A4 del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).[18, 19] Questa procedura deve essere eseguita esclusivamente da personale esperto nella manipolazione di materiale a rischio biologico e nell'uso del test **cobas**® HIV-1 e dei **cobas**® 5800/6800/8800 Systems.
- Tutti i materiali di origine umana devono essere considerati a rischio biologico e quindi manipolati adottando precauzioni universalmente valide. In caso di fuoriuscita accidentale, disinfettare immediatamente l'area con una soluzione fresca a base di ipoclorito di sodio allo 0,5% in acqua distillata o deionizzata (diluire la candeggina domestica 1:10) oppure seguire le procedure previste dal proprio laboratorio.
    - In caso di fuoriuscita dei campioni PSC raccolti in **cobas**® Specimen Pre-Extraction Reagent (che contiene guanidina tiocianato), impedire che il liquido entri in contatto con disinfettanti contenenti ipoclorito di sodio, come la candeggina. L'eventuale miscela potrebbe produrre gas altamente tossici.
- I prodotti **cobas**® HBV/HCV/HIV-1 Control Kit e **cobas**® NHP Negative Control Kit contengono plasma derivato da sangue umano. Il materiale di provenienza è stato analizzato con test degli anticorpi brevettati ed è risultato non reattivo agli anticorpi anti-HCV, anti-HIV-1/2, HBsAg e anti-HBc. I test basati sui metodi PCR eseguiti sul plasma umano normale hanno inoltre confermato l'assenza di RNA dei virus HIV-1 (gruppi M e O), HIV-2 e HCV e DNA del virus HBV. Allo stato attuale, tuttavia, nessun metodo di analisi garantisce con assoluta certezza che i prodotti derivati da sangue umano non trasmettano agenti infettivi.
- Per ulteriori avvertimenti e precauzioni, vedere il documento **PSC Method Sheet ms_07963084190**.
- **Non congelare il sangue intero o i campioni conservati in tubi primari.**
- **cobas**® Specimen Pre-Extraction Reagent è fotosensibile e viene spedito in flaconi protetti dalla luce.
- Per garantire prestazioni ottimali del test, utilizzare soltanto i consumabili forniti o consigliati.
- Le schede di sicurezza (Safety Data Sheets, SDS) possono essere richieste al rappresentante Roche locale.
- Per un corretto svolgimento del test, attenersi scrupolosamente alle procedure e alle linee guida approvate. Qualunque deviazione dalle procedure e dalle linee guida approvate potrebbe compromettere le prestazioni del test.
- Potrebbero essere generati risultati falsi positivi senza un'adeguata prevenzione dell'effetto carryover durante la manipolazione e la preparazione dei campioni.
- In caso di un grave incidente verificatosi durante l'uso di questo test, segnalarlo alla propria autorità competente locale.

Manipolazione dei reagenti

- Manipolare tutti i reagenti, i controlli e i campioni seguendo le buone pratiche di laboratorio, al fine di prevenire il carryover dei campioni e dei controlli.
- Prima dell'uso ispezionare visivamente ogni cassetta dei reagenti, del diluente, del reagente di lisi e del reagente di lavaggio per confermare l'assenza di perdite. In caso di perdite accertate, non utilizzare il materiale per il test.
- Il **cobas omni** Lysis Reagent contiene guanidina tiocianato, una sostanza chimica potenzialmente pericolosa. Evitare che i reagenti entrino in contatto con la pelle, gli occhi o le mucose. In caso di contatto, lavare immediatamente con abbondante acqua per prevenire possibili ustioni.
- I kit **cobas**® HIV-1, **cobas omni** MGP Reagent e **cobas omni** Specimen Diluent contengono sodio azide come conservante. Evitare che i reagenti entrino in contatto con la pelle, gli occhi o le mucose. In caso di contatto, lavare immediatamente con abbondante acqua per prevenire possibili ustioni. In caso di fuoriuscita dei reagenti, diluire il liquido con acqua prima di asciugare.
- Evitare che **cobas omni** Lysis Reagent o **cobas**® Specimen Pre-Extraction Reagent, che contengono guanidina tiocianato, entrino in contatto con la soluzione di ipoclorito di sodio (candeggina). L'eventuale miscela potrebbe produrre gas altamente tossici.
- Smaltire tutti i materiali entrati in contatto con i campioni e i reagenti nel rispetto dei regolamenti previsti a livello locale, nazionale e internazionale.

Buone pratiche di laboratorio

- Non pipettare con la bocca.
- Non mangiare, bere o fumare nelle aree di lavoro designate.
- Indossare guanti, camici da laboratorio e protezioni per gli occhi durante la manipolazione dei campioni e dei reagenti del kit. Per prevenire eventuali contaminazioni, è necessario sostituire i guanti durante la manipolazione dei campioni, dei kit **cobas**® HIV-1 e dei reagenti **cobas omni**. Evitare di contaminare i guanti durante la manipolazione dei campioni e dei controlli.
- Lavare accuratamente le mani dopo avere manipolato i reagenti dei kit e dopo aver rimosso i guanti.
- Pulire e disinfettare accuratamente tutte le superfici di lavoro del laboratorio con una soluzione fresca a base di ipoclorito di sodio allo 0,5% e acqua deionizzata o distillata (candeggina per uso domestico diluita 1:10). Successivamente pulire la superficie con etanolo al 70%.
- In caso di fuoriuscite di liquidi sullo strumento **cobas**® 5800, attenersi alle istruzioni contenute nell'Assistenza Utente e/o nella Guida Utente del **cobas**® 5800 System per pulire accuratamente e decontaminare la superficie dello strumento.
- In caso di versamenti di liquidi sullo strumento **cobas**® 6800/8800, attenersi alle istruzioni contenute nella Guida Utente e/o nell'Assistenza Utente dei **cobas**® 6800/8800 Systems per pulire accuratamente e decontaminare la superficie dello strumento o degli strumenti.

Raccolta, trasporto e conservazione dei campioni di plasma

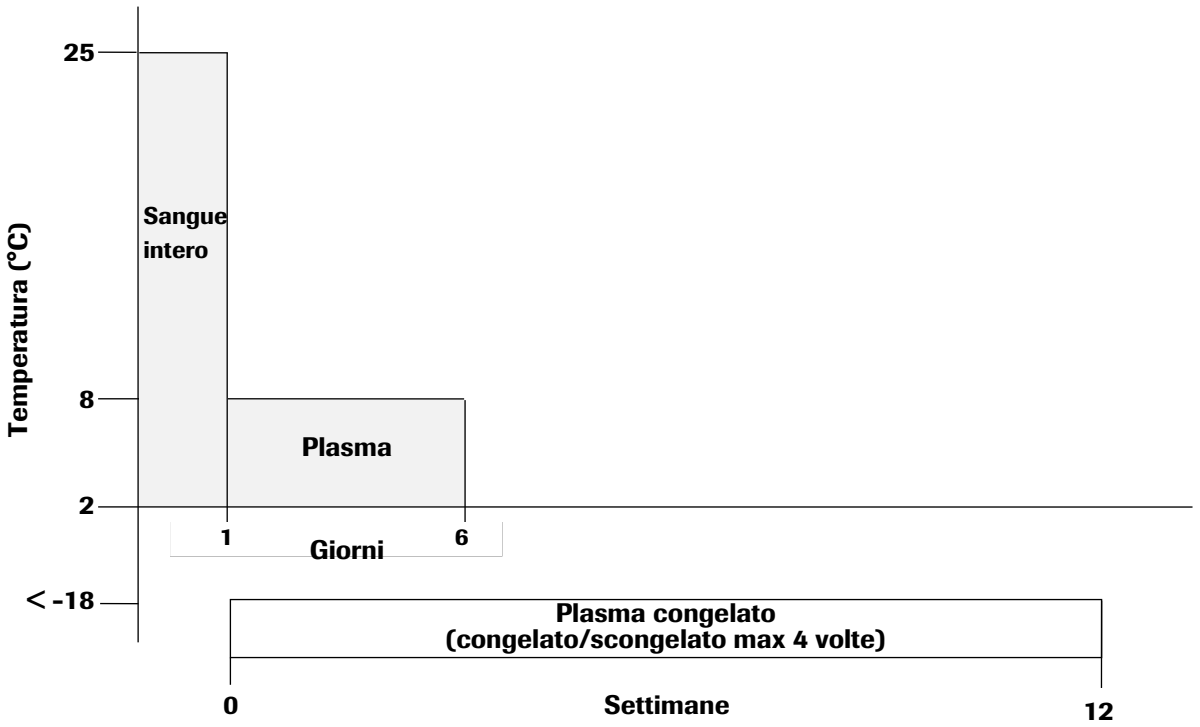
Nota: **manipolare tutti i campioni e i controlli come se fossero in grado di trasmettere agenti infettivi.**
Conservare tutti i campioni alle temperature indicate.
La stabilità dei campioni risente delle temperature elevate.
Se si utilizzano campioni congelati nelle provette secondarie, mantenere i campioni a temperatura ambiente (15-30°C) finché non si saranno scongelati completamente, quindi miscelare brevemente (ad esempio, in vortex per 3-5 secondi) e centrifugare in modo da raccogliere tutto il volume del campione sul fondo della provetta.

Nota: **dopo la centrifugazione, qualora possa essersi verificata la risospensione delle cellule nel plasma, potrebbe essere il caso di ripetere la centrifugazione prima dell'analisi sullo strumento.**

Campioni di plasma EDTA

- Raccogliere il sangue intero nelle provette BD Vacutainer® PPT™ destinate alla preparazione di plasma per i metodi di analisi di diagnostica molecolare, oppure in provette sterili con l'anticoagulante EDTA. Attenersi alle istruzioni fornite dal produttore delle provette. Vedere la Figura 1.
- Il sangue intero raccolto nelle provette con EDTA può essere conservato e/o trasportato fino a 24 ore tra 2°C e 25°C prima della preparazione del plasma. Per la centrifugazione, seguire le istruzioni fornite dal produttore.
- Dopo la separazione, i campioni di plasma EDTA possono essere conservati nei tubi secondari per un massimo di 6 giorni tra 2°C e 8°C o 12 settimane a ≤ -18°C. Per la conservazione a lungo termine sono consigliate temperature ≤ -60°C.
- I campioni di plasma sono stabili per un massimo di quattro cicli di congelamento/scongelamento quando sono congelati a ≤ -18°C.

Figura 1 Condizioni di conservazione dei campioni di plasma EDTA

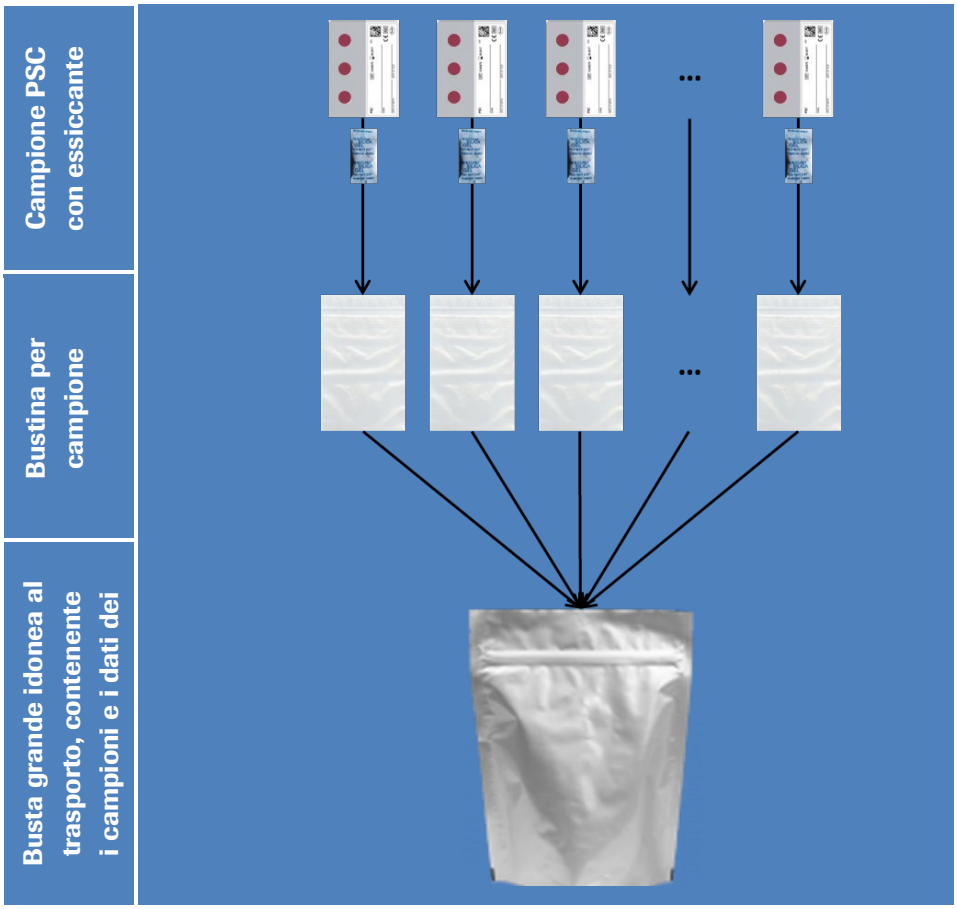


Per l'eventuale spedizione, imballare ed etichettare i campioni come previsto dai regolamenti nazionali e/o internazionali per il trasporto di campioni e agenti eziologici.

Campioni PSC

- Prelevare i campioni PSC applicando le procedure cliniche previste (vedere il documento **PSC Method Sheet ms_07963084190**).
- Verificare la data di scadenza del campione PSC e procedere solo se non è scaduto.
- Assicurarsi che la bustina in cui è contenuto il campione PSC sia perfettamente sigillata e integra.
- Etichettare il campione PSC con il nome e la data di nascita del paziente e la data e l'ora di raccolta del plasma.
- Applicare 140 µl di sangue intero su ogni cerchio della membrana PSC delineato dallo strato di spotting utilizzando un capillare e un erogatore adatto. Si raccomanda di riempire tutti e tre i cerchi sul cartoncino PSC, in modo da prevedere l'eventuale ripetizione del test.
- Non applicare i campioni di più pazienti sullo stesso cartoncino PSC.
- Evitare che le membrane entrino in contatto con i guanti, con gli strumenti o con superfici potenzialmente contaminate nel corso della procedura.
- Assicurarsi che ENTRAMBI i lati degli spot (fronte: membrana con sangue; retro: spot con plasma) sul cartoncino PSC siano saturi dopo 5 minuti. Controllare il retro attraverso lo strato trasparente posteriore.
- Lasciare asciugare il cartoncino PSC a temperatura ambiente per almeno 4 ore (o al massimo per tutta la notte) al riparo dalla luce diretta del sole.
- Non rimuovere lo strato di spotting. Questa operazione avverrà solo presso il laboratorio, prima dell'estrazione del campione.
- Dopo che si è asciugato, riporre il cartoncino PSC in una bustina con 4 grammi di essiccante e sigillarla. Le bustine singole possono contenere un solo campione ciascuna e devono essere riposte all'interno di una busta più grande, idonea al trasporto, insieme al foglio con i dati dei pazienti. Si raccomanda di non inserire più di 25 campioni PSC in ogni busta per il trasporto (vedere la Figura 2).

Figura 2 Confezionamento della busta per il trasporto dei campioni PSC



- Per l'eventuale spedizione, imballare ed etichettare i campioni come previsto dai regolamenti nazionali e/o internazionali per il trasporto di campioni e agenti eziologici. I cartoncini PSC possono essere trasportati per un periodo di 28 giorni prima dell'analisi a una temperatura di 18-45°C e un'umidità massima dell'85%. I campioni PSC all'interno delle bustine singole con 4 grammi di essiccante, a loro volta contenute in una busta grande idonea al trasporto, possono essere conservati dopo il trasporto a temperatura ambiente (18-30°C), a 2-8°C o a ≤ -10°C per un massimo di 56 giorni (con e senza separazione dello strato di spotting).

Istruzioni per l'uso

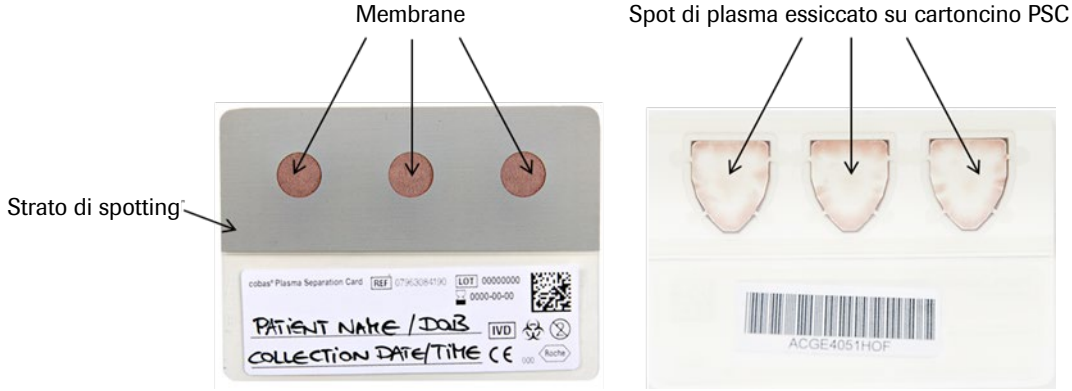
Note sulla procedura

- Non utilizzare i reagenti **cobas**® HIV-1, il **cobas**® HBV/HCV/HIV-1 Control Kit, il **cobas**® NHP Negative Control Kit o i reagenti **cobas omni** dopo la data di scadenza.
- Non riutilizzare i consumabili. Sono esclusivamente monouso.
- Per informazioni sulla corretta manutenzione degli strumenti, consultare l'Assistenza Utente e/o la Guida Utente del **cobas**® 5800 System o dei **cobas**® 6800/8800 Systems.

Preparazione dei campioni PSC e procedura pre-analitica

- Controllare l'integrità della busta di trasporto prima dell'apertura. Procedere solo se la busta di trasporto è perfettamente sigillata.
- Aprire la busta usata per il trasporto e, per ogni bustina con il campione, proseguire solo se:
    - Il modulo di richiesta del laboratorio è stato compilato in tutte le sue parti.
    - Il barcode sul modulo di richiesta del laboratorio corrisponde al barcode sul campione PSC.
    - La bustina del campione è perfettamente sigillata e contiene un solo campione PSC con 4 grammi di essiccante.
    - La data del prelievo è indicata chiaramente, il prelievo risale a non più di 28 giorni prima ed è stato eseguito prima della scadenza del cartoncino PSC (vedere la Figura 3).
    - Il campione PSC non è scaduto.
    - Lo spot di plasma essiccato su cartoncino PSC ha un aspetto omogeneo sul davanti e appare interamente ricoperto di plasma sul retro (vedere la Figura 3).

Figura 3 Campioni PSC da analizzare (a sinistra: fronte; a destra: retro)

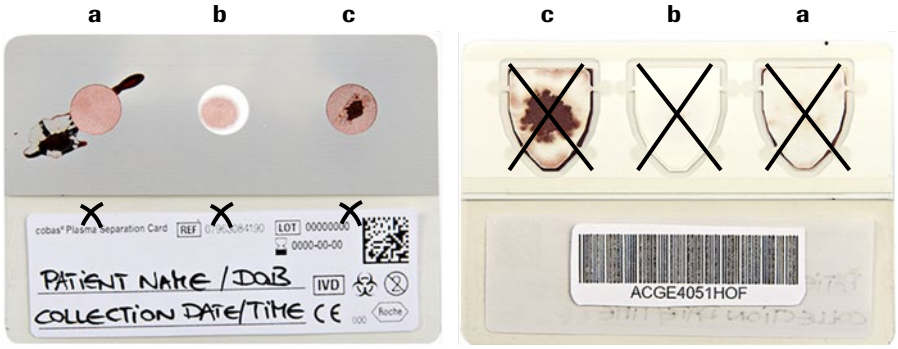


    - I campioni PSC devono essere contrassegnati e scartati se:
        - Sono visibili sbavature di sangue (Figura 4a) o la membrana non è ricoperta interamente di sangue (Figura 4b) e quindi lo spot PSC ha un aspetto disomogeneo sul davanti e/o non è interamente ricoperto di plasma sul retro (visibile attraverso il supporto).

- La membrana è danneggiata (Figura 4c) e quindi lo spot PSC ha un aspetto disomogeneo sul davanti ed è di colore rosso scuro-marroncino sul retro (visibile attraverso il supporto).

Nota: sono previsti tre spot per consentire l'eventuale ripetizione del test. Un cartoncino PSC potrebbe contenere uno spot venuto male, ma essere comunque utilizzabile come campione per il test. Contrassegnare chiaramente gli spot venuti male per renderli riconoscibili. Evitare di contrassegnarli sullo strato di spotting. Confrontare sempre tra loro i tre spot prima di valutarne la qualità.

Figura 4 Criteri per scartare i campioni PSC (a sinistra: fronte; a destra: retro) Non analizzare i campioni con sbavature (a), con la membrana non interamente ricoperta (b) o visibilmente danneggiata (c). Gli spot devono essere chiaramente contrassegnati quando sono scartati.



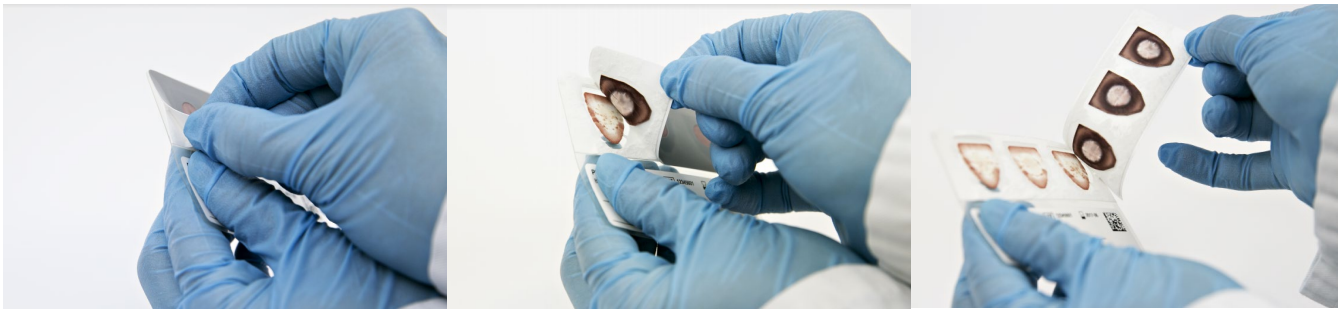
- Etichettare una provetta (da 5 ml, filettatura interna, diametro 12,5 mm, in polipropilene [ad esempio, Greiner Bio-one Cryo.s™]) per ogni campione PSC con il barcode corrispondente del modulo di richiesta del laboratorio (Figura 5) e sistemarla in un rack. Trasferire le provette sotto una cappa a flusso laminare insieme alle bustine dei campioni contenenti i cartoncini PSC. Per informazioni sulla corretta etichettatura barcode, consultare l'Assistenza Utente o le Guide per l'utente del **cobas**® 5800 System o dei **cobas**® 6800/8800 Systems.

Figura 5 Etichettatura della provetta con il barcode corrispondente del campione PSC

- Stappare le provette sotto la cappa a flusso laminare.

- Per il campione PSC selezionato, aprire la bustina e rimuovere lo strato di spotting (Figura 6).

Figura 6 Rimozione dello strato di spotting



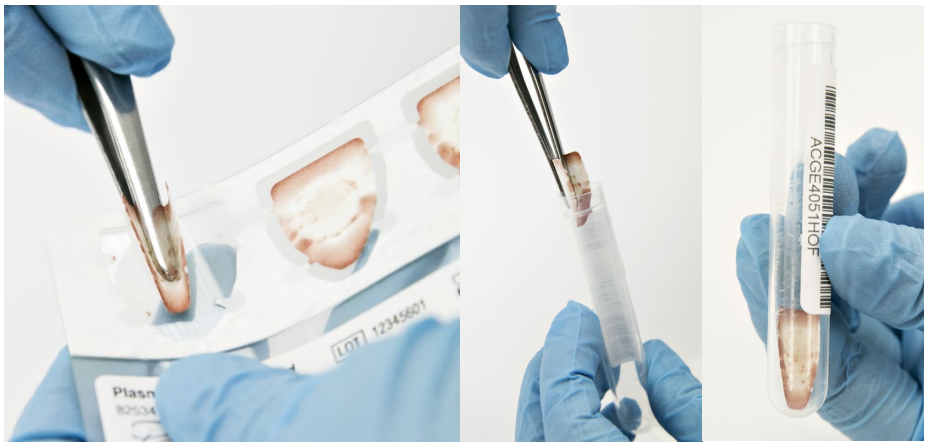
- Piegare leggermente il cartoncino PSC e rimuovere lo spot di plasma essiccato tirandolo via con un paio di pinzette sterili. Dopo aver rimosso il campione dal cartoncino PSC, piegarlo per inserirlo più agevolmente all'interno della provetta (Figura 7). utilizzare un nuovo paio di pinzette per ogni paziente.

Nota: gli spot di plasma essiccato possono diventare fragili durante la conservazione. Vedere i requisiti di conservazione del cartoncino PSC. Maneggiare con cura durante l'inserimento nella base.

Figura 7 Rimozione dello spot di plasma essiccato piegando il cartoncino PSC

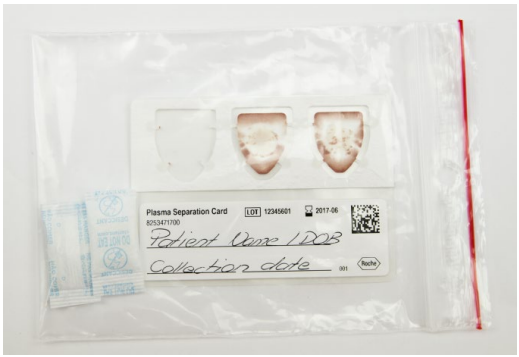
- Staccare uno spot di plasma essiccato dal cartoncino PSC e trasferirlo nella provetta corrispondente, facendo in modo che la punta inferiore dello spot PSC raggiunga il fondo della provetta e aderisca alla parete interna, così da evitare errori di pipettamento (Figura 8). Posizionare correttamente lo spot PSC utilizzando, se necessario, un puntale di pipettamento sterile. Assicurarsi che la provetta e il campione PSC prelevato dal cartoncino PSC abbiano lo stesso barcode.

Figura 8 Trasferimento dello spot di plasma essiccato dal cartoncino PSC alla provetta



- Lasciare il cartoncino PSC con i rimanenti spot di plasma essiccati nella bustina originale, inserendovi 4 grammi di essiccante fresco per consentire eventuali ripetizioni future del test (Figura 9). I campioni PSC possono essere conservati per un periodo di 56 giorni dopo il trasporto, con e senza separazione dello strato di spotting (a 18-30°C, o a 2-8°C o a ≤ -10°C).

Figura 9 Campione PSC nella busta per potenziali ripetizioni del test



- Prima dell'uso, lasciare equilibrare a temperatura ambiente il reagente **cobas**® Specimen Pre-Extraction Reagent (SPER). Pipettare 1300 µl di reagente SPER nelle provette contenenti i campioni PSC (Figura 10) e chiudere con i tappi. Assicurarsi che le provette siano tappate correttamente per prevenire l'evaporazione.

Figura 10 Aggiunta di 1300 µL di SPER

- Inserire le provette nelle posizioni 1-24 di un Eppendorf Thermomixer® preriscaldato (ad esempio, modello R 5355 o C o equivalente) con termoblocco da 24 provette per criogenia, quindi incubare per 10 minuti a 56°C e 1000 rpm per estrarre il virus dal plasma secco (Figura 11). Iniziare l'incubazione subito dopo aver aggiunto il reagente SPER.

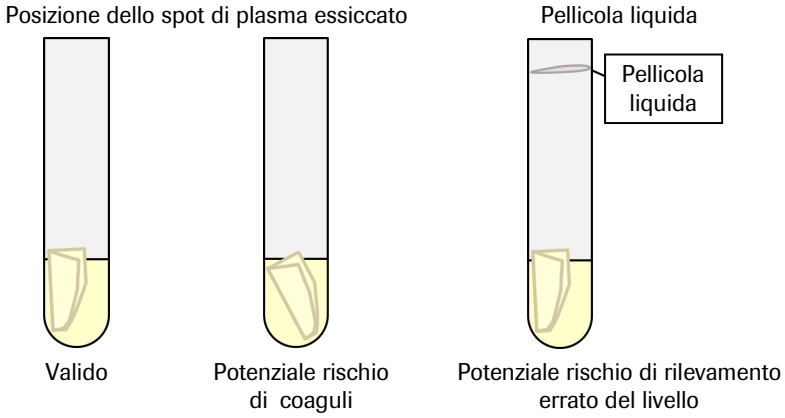
Figura 11 Incubazione

- Trasferire le provette su un rack per campioni e stapparle una alla volta per ridurre al minimo la contaminazione crociata (Figura 12). Sostituire i guanti dopo aver rimosso i tappi.

Figura 12 Rimozione dei tappi dalle provette

- Assicurarsi che lo spot di plasma essiccato aderisca correttamente alla parete delle provetta (Figura 13) per prevenire coaguli del campione. Posizionare correttamente lo spot PSC utilizzando, se necessario, un puntale di pipettamento sterile.
- Utilizzando un puntale di pipettamento sterile, è possibile rimuovere la pellicola liquida che potrebbe formarsi, evitando il rilevamento anticipato del livello del liquido.
- Caricare le provette sul **cobas**® 5800 System o sui **cobas**® 6800/8800 Systems.

Figura 13 Preparazione dello spot di plasma essiccato su cartoncino PSC prima del flusso di lavoro analitico



Nota: assicurarsi di rimuovere l'eventuale pellicola liquida che potrebbe formarsi durante la procedura.

Esecuzione del test cobas® HIV-1 sul cobas® 5800 System

È possibile eseguire il test **cobas**® HIV-1 con due diversi volumi minimi: 350 µl (per il flusso di lavoro con 200 µl di campione) o 650 µl (per il flusso di lavoro con 500 µl di campione). La procedura del test è descritta in maniera dettagliata nell'Assistenza Utente e/o nella Guida Utente del **cobas**® 5800 System. La procedura è riassunta nella Figura 14.

Il test **cobas**® HIV-1 può essere eseguito con 1300 µl di **cobas**® Specimen Pre-Extraction Reagent (per il flusso di lavoro per campioni PSC da 850 µl). Tenere presente che il flusso di lavoro **cobas**® HIV-1 PSC può essere eseguito in modalità batch misto con i campioni di plasma o di siero e in associazione con la procedura **cobas**® HIV-1/ HIV-2 Qualitative con spot di sangue secco. La procedura del test è descritta in maniera dettagliata nell'Assistenza Utente e/o nella Guida Utente del **cobas**® 5800 System. Nella Figura 14 è riassunta anche la procedura per i campioni PSC.

Verificare che il tipo di campione (PSC) e il pacchetto di analisi ASAP siano corretti (**cobas**® HIV-PSC ASAP) prima di dare inizio alla procedura del test.

Figura 14 Procedura del test **cobas**® HIV-1 sul **cobas**® 5800 System

1 Eseguire la procedura di accesso al sistema

2 Caricamento dei campioni sul sistema:
- Caricare i rack per campioni sul sistema
- Il sistema si prepara automaticamente
- Ordinare i test

3 Ricaricare i reagenti e i consumabili segnalati dal sistema:
- Caricare le cassette dei reagenti specifici per il test
- Caricare i minirack per i controlli
- Caricare i puntali di estrazione
- Caricare i puntali di eluizione
- Caricare le piastre di estrazione
- Caricare le piastre per rifiuti liquidi
- Caricare le piastre di amplificazione
- Caricare la cassetta MGP
- Ricaricare il diluente per campioni
- Ricaricare il reagente di lisi
- Ricaricare il reagente di lavaggio

4 Avviare la seduta selezionando il pulsante Start nell'interfaccia utente; tutte le sedute successive si avvieranno automaticamente, a meno che non vengano posticipate manualmente

5 Rivedere ed esportare i risultati

6 Rimuovere e tappare le provette campione contenenti il volume minimo richiesto per eventuale uso futuro

Pulire lo strumento:
- Scaricare i minirack per i controlli vuoti
- Scaricare le cassette dei reagenti specifici per il test
- Svuotare il cassetto per piastre di amplificazione
- Svuotare i rifiuti liquidi
- Svuotare i rifiuti solidi

Esecuzione del test cobas® HIV-1 sui cobas® 6800/8800 Systems

È possibile eseguire il test **cobas**® HIV-1 con due diversi volumi minimi: 350 µl (per il flusso di lavoro con 200 µl di campione) o 650 µl (per il flusso di lavoro con 500 µl di campione). La procedura del test è descritta dettagliatamente nella Guida Utente e/o nell'Assistenza Utente dei **cobas**® 6800/8800 Systems. La procedura è riassunta nella Figura 15.

Il test **cobas**® HIV-1 può essere eseguito con 1300 µl di **cobas**® Specimen Pre-Extraction Reagent (per il flusso di lavoro per campioni PSC da 850 µl). Tenere presente che il flusso di lavoro **cobas**® HIV-1 PSC è stato valutato con la funzionalità batch misto solo in associazione con la procedura **cobas**® HIV-1/HIV-2 Qualitative con spot di sangue secco. La procedura del test è descritta dettagliatamente nella Guida Utente e/o nell'Assistenza Utente dei **cobas**® 6800/8800 Systems. Nella Figura 15 è riassunta anche la procedura per i campioni PSC.

Verificare che il tipo di campione (PSC) e il pacchetto di analisi ASAP siano corretti (**cobas**® HIV-PSC ASAP) prima di dare inizio alla procedura del test.

Figura 15 Procedura del test **cobas**® HIV-1 sui **cobas**® 6800/8800 Systems

1

Eseguire la procedura di accesso al sistema
Premere Start per preparare il sistema
Ordinare i test

2

Ricaricare i reagenti e i consumabili segnalati dal sistema
- Caricare la cassetta dei reagenti specifici per il test
- Caricare le cassette dei controlli
- Caricare i puntali di pipettamento
- Caricare le piastre di estrazione
- Caricare il reagente MGP
- Caricare le piastre di amplificazione
- Ricaricare il diluente per campioni
- Ricaricare il reagente di lisi
- Ricaricare il reagente di lavaggio

3

Caricamento dei campioni sul sistema
- Caricare i rack per campioni e i rack portapuntali otturati sullo stesso modulo di inserimento dei campioni
- Confermare che i campioni sono stati accettati dal modulo di trasferimento

4

Per avviare la seduta, scegliere il pulsante Avvio manuale nell'interfaccia utente o attendere l'avvio automatico dopo 120 minuti o se il batch è al completo

5

Rivedere ed esportare i risultati

6

Rimuovere e tappare le provette campione contenenti il volume minimo richiesto per eventuale uso futuro

Pulire lo strumento
- Scaricare le cassette dei controlli vuote
- Svuotare il cassetto per piastre di amplificazione
- Svuotare i rifiuti liquidi
- Svuotare i rifiuti solidi

Risultati

Il **cobas**® 5800 System e i **cobas**® 6800/8800 Systems rilevano automaticamente la concentrazione del RNA di HIV-1 per i campioni e i controlli. La concentrazione dell'RNA di HIV-1 si esprime in copie per millilitro (cp/ml) o in Unità Internazionali per millilitro (UI/ml). Il fattore di conversione per il test **cobas**® HIV-1 è di 0,6 cp/UI.

Controllo di qualità e validità dei risultati sul cobas® 5800 System

- In ogni batch vengono eseguiti un controllo negativo [(–) C] e due controlli positivi: un controllo positivo basso [HIV-1 L(+)C] e un controllo positivo alto [HIV-1 H(+)C]. Ciò avviene almeno ogni 72 ore o per ogni nuovo lotto del kit. È possibile aumentare la frequenza con cui sono programmati i controlli positivi e/o negativi in base alle procedure del laboratorio e/o ai regolamenti locali.
- Nel software **cobas**® 5800 System e/o nel report, verificare se sono presenti eventuali avvisi e i risultati corrispondenti, in modo da confermare la validità del batch.
- Il batch è valido se non viene generato nessun flag per i tre controlli, che includono un controllo negativo e due controlli positivi: HIV-1 L(+)C, HIV-1 H(+)C. Il risultato del controllo negativo è visualizzato come (–) C e i controlli positivi alto e basso sono visualizzati come HxV L(+)C e HxV H(+)C.

Il **cobas**® 5800 software considera automaticamente non validi i risultati in caso di fallimento del controllo negativo o dei controlli positivi.

NOTA: il **cobas**® 5800 System è preimpostato in modo che venga eseguita una serie di controlli (positivi e negativi) con ogni seduta; tuttavia è possibile configurare una frequenza inferiore, fino a 72 ore, in base alle procedure del laboratorio e/o ai regolamenti locali. Per maggiori informazioni, rivolgersi ad un tecnico Roche e/o all'assistenza clienti Roche.

Risultati dei controlli sul cobas® 5800 System

I risultati dei controlli sono visualizzati nell'app "Controls" del software **cobas**® 5800.

- I controlli sono contrassegnati come "validi" nella colonna del risultato del controllo se tutti i target del controllo sono validi. I controlli sono contrassegnati come "non validi" nella colonna del risultato del controllo se tutti i target del controllo sono non validi.
- Ai controlli "non validi" viene associato un avviso nella colonna degli avvisi. Nella vista dettagliata viene spiegato il motivo per cui il controllo è contrassegnato come non valido e vengono mostrati gli eventuali avvisi.
- Se uno dei controlli positivi non è valido, ripetere il test di tutti i controlli positivi e di tutti i campioni interessati. Se il controllo negativo non è valido, ripetere il test su tutti i controlli e su tutti i campioni interessati.

Controllo di qualità e validità dei risultati sui cobas® 6800/8800 Systems

- In ogni batch vengono inclusi un controllo negativo (–) C e due controlli positivi, un controllo positivo basso HIV-1 L(+)C e un controllo positivo alto HIV-1 H(+)C.
- Nel software **cobas**® 6800/8800 e/o nel report verificare se sono presenti flag e risultati ad essi associati per confermare la validità del batch.
- Il batch è valido se non viene generato nessun flag per i tre controlli, che includono un controllo negativo e due controlli positivi: HIV-1 L(+)C, HIV-1 H(+)C. Il risultato del controllo negativo è visualizzato come (–) C e i controlli positivi alto e basso sono visualizzati come HxV L(+)C e HxV H(+)C.

Il software **cobas**® 6800/8800 considera automaticamente non validi i risultati in caso di fallimento dei controlli negativo e positivo.

Avvisi dei controlli sui cobas® 6800/8800 Systems

Tabella 14 Flag per i controlli positivi e negativi

Controllo negativo	**Flag**	**Risultato**	**Interpretazione**
(–) C	Q02 (Batch di controllo non riuscito)	Non valido	Un risultato non valido, oppure il risultato del titolo calcolato per il controllo negativo non è negativo.
Controllo positivo	**Flag**	**Risultato**	**Interpretazione**
HxV L(+)C	Q02 (Batch di controllo non riuscito)	Non valido	Un risultato non valido, oppure il risultato del titolo calcolato per il controllo positivo basso non rientra nell'intervallo assegnato.
HxV H(+)C	Q02 (Batch di controllo non riuscito)	Non valido	Un risultato non valido, oppure il risultato del titolo calcolato per il controllo positivo alto non rientra nell'intervallo assegnato.

Se il batch non è valido, è necessario ripetere il test sull'intero batch, compresi campioni e controlli.

Nel software **cobas**® 6800/8800, la sigla HxV L(+)C significa controllo positivo basso **cobas**® HBV/HCV/HIV-1 e la sigla HxV H(+)C significa controllo positivo alto **cobas**® HBV/HCV/HIV-1.

Interpretazione dei risultati

Nel caso di un batch di controllo valido, verificare nel software **cobas**® 5800 System e **cobas**® 6800/8800 Systems e/o nei report se sono presenti eventuali avvisi per ogni singolo campione. I risultati dovranno essere interpretati applicando i seguenti criteri:

- Un batch valido può includere risultati dei campioni validi e non validi.

Tabella 15 Risultati per i singoli target e relativa interpretazione

Risultati	**Interpretazione**
Target Not Detected	RNA di HIV non rilevato. Segnalare i risultati nel report come “HIV non rilevato”.
< Titer Min	Il titolo calcolato è al di sotto del limite inferiore di quantificazione (LLoQ) del saggio. Segnalare i risultati nel report come “HIV rilevato, minore di (Titer Min).” Titer Min = 20 cp/ml e 33 UI/ml (500 µl di plasma) Titer Min = 50 cp/ml e 83 UI/ml (200 µl di plasma) Titer Min = 790 cp/ml e 1317 UI/ml (PSC)
Titer	Il titolo calcolato rientra nell'Intervallo lineare del saggio: maggiore o uguale al valore “Titer Min” e minore o uguale al valore “Titer Max”. Segnalare i risultati nel report come “(Titolo) di HIV-1 rilevato”.
> Titer Max[a]	Il titolo calcolato è al di sopra del limite superiore di quantificazione (ULoQ) del saggio. Segnalare i risultati nel report come “HIV rilevato, maggiore di (Titer Max)”. Titer max = 1,00E+07 cp/ml e 1,67E+07 UI/ml (500 µl, 200 µl e PSC)

[a] Se il risultato del campione è “> Titer Max”, si riferisce ai campioni HIV-1-positivi con titoli al di sopra del limite di quantificazione superiore (ULoQ). Se si desidera ottenere un risultato quantitativo, diluire il campione originale in plasma EDTA HIV-1-negativo (a seconda del tipo di campione di partenza) quindi ripetere il test. Moltiplicare il risultato ottenuto per il fattore di diluizione.

Interpretazione dei risultati sul cobas® 5800 System

I risultati dei campioni sono visualizzati nell'app "Risultati" del software **cobas**® 5800.

Nel caso di un batch di controllo valido, verificare nel software **cobas**® 5800 System e/o nel report se sono presenti eventuali avvisi per ogni singolo campione. I risultati dovranno essere interpretati applicando i seguenti criteri:

- I campioni associati a un batch di controllo valido sono mostrati come "Validi" nella colonna "Risultato di controllo" se tutti i risultati dei target del controllo sono stati indicati come validi nel report. I campioni associati a un batch di controllo non valido sono mostrati come "Non validi" nella colonna "Risultato di controllo" se tutti i risultati dei target del controllo sono stati indicati come non validi nel report.
- Se i controlli associati di un risultato campione sono non validi, verrà aggiunto un flag specifico al risultato campione nel modo seguente:
    - Q05D: validazione dei risultati non riuscita a causa di un controllo positivo non valido
    - Q06D: validazione dei risultati non riuscita a causa di un controllo negativo non valido
- I valori nella colonna "Risultati" relativi ai singoli risultati target dei campioni devono essere interpretati nel modo indicato in Tabella 15.
- Se uno o più target dei campioni sono contrassegnati con "Non valido", il software **cobas**® 5800 mostra un flag nella colonna "Flag". Nella vista dettagliata viene spiegato il motivo per cui i target dei campioni sono contrassegnati come non validi e vengono mostrati gli eventuali avvisi.

Interpretazione dei risultati sul cobas® 6800/8800 Systems

Se un batch è valido, verificare nel software dei **cobas**® 6800/8800 Systems e/o nel report se sono presenti flag per ogni singolo campione. I risultati dovranno essere interpretati applicando i seguenti criteri:

- I campioni sono contrassegnati con "Yes" nella colonna "Valido" se tutti i target richiesti hanno generato risultati validi. I campioni contrassegnati con "No" nella colonna "Valido" potrebbero necessitare di ulteriore interpretazione e altri interventi.
- I valori per ogni risultato target del campione dovrebbero essere interpretati secondo le informazioni riportate nella precedente Tabella 15.

Limiti della procedura

- Il test **cobas**® HIV-1 con il flusso di lavoro per campioni di plasma è stato valutato solo in associazione con **cobas**® HBV/HCV/HIV-1 Control Kit, **cobas**® NHP Negative Control Kit, **cobas omni** MGP Reagent, **cobas omni** Lysis Reagent, **cobas omni** Specimen Diluent e **cobas omni** Wash Reagent per l'uso sui **cobas**® 5800/6800/8800 Systems.
- L'affidabilità dei risultati è influenzata dal metodo di raccolta, conservazione e manipolazione dei campioni.
- La quantificazione dell'RNA di HIV-1 dipende dal numero di particelle virali presenti nei campioni e può essere influenzata dal metodo di prelievo del campione, da fattori legati al paziente (ad esempio, età e presenza di sintomi) e/o dallo stadio dell'infezione.
- Anche se rare, le mutazioni nelle regioni altamente conservate di un genoma virale coperte dal test **cobas**® HIV-1 possono alterare i legami dei primer e/o delle sonde e causare una quantificazione per difetto del virus o impedire l'identificazione del virus.
- A causa delle differenze intrinseche tra le tecnologie, si consiglia agli utenti, prima di passare da una tecnologia a un'altra, di svolgere uno studio sulla correlazione tra i metodi nel proprio laboratorio, così da qualificare tali differenze. Si consiglia agli utenti di elaborare norme/procedure specifiche.
- Il test **cobas**® HIV-1 non è destinato all'uso come test di screening per la presenza di HIV-1 nel sangue e negli emoderivati.

Valutazione delle prestazioni non cliniche

Caratteristiche chiave delle prestazioni con i campioni di plasma EDTA sui cobas® 6800/8800 Systems

Limite di sensibilità (LoD)

Standard Internazionale OMS

Per determinare il limite di sensibilità del test **cobas**® HIV-1 è stato utilizzato lo Standard Internazionale dell'OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità) per l'RNA di HIV-1 destinato ai test basati sulla tecnologia di amplificazione dell'acido nucleico (2° Standard Internazionale OMS), gruppo M, sottotipo B, ottenuto dal NIBSC (National Institute for Biological Standards and Control). Lo standard è stato diluito in serie in campioni di plasma EDTA umano HIV-negativo, per volumi di analisi di 500 µl e 200 µl. I pannelli, costituiti da cinque livelli di concentrazione e un campione negativo, sono stati analizzati con tre lotti di reagenti del test **cobas**® HIV-1, utilizzando più sedute, più giorni, più operatori e più strumenti.

I risultati relativi ai campioni di plasma EDTA nei due volumi preparati sono riportati nella Tabella 16 e nella Tabella 17. Lo studio dimostra che il test **cobas**® HIV-1 ha rilevato l'RNA di HIV-1 ad una concentrazione di 13,2 cp/ml (22,0 UI/ml), come definito dall'analisi Probit, con un tasso di successo del 95% per il volume di analisi del campione di 500 µl e a una concentrazione di 35,5 cp/ml (59,2 UI/ml) o superiore, come definito dall'analisi Probit, con un tasso di successo del 95% per il volume di analisi del campione di 200 µl.

Tabella 16 Limite di sensibilità per il plasma EDTA (500 µl)

Concentrazione iniziale del titolo (cp/ml RNA di HIV-1)	Concentrazione iniziale del titolo (UI/ml RNA di HIV-1)	N. di repliche valide	N. di positivi	Tasso di successo %
40,0	66,7	189	189	100,0%
20,0	33,3	189	186	98,4%
10,0	16,7	189	171	90,5%
5,0	8,3	189	125	66,1%
2,5	4,2	189	67	35,4%
0,0	0,0	189	0	0,0%
LoD tramite analisi PROBIT con tasso di successo al 95%		13,2 cp/ml; intervallo di confidenza al 95%: 11,4–15,9 cp/ml 22,0 UI/ml; intervallo di confidenza al 95%: 19,0–26,5 UI/ml		

Tabella 17 Limite di sensibilità per il plasma EDTA (200 µl)

Concentrazione iniziale del titolo (cp/ml RNA di HIV-1)	Concentrazione iniziale del titolo (UI/ml RNA di HIV-1)	N. di repliche valide	N. di positivi	Tasso di successo %
200,0	333,3	189	189	100,0%
100,0	166,7	188	188	100,0%
50,0	83,3	189	186	98,4%
25,0	41,7	189	164	86,8%
12,5	20,8	189	112	59,3%
0,0	0,0	188	0	0,0%
LoD tramite analisi PROBIT con tasso di successo al 95%		35,5 cp/ml; intervallo di confidenza al 95%: 30,8–43,2 cp/ml 59,2 UI/ml; intervallo di confidenza al 95%: 51,3–72,0 UI/ml		

Intervallo lineare

Lo studio sulla linearità del test **cobas**® HIV-1 è stato eseguito con una serie di diluizioni costituita da un pannello di 12 membri (volume di analisi del campione: 500 µl) e un pannello di 11 membri (volume di analisi del campione: 200 µl) che coprono l'intero intervallo lineare per l'HIV-1, gruppo M, sottotipo B predominante. I membri del pannello sono stati preparati a partire da un campione di sopranatante da coltura cellulare positivo per l'RNA di HIV-1 ad alto titolo. Per la valutazione sono state seguite le linee guida CLSI EP06-A.[20] Sono stati analizzati tre lotti di reagenti su tre **cobas**® 6800/8800 Systems da tre operatori, per un totale di 16 ripetizioni per ogni membro del pannello e per ogni lotto, distribuite su quattro giornate di lavoro (quattro ripetizioni per kit, lotto e giorno).

Con un volume di analisi di 500 µl, il test **cobas**® HIV-1 è lineare tra 20 cp/ml e 1,00E+07 cp/ml (33,3 UI/ml-1,67E+07 UI/ml) e mostra una deviazione assoluta dalla regressione nonlineare di migliore adattamento inferiore a ±0,2 $\log_{10}$ in plasma umano EDTA (vedere Figura 16). Lungo l'intervallo lineare, l'accuratezza del test è compresa entro ±0,2 $\log_{10}$.

Con un volume di analisi di 200 µl, il test **cobas**® HIV-1 è lineare tra 50 cp/ml e 1,00E+07 cp/ml (83,3 UI/ml-1,67E+07 UI/ml) e mostra una deviazione assoluta dalla regressione nonlineare di migliore adattamento inferiore a ±0,2 $\log_{10}$ in plasma umano EDTA (vedere Figura 17). Lungo l'intervallo lineare, l'accuratezza del test è compresa entro ±0,2 $\log_{10}$.

Figura 16 Definizione dell'intervallo lineare per il plasma EDTA (500 µl)

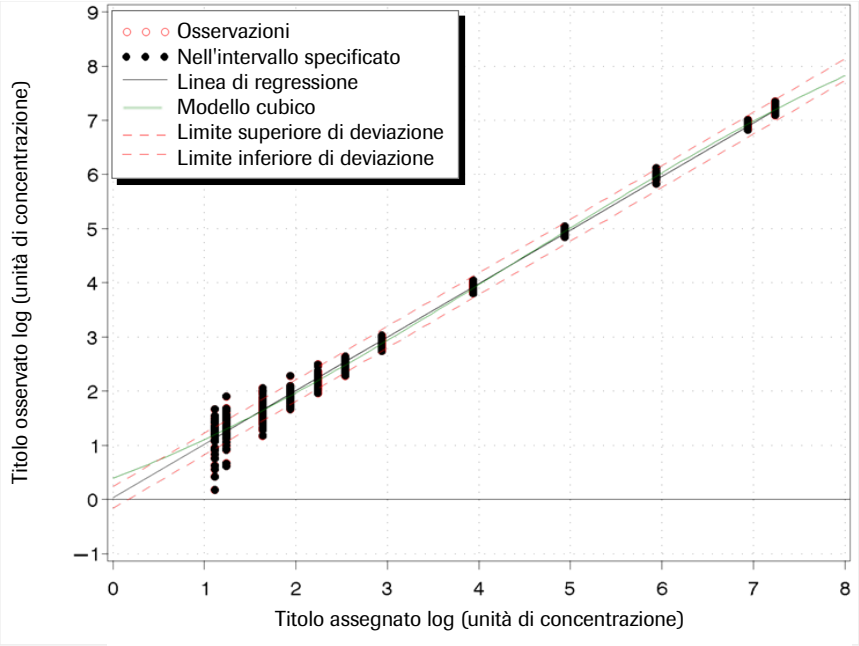
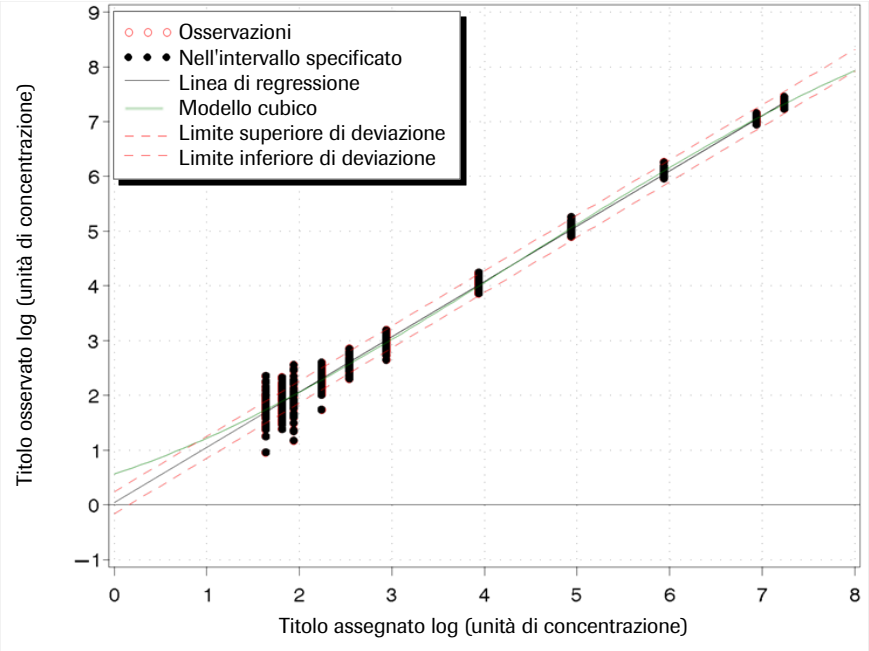


Figura 17 Definizione dell'intervallo lineare per il plasma EDTA (200 µl)



Precisione intra-laboratorio

La precisione del test **cobas**® HIV-1 è stata determinata analizzando diluizioni seriali di un campione di HIV-1 ad alto tasso di positività (gruppo M; sottotipo B, da virus coltivato) in plasma EDTA HIV-negativo. I test sono stati eseguiti su otto livelli di diluizione (volume di analisi del campione: 500 µl) e sette livelli di diluizione (volume di analisi del campione: 200 µl) con 48 ripetizioni per ogni livello e volume di analisi, utilizzando tre lotti di reagenti del test **cobas**® HIV-1, tre strumenti e tre operatori nell'arco di 12 giorni. Ogni campione è stato sottoposto all'intera procedura prevista per il test **cobas**® HIV-1, che è completamente automatizzata sui **cobas**® 6800/8800 Systems. I risultati della precisione qui indicata rappresentano dunque tutti gli aspetti della procedura del test. I risultati sono riportati nella Tabella 18 e nella Tabella 19.

Il test **cobas**® HIV-1 ha dimostrato un'elevata precisione con i tre lotti di reagenti utilizzati, a concentrazioni di 1,00E+02 cp/ml-1,00E+07 cp/ml nel caso del volume di analisi di 500 µl e di 2,00E+02 cp/ml-1,00E+07 cp/ml nel caso del volume di analisi di 200 µl.

Tabella 18 Precisione intra-laboratorio del test **cobas**® HIV-1 (campioni di plasma EDTA - volume di analisi 500 µl)*

Concentrazione nominale (cp/ml)	Concentrazione assegnata (cp/ml)	Materiale di origine	Plasma EDTA			
			Lotto 1	Lotto 2	Lotto 3	Tutti i lotti
			DS	DS	DS	DS in pool
1,00E+07	8,67E+06	Coltura cellulare	0,04	0,06	0,03	0,05
1,00E+06	8,67E+05	Coltura cellulare	0,06	0,05	0,04	0,05
1,00E+05	8,67E+04	Coltura cellulare	0,05	0,07	0,04	0,05
1,00E+04	8,67E+03	Coltura cellulare	0,06	0,06	0,04	0,05
1,00E+03	8,67E+02	Coltura cellulare	0,07	0,06	0,07	0,07
4,00E+02	3,47E+02	Coltura cellulare	0,09	0,10	0,09	0,09
2,00E+02	1,73E+02	Coltura cellulare	0,11	0,08	0,14	0,11
1,00E+02	8,67E+01	Coltura cellulare	0,15	0,11	0,10	0,12

* I dati dei titoli sono considerati come distribuiti secondo una curva log-normale e sono analizzati secondo la trasformazione log_{10}. Le colonne DS (Deviazione Standard) indicano il totale del titolo dopo la trasformazione log per ognuno dei tre lotti di reagenti.

Tabella 19 Precisione intra-laboratorio del test **cobas**® HIV-1 (campioni di plasma EDTA - volume di analisi 200 µl)*

Concentrazione nominale (cp/ml)	Concentrazione assegnata (cp/ml)	Materiale di origine	Plasma EDTA			
			Lotto 1	Lotto 2	Lotto 3	Tutti i lotti
			DS	DS	DS	DS in pool
1,00E+07	8,67E+06	Virus coltivato	0,04	0,05	0,04	0,04
1,00E+06	8,67E+05	Virus coltivato	0,07	0,05	0,05	0,06
1,00E+05	8,67E+04	Virus coltivato	0,07	0,07	0,06	0,07
1,00E+04	8,67E+03	Virus coltivato	0,08	0,08	0,06	0,08
1,00E+03	8,67E+02	Virus coltivato	0,12	0,12	0,08	0,11
4,00E+02	3,47E+02	Virus coltivato	0,11	0,13	0,09	0,11
2,00E+02	1,73E+02	Virus coltivato	0,20	0,12	0,15	0,16

* I dati dei titoli sono considerati come distribuiti secondo una curva log-normale e sono analizzati secondo la trasformazione log_{10}. Le colonne DS (Deviazione Standard) indicano il totale del titolo dopo la trasformazione log per ognuno dei tre lotti di reagenti.

Verifica del sottotipo

Le prestazioni del test **cobas**® HIV-1 sono state verificate con riferimento all'HIV-1 gruppo M e relativi sottotipi, gruppo O e gruppo N:

- Verifica del limite di sensibilità per il gruppo M e relativi sottotipi, il gruppo O e il gruppo N
- Verifica della linearità per il gruppo M e relativi sottotipi, il gruppo O e il gruppo N
- Assegnazione del titolo con il test **cobas**® HIV-1.

Verifica del limite di sensibilità per i sottotipi del gruppo M, per il gruppo O e per il gruppo N

I campioni coltivati di HIV-1 per HIV-1 gruppo M (A, C, D, F, G, H, CRF01_AE, CRF02_AG), HIV-1 gruppo O e HIV-1 gruppo N sono stati diluiti in plasma EDTA fino a tre diversi livelli di concentrazione. Il calcolo del tasso di successo è stato effettuato con 63 ripetizioni per ogni livello. I test sono stati eseguiti con 1 lotto di reagenti **cobas**® HIV-1. I risultati ottenuti dal plasma EDTA per un volume di analisi di 500 µl sono illustrati nella Tabella 20. Questi risultati dimostrano che il test **cobas**® HIV-1 ha rilevato l'HIV per HIV-1 gruppo M (A, C, D, F, G, H, CRF01_AE, CRF02_AG), HIV-1 gruppo O e HIV-1 gruppo N alla concentrazione dichiarata di 20 cp/ml, o a concentrazioni inferiori, con un limite superiore dell'intervallo di confidenza al 95% unilaterale che è uguale o maggiore del tasso di successo atteso del 95%.

Tabella 20 Verifica del limite di sensibilità per il gruppo HIV-1 M e relativi sottotipi, per il gruppo O e per il gruppo N in 500 µl di plasma EDTA

		10 cp/ml			20 cp/ml			40 cp/ml		
Gruppo	**Sottotipo**	**N. di repliche valide**	**N. di positivi**	**Tasso di successo % (IC 95%*)**	**N. di repliche valide**	**N. di positivi**	**Tasso di successo % (IC 95%*)**	**N. di repliche valide**	**N. di positivi**	**Tasso di successo % (IC 95%*)**
M	A	63	59	93,7% (97,8%)	63	63	100% (100%)	63	63	100% (100%)
	C	63	51	81,0% (88,6%)	63	61	96,8% (99,4%)	63	63	100% (100%)
	D	63	48	76,2% (84,7%)	62	60	96,8% (99,4%)	63	63	100% (100%)
	F	63	59	93,7% (97,8%)	63	63	100% (100%)	63	63	100% (100%)
	G	63	54	85,7% (92,3%)	63	63	100% (100%)	63	63	100% (100%)
	H	63	52	82,5% (89,9%)	63	63	100% (100%)	63	63	100% (100%)
	CRF01_AE	63	52	82,5% (89,9%)	63	62	98,4% (99,9%)	63	63	100% (100%)
	CRF02_AG	63	56	88,9% (94,7%)	63	62	98,4% (99,9%)	63	63	100% (100%)
O		63	49	77,8% (86,0%)	63	57	90,5% (95,8%)	63	63	100% (100%)
N		63	57	90,5% (95,8%)	63	63	100% (100%)	63	63	100% (100%)

* Limite superiore dell'intervallo di confidenza al 95% unilaterale

La verifica del limite di sensibilità per i 10 sottotipi analizzati con un volume iniziale di 200 µl si è svolta in modo analogo. I dati sono illustrati nella Tabella 21. Questi risultati dimostrano che il test **cobas**® HIV-1 ha rilevato l'RNA di HIV per HIV-1 M (A, C, D, F, G, H, CRF01_AE, CRF02_AG) e HIV-1 N alla concentrazione dichiarata di 50 cp/ml, o a concentrazioni inferiori, con un limite superiore dell'intervallo di confidenza al 95% unilaterale che è uguale o maggiore del tasso di successo atteso del 95%. Il gruppo HIV-1 O è stato verificato a 100 cp/ml.

Tabella 21 Verifica del limite di sensibilità per il gruppo HIV-1 M e relativi sottotipi, per il gruppo O e per il gruppo N in 200 µl di plasma EDTA

		25 cp/ml			50 cp/ml			100 cp/ml		
Gruppo	**Sottotipo**	**N. di repliche valide**	**N. di positivi**	**Tasso di successo % (IC 95%*)**	**N. di repliche valide**	**N. di positivi**	**Tasso di successo % (IC 95%*)**	**N. di repliche valide**	**N. di positivi**	**Tasso di successo % (IC 95%*)**
M	A	63	54	85,7% (92,3%)	63	60	95,2% (98,7%)	63	63	100% (100%)
	C	63	50	79,4% (87,3%)	63	62	98,4% (99,9%)	63	63	100% (100%)
	D	63	51	81,0% (88,6%)	63	63	100% (100%)	63	63	100% (100%)
	F	63	56	88,9% (94,7%)	63	62	98,4% (99,9%)	63	63	100% (100%)
	G	63	52	82,5% (89,9%)	63	62	98,4% (99,9%)	63	63	100% (100%)
	H	63	61	96,8% (99,4%)	63	63	100% (100%)	63	63	100% (100%)
	CRF01_AE	63	53	84,1% (91,1%)	63	57	90,5% (95,8%)	63	63	100% (100%)
	CRF02_AG	63	49	77,8% (86,0%)	63	63	100% (100%)	63	63	100% (100%)
O		63	44	69,8% (79,3%)	63	56	88,9% (94,7%)	63	63	100% (100%)
N		63	55	87,3% (93,5%)	63	63	100% (100%)	63	63	100% (100%)

* Limite superiore dell'intervallo di confidenza al 95% unilaterale

Verifica dell'intervallo lineare per il gruppo M e relativi sottotipi, per il gruppo O e per il gruppo N

La serie di diluizioni utilizzata per la verifica dello studio del test **cobas**® HIV-1 relativamente alla linearità dei sottotipi è costituita da un pannello di sette membri (volume di analisi del campione: 500 µl) e da un pannello di sei membri (volume di analisi del campione: 200 µl) che coprono l'intero intervallo lineare. I membri del pannello sono stati preparati con RNA di HIV-1, del rispettivo sottotipo, ottenuto da campioni ad alto titolo di positività da sopranatante di coltura cellulare. I test sono stati eseguiti con due lotti di reagenti **cobas**® HIV-1 e sono state eseguite 14 ripetizioni per ogni livello su plasma EDTA.

L'intervallo lineare del test **cobas**® HIV-1 è stato verificato per i sottotipi del gruppo M, per il gruppo O e per il gruppo N. La deviazione massima tra le regressione lineare e la regressione nonlineare di migliore adattamento è risultata essere uguale a o minore di 0,2 $\log_{10}$.

Specificità

La specificità del test **cobas**® HIV-1 è stata determinata analizzando campioni di plasma EDTA HIV-negativo ottenuti da singoli donatori. Sono stati analizzati 600 campioni individuali di plasma EDTA, utilizzando due lotti di reagenti **cobas**® HIV-1. Tutti i campioni analizzati sono risultati negativi per l'RNA di HIV-1. Nel pannello di analisi, la specificità del test **cobas**® HIV-1 è stata del 100% (limite di confidenza al 95%: ≥ 99,5%).

Specificità analitica

La specificità analitica del test **cobas**® HIV-1 è stata valutata diluendo un pannello di microrganismi in plasma EDTA, sia positivo per l'RNA di HIV, sia negativo per l'RNA di HIV. I microrganismi sono stati aggiunti al plasma umano EDTA negativo e sono stati analizzati sia con RNA di HIV che senza. Nessuno dei patogeni non HIV ha interferito con le prestazioni del test. Il test **cobas**® HIV-1 ha prodotto risultati negativi per tutti i campioni di microrganismi in cui era assente il target HIV-1, mentre ha prodotto risultati positivi per tutti i campioni di microrganismi in cui era presente il target HIV-1. Per ognuno dei campioni HIV-1-positivi contenenti organismi che possono causare potenziali reazioni crociate, il titolo medio espresso in $\log_{10}$ era entro ±0,3 $\log_{10}$ del titolo medio espresso in $\log_{10}$ del rispettivo controllo spike positivo.

Tabella 22 Microrganismi analizzati ai fini della reattività crociata

Virus		Batteri	Lieviti
Adenovirus tipo 5	Virus Varicella-Zoster	*Propionibacterium acnes*	*Candida albicans*
Citomegalovirus	Virus del Nilo Occidentale	*Staphylococcus aureus*	
Virus di Epstein Barr	Virus dell'encefalite di St. Louis		
Virus dell'epatite A	Virus dell'encefalite della Murray Valley		
Virus dell'epatite B	Virus della Dengue tipi 1, 2, 3 e 4		
Virus dell'epatite C	Virus FSME (ceppo HYPR)		
Virus dell'epatite D	Virus dell'influenza A		
Virus linfotropico delle cellule T umane tipo 1 e 2	Virus Zika		
Virus dell'herpes umano tipo 6	Papillomavirus umano		
Virus dell'herpes simplex tipo 1 e 2	Virus della febbre gialla		

Specificità analitica e sostanze interferenti

Sono stati analizzati campioni con livelli elevati di trigliceridi (fino a 34,5 g/l), bilirubina coniugata (0,25 g/l), bilirubina non coniugata (0,25 g/l), albumina (58,7 g/l), emoglobina (2,9 g/l) e DNA umano (2 mg/l), nonché campioni di soggetti con malattie autoimmuni quali il lupus eritematoso sistemico (LES), l'artrite reumatoide (AR) e gli anticorpi antinucleo (ANA), sia con RNA di HIV che senza.

Inoltre sono stati analizzati i composti farmacologici elencati nella Tabella 23, ad una concentrazione pari a tre volte il valore C_{max} sia con RNA di HIV che senza.

Nessuna delle sostanze potenzialmente interferenti ha interferito con le prestazioni del test. Il test **cobas**® HIV-1 ha prodotto risultati negativi per tutti i campioni in cui era assente il target HIV, mentre ha prodotto risultati positivi per tutti i campioni in cui era presente il target HIV-1. Per ognuno dei campioni HIV-1-positivi contenenti sostanze potenzialmente interferenti, il titolo medio espresso in log_{10} era entro ±0,3 log_{10} del titolo medio espresso in log_{10} del rispettivo controllo spike positivo.

Tabella 23 Composti farmacologici analizzati per verificare l'interferenza con la quantificazione dell'RNA di HIV da parte del test **cobas**® HIV-1

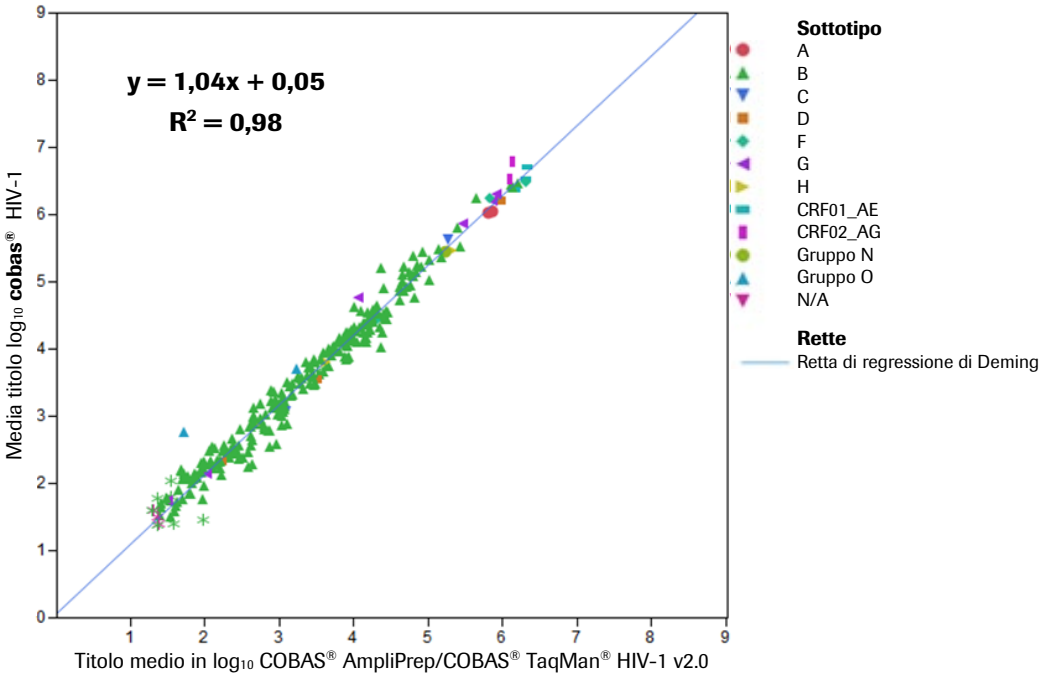
Categoria farmacologica	**Nome generico del farmaco**	
Immunomodulatori	Peginterferone α-2a	Peginterferone α-2b
	Ribavirina	
Inibitori d'ingresso dell'HIV	Maraviroc	
Inibitori dell'integrasi dell'HIV	Elvitegravir/Cobicistat	Raltegravir
Inibitori non nucleosidici della trascrittasi inversa dell'HIV	Efavirenz	Nevirapina
	Etravirina	Rilpivirina
Inibitori della proteasi per HIV	Atazanavir	Lopinavir
	Tipranavir	Nelfinavir
	Darunavir	Ritonavir
	Fosamprenavir	Saquinavir
Inibitori della proteasi dell'HCV	Boceprevir	Telaprevir
	Simeprevir	
Inibitori della trascrittasi inversa o della DNA polimerasi	Abacavir	Tenofovir
	Emtricitabina	Adefovir dipivoxil
	Entecavir	Telbivudina
	Foscarnet	Zidovudina
	Cidofovir	Aciclovir
	Lamivudina	Valganciclovir
	Ganciclovir	Sofosbuvir
Composti per il trattamento delle infezioni opportunistiche	Azitromicina Claritromicina Etambutolo Fluconazolo Isoniazide	Pirazinamide Rifabutina Rifampicina Sulfametossazole Trimetoprima

Metodo di correlazione - confronto delle prestazioni con il test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 v2.0

Le prestazioni del test **cobas**® HIV-1 sono state confrontate con le prestazioni del test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 v2.0 (TaqMan® HIV-1 v2.0) analizzando 251 campioni di plasma EDTA, ottenuti da pazienti con infezione da HIV-1, e 16 sopranatanti da coltura cellulare diluiti. I campioni, che includevano HIV-1 M (A-D, F-H, CRF01_AE, CRF02_AG), HIV-1 O e HIV-1 N, sono stati analizzati in duplicato presso un laboratorio esterno. Cinque campioni hanno generato titoli al di sotto dell'intervallo di quantificazione (< 20 cp/ml) per una delle due ripetizioni sul sistema COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® e sui **cobas**® 6800/8800 Systems; altri cinque campioni soltanto sul sistema COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®. Un campione ha generato un'unica aliquota valida sul sistema COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®. I titoli al di sotto dell'intervallo di quantificazione sono stati esclusi dall'analisi. È stata applicata la regressione di Deming tenendo in considerazione i titoli dopo la trasformazione logaritmica. Nel caso dei campioni per i quali entrambe le ripetizioni rientravano nell'intervallo di quantificazione, ai fini dell'analisi è stato utilizzato il titolo medio espresso in $\log_{10}$.

I risultati della regressione di Deming sono riportati nella Figura 18. Il simbolo ✳ nella Figura 18 mostra la singola misura.

Figura 18 Analisi di regressione dei campioni di plasma EDTA sottoposti al test **cobas**® HIV-1 vs il test TaqMan® HIV-1 v2.0



Tasso globale d'errore del sistema

Il tasso globale d'errore del sistema per il test **cobas**® HIV-1 è stato calcolato ripetendo 100 test sui campioni di plasma EDTA arricchiti con il target HIV-1, gruppo M, sottotipo B. I campioni sono stati analizzati a una concentrazione del target 3 × LoD.

Dai risultati di questo studio si evince che tutte le ripetizioni dei test hanno prodotto risultati validi e positivi per il target HIV-1, per un tasso globale d'errore del sistema pari allo 0%. L'intervallo di confidenza esatto al 95% bilaterale è pari allo 0% per il limite inferiore e al 3,6% per il limite superiore [0%: 3,6%].

Contaminazione crociata

Per quanto riguarda il test **cobas**® HIV-1, il tasso di contaminazione crociata è stato calcolato ripetendo 240 test su un campione di plasma umano normale EDTA HIV-negativo e ripetendo 225 test su un campione ad alto titolo di positività per HIV-1 a 4,00E+06 cp/ml. Lo studio è stato eseguito con il **cobas**® 6800 System. Complessivamente sono state eseguite cinque sedute con campioni positivi e negativi in una configurazione a scacchiera.

Tutte le 240 ripetizioni del campione negativo sono risultate negative, per un tasso di contaminazione crociata pari allo 0%. L'intervallo di confidenza esatto al 95% bilaterale è pari allo 0% per il limite inferiore e al 1,5% per il limite superiore [0%: 1,5%].

Caratteristiche delle prestazioni con i campioni PSC

Limite di sensibilità (LoD) per i campioni PSC

Il limite di sensibilità del test **cobas**® HIV-1 con il plasma PSC è stato determinato analizzando i titoli di plasma assegnati alle diluizioni seriali del sopranatante da coltura cellulare di HIV-1, gruppo M, in sangue intero umano HIV-negativo. I pannelli, costituiti da cinque livelli di concentrazione più un campione negativo, sono stati analizzati con tre lotti di campioni PSC e tre lotti di reagenti del test **cobas**® HIV-1 in più sedute, in più giorni, da più operatori e su più strumenti. I campioni del membro del pannello più alto sono stati centrifugati e al plasma è stato assegnato un titolo in base al metodo di bracketing del calibratore (Calibrator Bracketing Method, CBM) utilizzando il test **cobas**® HIV-1 con il 3º standard internazionale dell'OMS per l'HIV-1, HIV-1 gruppo M, sottotipo B, per la preparazione del calibratore alto e del calibratore basso.

Nella Tabella 24 sono indicati i risultati combinati ottenuti dai tre lotti di campioni PSC, dai campioni di donatori negativi e dalla serie di diluizioni con assegnazioni singole del titolo di plasma (CBM). Lo studio dimostra che il test **cobas**® HIV-1 usato con i campioni PSC rileva l'RNA di HIV-1 a una concentrazione di 790,2 cp/ml, con un tasso di successo del 95% in base all'analisi Probit.

Tabella 24 Limite di sensibilità per i campioni PSC

Concentrazione del titolo del plasma (RNA di HIV-1 espresso in cp/ml)	N. di repliche valide	N. di positivi	Tasso di successo %
1971,1	62	62	100,00
1925,3	63	63	100,00
1358,1	62	62	100,00
985,5	63	62	98,41
962,6	63	62	98,41
679	63	59	93,65
657	63	59	93,65
641,8	63	57	90,48
452,7	63	52	82,54
328,5	63	47	74,60
320,9	63	46	73,02
226,3	62	49	79,03
164,3	63	36	57,14
160,4	63	35	55,56
113,2	63	38	60,32
0	189	0	0,00
LoD tramite analisi PROBIT con tasso di successo al 95%	790,2 cp/ml; intervallo di confidenza al 95%: 658,9-1003,6 cp/ml 1317 UI/ml; intervallo di confidenza al 95%: 1098,2-1672,7 UI/ml		

Stima del LoD nel sangue intero

I titoli corrispondenti nel sangue intero dello stesso campione non possono essere determinati con esattezza, in quanto il sangue intero non è un tipo di campione idoneo ai test della carica virale. Per stimare il LoD non sono stati utilizzati i titoli del sangue intero basati sulla quantità di RNA di HIV-1 aggiunto ai campioni di sangue intero, poiché la quantità di RNA aggiunto non corrisponde necessariamente alla quantità di RNA presente nel plasma. Anche dopo la centrifugazione, l'RNA potrebbe restare intrappolato nel buffy-coat oppure essere associato con la frazione cellulare del sangue intero. Altre tecnologie, tuttavia, come gli spot di sangue essiccato, utilizzano i titoli del sangue intero arricchito per effettuare una stima del limite di sensibilità con il sangue intero. Con i campioni PSC, ad esempio, è possibile stimare il limite di sensibilità (LoD) con il sangue intero sulla base di un fattore empirico che si presume sia correlato al contenuto medio di ematocrito (45%) dei campioni (Tabella 25).

I valori LoD con il sangue intero sono dunque stime basate sul seguente presupposto:

Stima LoD sangue intero = LoD plasma PSC ÷ 1,8

Tabella 25 Stima LoD sangue intero

LoD in base all'analisi PROBIT (tasso di successo 95%)	439,0 cp/ml
Intervallo di confidenza al 95%	366,1-557,6 cp/ml

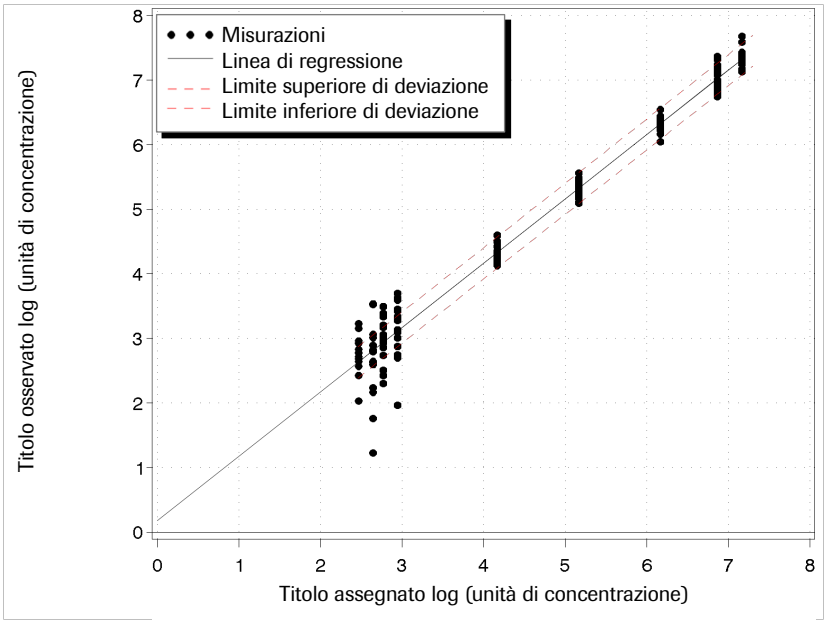
Intervallo lineare con i campioni PSC

Lo studio sulla linearità del test **cobas**® HIV-1 con i campioni PSC è stato eseguito con una serie di diluizioni costituita da un pannello di 9 membri che coprivano l'intero intervallo lineare per l'HIV-1 gruppo M, sottotipo B predominante. I membri del pannello sono stati preparati a partire da un campione di sopranatante da coltura cellulare positiva con alto titolo di RNA di HIV-1. Per la valutazione sono state seguite le linee guida CLSI EP06-A.[20] Sono stati utilizzati due lotti di campioni PSC e due lotti di reagenti su due **cobas**® 6800/8800 Systems da tre operatori, per un totale di 20 ripetizioni per ogni membro del pannello e reagente/lotto PSC.

I campioni di un membro del pannello sono stati centrifugati e al plasma è stato assegnato un titolo in base al metodo di bracketing del calibratore (Calibrator Bracketing Method, CBM) utilizzando il test **cobas**® HIV-1 con il 3º standard internazionale dell'OMS per l'HIV-1, HIV-1 gruppo M, sottotipo B, per la preparazione del calibratore alto e del calibratore basso.

Con i campioni PSC, il test **cobas**® HIV-1 è lineare tra 790 cp/ml e 1,00E+07 cp/ml e mostra una deviazione assoluta dalla regressione nonlineare di migliore adattamento inferiore a ±0,24 $\log_{10}$ con i campioni PSC (vedere Figura 19). Sull'intero intervallo lineare, l'accuratezza del test si è mantenuta entro ±0,3 $\log_{10}$ di deviazione dal migliore adattamento lineare.

Figura 19 Determinazione dell'intervallo lineare per i campioni PSC



Precisione intra-laboratorio con i campioni PSC

La precisione del test **cobas**® HIV-1 con i campioni PSC è stata determinata analizzando le diluizioni seriali di un campione di HIV-1 positivo alto (campione di sopranatante da coltura cellulare positivo per l'RNA di HIV-1 ad alto titolo) in sangue intero con EDTA HIV-negativo. Sono stati analizzati cinque livelli di diluizione con 48 ripetizioni per ogni livello e volume di analisi del campione, utilizzando due lotti di campioni PSC e due lotti di reagenti del test **cobas**® HIV-1, due strumenti e due operatori nell'arco di 12 giorni. Ogni campione è stato sottoposto all'intero flusso di lavoro per campioni PSC e alla procedura del test **cobas**® HIV-1, che è completamente automatizzata sui **cobas**® 6800/8800 Systems. I risultati della precisione qui indicata rappresentano dunque tutti gli aspetti della procedura del test. I risultati sono illustrati nella Tabella 26.

Il test **cobas**® HIV-1 con i campioni PSC ha dimostrato un'elevata precisione per i due lotti di campioni PSC e di reagenti analizzati in un intervallo di concentrazioni compreso tra 2,00E+03 cp/ml e 1,00E+07 cp/ml.

Tabella 26 Precisione intra-laboratorio per il test **cobas**® HIV-1 con i campioni PSC

Concentrazione misurata (cp/ml in plasma EDTA centrifugato)	Materiale di origine	DS in pool
1,02E+07	Coltura cellulare	0,08
9,12E+05	Coltura cellulare	0,08
8,32E+04	Coltura cellulare	0,09
7,94E+03	Coltura cellulare	0,13
2,00E+03	Coltura cellulare	0,23

Verifica del sottotipo con i campioni PSC

Benché il sottotipo di HIV non dovrebbe influenzare le prestazioni della procedura PSC, i campioni di HIV-1 coltivati per i sottotipi più comuni di HIV-1M (A, C e D) sono stati diluiti a un unico livello di concentrazione nel sangue intero. La precisione e l'accuratezza sono state calcolate eseguendo 12 repliche per ogni campione. I test sono stati eseguiti con 1 lotto di campioni PSC e 1 lotto di reagenti **cobas**® HIV-1.

I campioni di ciascun campione di sangue intero sono stati centrifugati e al plasma è stato assegnato un titolo in base al metodo di bracketing del calibratore (*Calibrator Bracketing Method*, CBM) utilizzando il test **cobas**® HIV-1 con il 3º standard internazionale dell'OMS per l'HIV-1, HIV-1 gruppo M, sottotipo B, per la preparazione del calibratore alto e del calibratore basso.

I risultati sono illustrati nella Tabella 27. I risultati confermano che il test **cobas**® HIV-1 eseguito sui campioni PSC rileva e quantifica in maniera corretta i sottotipi A, C e D dell'HIV-1 gruppo M.

Tabella 27 Verifica dei sottotipi A, C e D dell'HIV-1 gruppo M

Sottotipo di HIV-1 M	N. di repliche valide	Accuratezza	Precisione	Equivalenza Plasma – Plasma PSC
Sottotipo A	12	-0,13	0,14	-0,20
Sottotipo C	12	-0,08	0,12	-0,10
Sottotipo D	12	-0,04	0,11	-0,10

Specificità con i campioni PSC

La specificità del test **cobas**® HIV-1 con i campioni PSC è stata determinata analizzando campioni di sangue intero con EDTA HIV-negativo ottenuti da singoli donatori. In totale sono stati analizzati 159 campioni di sangue intero con EDTA utilizzando due lotti di PSC e due lotti di reagenti **cobas**® HIV-1. Tutti i campioni analizzati sono risultati negativi per l'RNA di HIV-1. Nel pannello di analisi, la specificità del test **cobas**® HIV-1 è stata del 100% (limite di confidenza al 95%: ≥ 98,13%).

Tasso globale d'errore del sistema con i campioni PSC

Per quanto riguarda il test **cobas**® HIV-1 in associazione con i campioni PSC, il tasso globale d'errore del sistema è stato calcolato ripetendo 100 test sui campioni di sangue intero con EDTA arricchiti con HIV-1, gruppo M, sottotipo B. I campioni sono stati analizzati a una concentrazione del target pari a circa 3 × LoD.

Dai risultati di questo studio si evince che tutte le ripetizioni dei test hanno prodotto risultati validi e positivi per il target HIV-1, per un tasso globale d'errore del sistema pari allo 0%.

Prestazioni dei campioni PSC rispetto ai campioni di plasma

Le prestazioni dei campioni PSC sono state confrontate con quelle dei campioni di plasma EDTA centrifugati, analizzando 132 campioni ottenuti da pazienti infetti da HIV-1 (FP = raccolta prospettica, VL = test della carica virale, CD = campioni rimanenti dopo la conta dei CD4). I campioni sono stati analizzati una volta ciascuno (spot di plasma essiccati su cartoncino PSC e plasma EDTA) presso un laboratorio esterno. I titoli al di sotto dell'intervallo di quantificazione sono stati esclusi dall'analisi. È stata applicata la regressione di Deming tenendo in considerazione i titoli dopo la trasformazione logaritmica.

I risultati della regressione di Deming sono riportati nella Figura 20. I simboli ✳ e ● nella Figura 20 mostrano le singole misurazioni.

Figura 20 Regressione di Deming

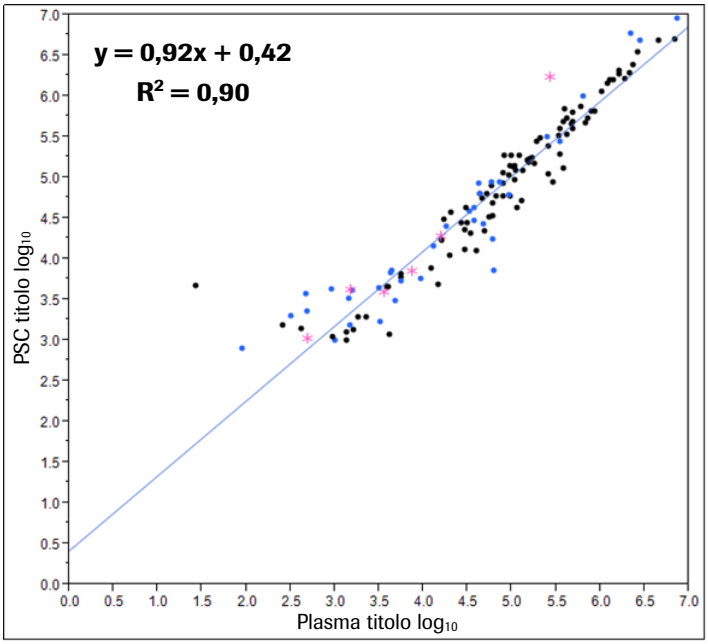


Tabella 28 Riepilogo dei dati statistici

Equivalenza matrice (tipo di plasma)	N. di campioni con titolo valido	Analisi di Bland-Altman		Analisi di regressione di Deming		
		Differenza media in log_{10}	IC 95% [inf/sup]	Pendenza	Intercetta	R quadro
PSC - plasma liquido	132	0,05	[-0,01; 0,11]	0,92	0,42	0,90

Valutazione delle prestazioni cliniche

Riproducibilità

La riproducibilità di **cobas**® HIV-1 è stata valutata nel plasma EDTA utilizzando un volume di analisi del campione di 500 µl su **cobas**® 6800 System. Lo studio è stato condotto utilizzando pannelli costituiti da stock di virus in coltura di HIV-1 gruppo M sottotipo B e da plasma EDTA negativo per l'RNA di HIV-1 e per gli anticorpi anti-HIV-1/2. Il pannello a 8 membri includeva un membro negativo e 7 membri positivi che coprivano il range lineare di **cobas**® HIV-1 nonché i punti chiave per le decisioni mediche riguardanti l'uso previsto, sostenuto nelle linee guida del 2015 del Department of Health and Human Services relative all'uso di agenti antiretrovirali in adulti e adolescenti con infezione da HIV-1.[3] L'analisi è stata eseguita con tre lotti di reagente, in tre sedi, da due operatori per sede, due sedute al giorno, 6 giorni di analisi per lotto di reagente e tre repliche per seduta. La riproducibilità è stata valutata mediante un modello a componenti di varianza che comprendeva lotto, sede, operatore, giorno, seduta e analisi nella stessa seduta. Tabella 29 mostra la varianza totale, le SD della precisione totale e i CV log-normali per **cobas**® HIV-1 come determinato dall'analisi della varianza. L'elemento "nella stessa seduta" (*within-run*) ha contribuito maggiormente alla variabilità rispetto alla maggior parte dei membri del pannello.

Tabella 29 Percentuale attribuibile a varianza totale, deviazione standard della precisione totale e CV log-normale della quantificazione dell'RNA di HIV mediante il membro del pannello positivo su **cobas**® 6800 System (riproducibilità)

Concentrazione RNA di HIV (log_{10} copie/ml)			**Percentuale di varianza totale (CV (%))**						
Atteso	**Media[a] (SD)[b]**	**N. di test[c]**	**Lotto**	**Sito**	**Operatore**	**Giorno**	**Seduta**	**Stessa seduta**	**Varianza totale CV (%)[d]**
1,70	1,69 (0,191)	323	17% (18,23)	0% (0,00)	0% (0,00)	1% (3,42)	5% (9,66)	78% (40,32)	46,25
2,30	2,22 (0,116)	321	32% (15,15)	0% (0,00)	1% (2,26)	4% (5,60)	0% (0,00)	63% (21,55)	27,27
2,60	2,48 (0,102)	323	34% (13,84)	4% (4,85)	3% (3,75)	0% (0,00)	1% (2,74)	58% (17,99)	23,86
3,00	2,84 (0,092)	324	39% (13,30)	0% (0,00)	1% (2,01)	0% (0,00)	7% (5,67)	52% (15,37)	21,33
4,00	3,86 (0,081)	324	43% (12,33)	1% (1,94)	3% (3,34)	10% (5,82)	6% (4,54)	37% (11,39)	18,85
5,00	4,92 (0,084)	324	43% (12,64)	0% (0,00)	3% (3,56)	6% (4,65)	6% (4,52)	42% (12,60)	19,44
6,70	6,63 (0,087)	324	45% (13,60)	0% (0,00)	2% (3,00)	3% (3,42)	0% (0,00)	50% (14,23)	20,32

Nota: questa tabella comprende solo i risultati con una carica virale rilevabile.

[a] Calcolata mediante la procedura SAS MISTA basata su misurazioni trasformate in log_{10}.

[b] Calcolata in base alla variabilità totale dalle procedure SAS MISTE basate su misurazioni trasformate log_{10}.

[c] Numero di test validi con carica virale rilevabile.

[d] Modello log-normale utilizzato per CV (%) = sqrt(10^[SD^2 × ln(10)] - 1) × 100.

CV (%) = percentuale del coefficiente di variazione; HIV = virus dell'immunodeficienza umana; N. = numero; RNA = acido ribonucleico; SD = deviazione standard; sqrt = radice quadrata.

Nella Tabella 30 riportata di seguito, la concordanza percentuale negativa (NPA) di **cobas**® 6800 System con tutti i test validi dei membri del pannello negativi era del 100%.

Tabella 30 Concordanza percentuale negativa con membro del pannello negativo

Concentrazione attesa di RNA di HIV	N. di test	Risultati positivi	Risultati negativi	Concordanza percentuale negativa[a]	IC 95%[b]
Negativo	322	0	322	100,00	(98,86, 100,00)

[a] NPA = (numero di risultati negativi ÷ numero totale di test validi nel membro del pannello negativo) × 100.

[b] Calcolato mediante il metodo dell'intervallo di confidenza binomiale esatto Clopper-Pearson.

IC = intervallo di confidenza; HIV = virus dell'immunodeficienza umana; N. = numero; NPA = concordanza percentuale negativa; RNA = acido ribonucleico.

Validazione della quantificazione della carica virale

Le prestazioni di **cobas**® HIV-1 su **cobas**® 6800 System sono state confrontate con le prestazioni del test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 v2.0 (TaqMan® HIV-1, v2.0) approvato dalla FDA mediante l'analisi di campioni di plasma EDTA a coppia prelevati da 410 soggetti con cariche virali di HIV-1 comprese nel range lineare di entrambi i test. Le caratteristiche demografiche dei soggetti sono riportate nella Tabella 31.

Tabella 31 Riepilogo delle caratteristiche demografiche

Caratteristiche demografiche	Statistiche
	(N = 410)
Età (anni)	
Media (SD)	41,8 (11)
Mediana	43
Intervallo	19-72
Sesso, n (%)	
Maschio	321 (78,3%)
Femmina	89 (21,7%)
Razza, n (%)	
Asiatico	5 (1,2%)
Nera	163 (39,8%)
Ispanica	17 (4,1%)
Bianca	94 (22,9%)
Altra	91 (22,2%)
Sconosciuto	40 (9,8%)
Etnia, n (%)	
Ispanica	101 (24,6%)
Non ispanica	231 (56,3%)
Sconosciuto	78 (19,0%)
Farmaco antivirale, n (%)	
Sì	208 (50,7%)
No	137 (33,4%)
Sconosciuto	65 (15,9%)
Conteggio cellule CD4 (celle/µl), n (%)	
N	391
Media (SD)	438,1 (267,7)
Mediana	401
Intervallo	0-1548

SD = deviazione standard.

Dei 410 campioni a coppie analizzati, 305 campioni a coppie hanno evidenziato misurazioni della carica virale entro l'intervallo lineare di entrambi i saggi. Tabella 32 mostra la differenza media a coppie della carica virale tra il test **cobas**® HIV-1 e il test TaqMan® HIV-1 v2.0.

Tabella 32 Differenza media a coppie della carica virale tra il test **cobas**® HIV-1 e il test TaqMan® HIV-1 v2.0

Numero di campioni a coppie	Differenza media a coppie (log_{10} copie/ml)	Errore standard della differenza media a coppie	IC 95% per la differenza media a coppie
305	0,112	0,013	(0,086, 0,137)

IC = intervallo di confidenza.

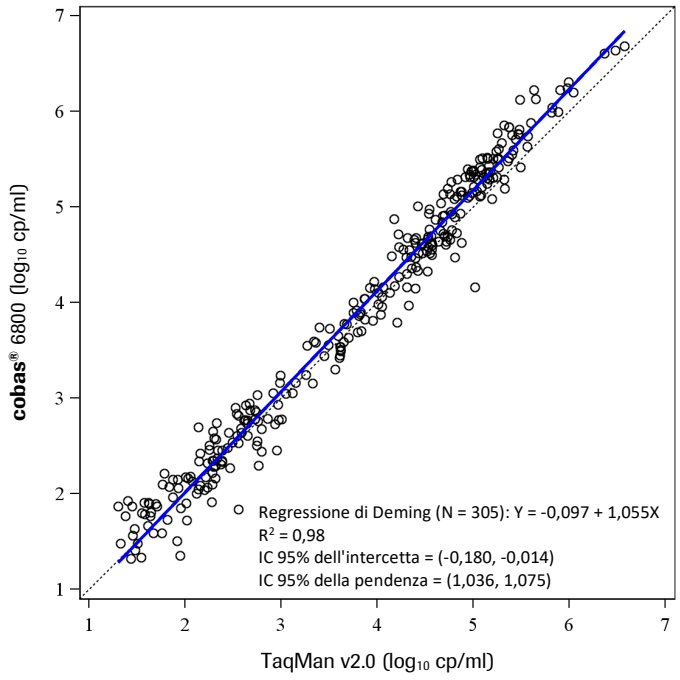
I risultati dell'analisi di regressione di Deming tra il test **cobas**® HIV-1 e il test TaqMan® HIV-1 v2.0 sono riportati nella Tabella 33 e mostrati graficamente nella Figura 21. La linea tratteggiata indica la concordanza perfetta tra due metodi di analisi.

Tabella 33 Stima dei parametri dell'analisi di regressione di Deming tra il test **cobas**® HIV-1 su **cobas**® 6800 System e il test TaqMan® HIV-1 v2.0

Numero di campioni a coppie = 305				
Parametro	**Stima parametro (log_{10} copie/ml)**	**Errore standard**	**IC 95%**	**R^2**
Intercetta	-0,097	0,042	(-0,180, -0,014)	0,98
Pendenza	1,055	0,010	(1,036, 1,075)	

IC = intervallo di confidenza.

Figura 21 Analisi della regressione di Deming tra il test **cobas**® HIV-1 su **cobas**® 6800 System e il test TaqMan® HIV-1 v2.0



Sono stati analizzati anche i sottoinsiemi dei campioni a coppie per confrontare i risultati di **cobas**® HIV-1 mediante volumi di analisi del campione di 200 µl e 500 µl sia su **cobas**® 6800 System che su **cobas**® 8800 System. Tutti i confronti hanno mostrato una differenza media a coppie inferiore a 0,095 log_{10} copie/ml.

Per il confronto tra volumi di campioni, la Tabella 34 mostra la differenza media a coppie tra i risultati di **cobas**® HIV-1 ottenuti con i volume di analisi del campione di 200 µl e 500 µl su **cobas**® 6800 System.

Tabella 34 Differenza media a coppie della carica virale tra i volumi di analisi del campione di 200 µl e 500 µl su **cobas**® 6800 System

Numero di campioni a coppie	Differenza media a coppie (log_{10} copie/ml)	Errore standard della differenza media a coppie	IC 95% per la differenza media a coppie
111	0,094	0,014	(0,067, 0,121)

IC = intervallo di confidenza.

Tabella 35 mostra la differenza media a coppie tra i risultati di **cobas**® HIV-1 ottenuti con volume di analisi del campione di 200 µl e 500 µl su **cobas**® 8800 System.

Tabella 35 Differenza media a coppie della carica virale tra i volumi di analisi del campione di 200 µl e 500 µl su **cobas**® 8800 System

Numero di campioni a coppie	Differenza media a coppie (log_{10} copie/ml)	Errore standard della differenza media a coppie	IC 95% per la differenza media a coppie
111	0,080	0,012	(0,056, 0,105)

IC = intervallo di confidenza.

Per il confronto tra sistemi, la Tabella 36 mostra la differenza media a coppie tra i risultati di **cobas**® HIV-1 su **cobas**® 6800 System e su **cobas**® 8800 System ottenuti con il volume di analisi del campione di 200 µl.

Tabella 36 Differenza media a coppie della carica virale tra **cobas**® 6800 System e **cobas**® 8800 System utilizzando il volume di analisi del campione di 200 µl

Numero di campioni a coppie	Differenza media a coppie (log_{10} copie/ml)	Errore standard della differenza media a coppie	IC 95% per la differenza media a coppie
109	0,011	0,013	(-0,014, 0,036)

IC = intervallo di confidenza.

Tabella 37 mostra la differenza media a coppie tra i risultati di **cobas**® HIV-1 su **cobas**® 6800 System e su **cobas**® 8800 System ottenuti con il volume di analisi del campione di 500 µl.

Tabella 37 Differenza media a coppie della carica virale tra **cobas**® 6800 System e **cobas**® 8800 System utilizzando il volume di analisi del campione di 500 µl

Numero di campioni a coppie	Differenza media a coppie (log_{10} copie/ml)	Errore standard della differenza media a coppie	IC 95% per la differenza media a coppie
123	-0,001	0,012	(-0,024, 0,022)

IC = intervallo di confidenza.

Un sottoinsieme di campioni a coppie compreso nel range lineare del saggio è stato analizzato per confrontare i risultati di **cobas**® HIV-1 da provette BD Vacutainer® PPT™ per la preparazione del plasma destinate ai metodi di analisi diagnostica molecolare e provette di plasma EDTA senza gel separatore. Questo confronto è stato effettuato utilizzando **cobas**® 6800 System. I risultati sono illustrati nella Tabella 38.

Tabella 38 Differenza media a coppie della carica virale tra le provette di preparazione del plasma BD Vacutainer® PPT™ e le provette per plasma EDTA

Numero di campioni a coppie	Differenza media a coppie (log_{10} copie/ml)	Errore standard della differenza media a coppie	IC 95% per la differenza media a coppie
42	0,026	0,027	(-0,029, 0,081)

IC = intervallo di confidenza.

Valutazione clinica

È stato analizzato l'uso di **cobas**® HIV-1 nel monitoraggio dei soggetti con infezione da HIV-1 trattati con antiretrovirale esaminando i campioni prelevati dai partecipanti in uno studio clinico di fase III completato da Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Inc. (BI), numero studio BI 1100.1486 (studio VERxVE), utilizzando un volume di analisi di 500 µl su **cobas**® 6800 System. I soggetti venivano inclusi se il relativo volume di campione era sufficiente per 144 settimane di follow-up per **cobas**® HIV-1 e se non avevano interrotto la partecipazione allo studio clinico VERxVE a causa di eventi avversi. I risultati della carica virale dopo 24 e 48 settimane di trattamento ottenuti applicando una soglia di 50 copie/ml e una soglia di 200 copie/ml sono stati confrontati con una definizione virologica di fallimento della terapia. Il fallimento virologico è stato definito come carica virale superiore o uguale a 50 copie/ml all'ultima visita prevista dallo studio clinico del soggetto dopo almeno 48 settimane di trattamento.

Tabella 39 mostra le caratteristiche demografiche dei 355 soggetti inclusi nello studio.

Tabella 39 Caratteristiche demografiche

Caratteristiche demografiche	Statistiche
	(N = 355)
Età (anni)	
Media (SD)	38 (9,3)
Mediana	38
Intervallo	19-68
Sesso, n (%)	
Maschio	322 (90,7%)
Femmina	33 (9,3%)
Razza/Etnia, n (%)	
Asiatico	5 (1,4%)
Nero/afro-americano	45 (12,7%)
Bianco/caucasico	303 (85,4%)
Altra	2 (0,6%)
Conteggio CD4 allo screening (cellule/µl), n (%)	
Da 50 a < 200	117 (33,0%)
Da 200 a < 350	209 (58,9%)
Da 350 a < 400	17 (4,8%)
≥ 400	9 (2,5%)
Sconosciuto	3 (0,8%)

SD = deviazione standard.

La Tabella 40 e la Tabella 41 mostrano i risultati degli studi comparativi basati su soglie di 50 copie/ml e 200 copie/ml, a 24 e 48 settimane dal trattamento con fallimento virologico.

Le analisi della soglia virologica a 50 copie/ml con fallimento virologico (alla settimana 24 e 48) sono riportate nella Tabella 40. Alla settimana 24 il PPV era del 15,6% (10/64, IC 95%: 7,8%, 26,9%), mentre alla settimana 48 PPV era del 25,7% (9/35, IC 95%: 12,5%, 43,3%). Alla settimana 24 il NPV era del 90,9% (251/276, IC 95%: 86,9%, 94,1%), mentre alla settimana 48 il NPV era del 91,1% (285/313, IC 95%: 87,3%, 94%). Alla settimana 24 l'OR era 1,86 (IC 95%: 0,75, 4,29),

valore statisticamente non significativo (p = 0,191). Alla settimana 48 l'OR era 3,51 (IC 95%: 1,31, 8,71), valore statisticamente significativo (p = 0,012).

Tabella 40 Confronto di una soglia virologica di 50 copie/ml con fallimento virologico

		Fallimento virologico[a]		
Visita in corso di trattamento	**Soglia virologica**	**Sì**	**No**	**Totale**
Settimana 24	≥ 50 cp/ml	10	54	64
	< 50 cp/ml	25	251	276
	Totale	35	305	340[+]
Settimana 48	≥ 50 cp/ml	9	26	35
	< 50 cp/ml	28	285	313
	Totale	37	311	348[+]

[+] Risultati validi ottenuti da **cobas**® HIV-1.

[a] Il fallimento virologico viene classificato con "Sì" se la carica virale di un campione era superiore o uguale a 50 cp/ml alla settimana 144 o alla visita finale se non era prevista una visita alla settimana 144. La visita finale doveva essere alla settimana 48 o successiva.

Quando sono state applicate le soglie di 200 cp/ml per definire il fallimento virologico come mostrato nella Tabella 41, alla settimana 24 il PPV era del 22,2% (2/9, IC 95%: 2,8%, 60%), mentre alla settimana 48, il PPV è aumentato al 100% (2/2, IC 95%: 15,8%, 100%). Alla settimana 24 il NPV era del 90,0% (298/331, IC 95%: 86,3%, 93%), mentre alla settimana 48 il NPV era del 89,9% (311/346, IC 95%: 86,2%, 92,9%). Alla settimana 24 l'OR era 2,57 (IC 95%: 0,25, 14,27), valore statisticamente non significativo (p = 0,469). Alla settimana 48 l'OR era 20,76 (IC 95%: 2,46, non calcolabile), valore statisticamente significativo (p = 0,022).

Tabella 41 Confronto di una soglia virologica di 200 copie/ml con fallimento virologico

		Fallimento virologico[a]		
Visita in corso di trattamento	**Soglia virologica**	**Sì**	**No**	**Totale**
Settimana 24	≥ 200 cp/ml	2	7	9
	< 200 cp/ml	33	298	331
	Totale	35	305	340[+]
Settimana 48	≥ 200 cp/ml	2	0	2
	< 200 cp/ml	35	311	346
	Totale	37	311	348[+]

[+] Risultati validi ottenuti da **cobas**® HIV-1.

[a] Il fallimento virologico viene classificato con "Sì" se la carica virale di un campione era superiore o uguale a 50 cp/ml alla settimana 144 o alla visita finale se non era prevista una visita alla settimana 144. La visita finale doveva essere alla settimana 48 o successiva.

Tutti i rapporti di probabilità erano superiori a 1 e sono aumentati nelle settimane da 24 a 48 di trattamento. Sono stati rilevati rapporti di probabilità statisticamente significativi per entrambe le soglie alla settimana 48. A entrambe le soglie, il valore NPV elevato ha dimostrato la capacità del test di predire quali pazienti non sono a rischio di fallimento del trattamento a ciascuna scadenza temporale.

L'analisi dei rapporti di probabilità ha anche dimostrato che le misurazioni della carica virale dei pazienti in terapia risultate superiori alle soglie indicate hanno una maggiore probabilità di correlazione con il successivo fallimento virologico (valore predittivo positivo o PPV). Tuttavia, il numero ridotto di fallimenti della terapia registrato nello studio ha limitato l'analisi statistica del PPV per il fallimento virologico.

Inoltre, le prestazioni cliniche di **cobas**® HIV-1 con il dispositivo di prelievo campioni **cobas**® Plasma Separation Card (PSC) sono state valutate in studi esterni che supportano l'uso di PSC per un monitoraggio accurato, fattibile e affidabile della carica virale di HIV-1.[21]

Conclusioni

cobas® HIV-1 è in grado di quantificare con affidabilità l'HIV-1 e monitorare la risposta alla terapia antiretrovirale. I risultati di questi studi supportano la rilevanza del test nella gestione clinica dei pazienti con infezione da HIV-1.

Equivalenza dei sistemi / confronto tra sistemi

L'equivalenza tra i **cobas**® 5800, **cobas**® 6800 e **cobas**® 8800 Systems è stata dimostrata attraverso alcuni studi sulle prestazioni.

I risultati presentati nelle Istruzioni per l'uso dimostrano l'equivalenza delle prestazioni tra tutti i sistemi.

Informazioni supplementari

Caratteristiche del test con i campioni di plasma EDTA

Tipo di campione	Plasma EDTA
Quantità minima di campione richiesta	650 µl o 350 µl
Volume di analisi del campione	500 µl o 200 µl
Sensibilità analitica	13,2 cp/ml (500 µl) 35,5 cp/ml (200 µl)
Intervallo lineare	500 µl: 20 cp/ml-1,0E+07 cp/ml
	200 µl: 50 cp/ml-1,0E+07 cp/ml
Specificità	100% (intervallo di confidenza al 95% unilaterale: 99,5%)
Genotipi identificati	HIV-1M (A-D, F-H, CRF01_AE, CRF02_AG), HIV-1O, HIV-1N

Caratteristiche del test con i campioni PSC

Tipo di campione	Spot di plasma essiccato proveniente da un cartoncino per la separazione del plasma (Plasma Separation Card)
Quantità minima di campione richiesta	140 µl di sangue intero
Volume di analisi del campione	850 µl
Sensibilità analitica	790,2 cp/ml
Intervallo lineare	790 cp/ml-1,0E+07 cp/ml
Specificità	100% (intervallo di confidenza al 95% unilaterale: 98,3%)

Simboli

I seguenti simboli appaiono su tutte le confezioni dei prodotti diagnostici PCR di Roche.

Tabella 42 Simboli utilizzati sulle etichette dei prodotti diagnostici PCR di Roche

Age/DOB	Età o data di nascita		Dispositivo non idoneo ai test POC	QS IU/PCR	UI QS per reazione PCR; utilizzare le unità internazionali (UI) QS per la reazione PCR nel calcolo dei risultati.
SW	Software ausiliario		Dispositivo non idoneo all'autodiagnosi		
Assigned Range [copies/mL]	Intervallo assegnato (copie/ml)		Distributore *(Nota: il paese e/o la regione applicabili potrebbero essere indicati sotto il simbolo.)*	SN	Numero di serie
Assigned Range [IU/mL]	Intervallo assegnato (UI/ml)		Non riutilizzare	Site	Sito
EC REP	Mandatario nella Comunità Europea		Femmina	Procedure Standard	Procedura standard
BARCODE	Foglio di dati del barcode		Solo per valutazione delle prestazioni IVD	STERILE EO	Sterilizzazione con ossido di etilene
LOT	Codice del batch	GTIN	Global Trade Item Number		Conservare al buio
	Rischio biologico		Importatore		Limiti di temperatura
REF	Numero di catalogo	IVD	Dispositivo medico-diagnostico *in vitro*	TDF	File di definizione del test
CE	Contrassegno di conformità CE: questo dispositivo è conforme ai requisiti pertinenti del marchio CE relativamente ai dispositivi medico-diagnostici *in vitro*	LLR	Limite inferiore dell'intervallo assegnato		Alto
			Maschio	Procedure UltraSensitive	Procedura ultrasensibile
Collect Date	Data di raccolta		Fabbricante	UDI	Identificazione univoca del dispositivo
	Consultare le istruzioni per l'uso	CONTROL −	Controllo negativo	ULR	Limite superiore dell'intervallo assegnato
Σ	Contenuto sufficiente per <*n*> test	NON STERILE	Non sterile	Urine Fill Line	Riga di riempimento urina
CONTENT	Contenuto del kit		Nome del paziente	Rx Only	Solo USA: la legge federale statunitense limita la vendita di questo dispositivo ai medici o su presentazione di prescrizione medica.
CONTROL	Controllo		Numero del paziente		
	Data di produzione		Staccare qui		Utilizzare entro la data
	Dispositivo idoneo ai test POC	CONTROL +	Controllo positivo		
	Dispositivo idoneo all'autodiagnosi	QS copies / PCR	Copie QS per reazione PCR; usare le copie QS per reazione PCR nel calcolo dei risultati.		

Assistenza tecnica

Per richiedere assistenza tecnica, contattare la nostra filiale locale:
https://www.roche.com/about/business/roche_worldwide.htm

Produttore e importatore

Tabella 43 Produttore e importatore

Roche Molecular Systems, Inc.
1080 US Highway 202 South
Branchburg, NJ 08876 USA
www.roche.com

Made in USA

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, Germany

Marchi e brevetti

Questo prodotto è coperto da uno o più brevetti statunitensi (n. 8962293, 9102924, 8609340, 9234250, 8097717, 8192958, 10059993, 10358675, 8129118 e 6727067) e dagli omologhi stranieri di ognuno.

COBAS, COBAS OMNI, AMPERASE, AMPLIPREP e TAQMAN sono marchi di Roche.

Il marchio "Armored RNA®" è di proprietà di Asuragen, Inc. e Cenetron Diagnostics, Ltd.

ProClin® è un marchio registrato di Rohm and Haas Company.

Tutti gli altri nomi di prodotti e marchi appartengono ai rispettivi proprietari.

La tecnologia per la prevenzione del carryover nell'enzima AmpErase® è protetta dal Brevetto USA n. 7,687,247 di proprietà di Life Technologies, concesso in licenza a Roche Molecular Systems, Inc.

Alcuni componenti di questo prodotto sono coperti da uno o più brevetti statunitensi e loro omologhi stranieri rilasciati a Novartis Vaccines and Diagnostics, Inc. e concessi in licenza a Roche Molecular Systems, Inc. e F. Hoffmann-La Roche Ltd.

Vedere http://www.roche-diagnostics.us/patents

Copyright

©2021 Roche Molecular Systems, Inc.

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116
68305 Mannheim
Germany

Bibliografia

1. Mellors JW, Muñoz A, Giorgi JV, et al. Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection. *Ann Intern Med*. 1997;126:946-54. PMID: 9182471.

2. Mellors JW, Margolick JB, Phair JP, et al. Prognostic value of HIV-1 RNA, CD4 cell count, and CD4 Cell count slope for progression to AIDS and death in untreated HIV-1 infection. *JAMA*. 2007;297:2349-50. PMID: 17551128.

3. Department of Health and Human Services. Panel on Antiretroviral Guidlines for Adults and Adolescents. Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in Adults and Adolescents with HIV. https://clinicalinfo.hiv.gov/sites/default/files/guidelines/documents/AdultandAdolescentGL.pdf. Accessed December 3, 2020.

4. Cohen MS, Chen YQ, McCauley M, et al. Prevention of HIV-1 infection with early antiretroviral therapy. *N Engl J Med*. 2011;365:493-505. PMID: 21767103.

5. Phillips AN, Pillay D, Garnett G, et al. Effect on transmission of HIV-1 resistance of timing of implementation of viral load monitoring to determine switches from first to second-line antiretroviral regimens in resource-limited settings. *AIDS*. 2011;25:843-50. PMID: 21192233.

6. Sigaloff KC, Hamers RL, Wallis CL, et al. Unnecessary antiretroviral treatment switches and accumulation of HIV resistance mutations; two arguments for viral load monitoring in Africa. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2011;58:23-31. PMID: 21694603.

7. European AIDS Clinical Society. European AIDS Clinical Society 2017 Guidelines. https://www.eacsociety.org/files/guidelines_9.0-english.pdf. Accessed December 3, 2020.

8. World Health Organization. Consolidated Guidelines on the Use of Antiretroviral Drugs for Treating and Preventing HIV Infection – Recommendations for a Public Health Approach. https://www.who.int/hiv/pub/arv/arv-2016/en/. Accessed December 3, 2020.

9. Günthard HF, Aberg JA, Eron JJ, et al. Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2014 recommendations of the International Antiviral Society-USA Panel. *JAMA*. 2014;312:410-25. PMID: 25038359.

10. Do T, Duncan J, Butcher A, Liegler T. Comparative frequencies of HIV low-level viremia between real-time viral load assays at clinically relevant thresholds. *J Clin Virol*. 2011;52 Suppl 1:S83-9. PMID: 21995930.

11. Paba P, Fabeni L, Ciccozzi M, Perno CF, Ciotti M. Performance evaluation of the COBAS/TaqMan HIV-1 v2.0 in HIV-1 positive patients with low viral load: a comparative study. *J Virol Methods*. 2011;173:399-402. PMID: 21419171.

12. Deeks SG. Durable HIV treatment benefit despite low-level viremia: reassessing definitions of success or failure. *JAMA*. 2001;286:224-6. PMID: 11448286.

13. Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene*. 1990;93:125-8. PMID: 2227421.

14. Savva R, McAuley-Hecht K, Brown T, Pearl L. The structural basis of specific base-excision repair by uracil-DNA glycosylase. *Nature*. 1995;373:487-93. PMID: 7845459.

15. Mol CD, Arvai AS, Slupphaug G, et al. Crystal structure and mutational analysis of human uracil-DNA glycosylase: structural basis for specificity and catalysis. *Cell*. 1995;80:869-78. PMID: 7697717.

16. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)*. 1992;10:413-7. PMID: 1368485.

17. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res*. 1996;6:986-94. PMID: 8908518.

18. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th ed. https://www.cdc.gov/labs/pdf/CDC-BiosafetyMicrobiologicalBiomedicalLaboratories-2009-P.PDF. Accessed December 2, 2020.

19. Clinical and Laboratory Standards Institute. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections. Approved Guideline-Fourth Edition. https://clsi.org/media/1459/m29a4_sample.pdf. Accessed December 2, 2020.

20. Clinical and Laboratory Standards Institute. EP06-A. Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline. https://clsi.org/media/1437/ep06a_sample.pdf. Accessed October 3, 2020.

21. Vubil A, Zicai AF, Sitoe N, et al. Accurate HIV viral load measurement in primary health care settings using the **cobas**® plasma separation card. *PLoS One*. 2020;15:e0232122. PMID: 32374748.

Revisione del documento

Informazioni sulla revisione del documento	
Doc Rev. 1.0 12/2020	Prima pubblicazione.
Doc Rev. 2.0 07/2021	Aggiunte informazioni specifiche su **cobas**® 5800. Aggiunto l'indirizzo dell'importatore. Eliminati gli indirizzi dei distributori. Aggiornata la pagina dei simboli armonizzati. Per ulteriori domande e chiarimenti, è possibile rivolgersi al rappresentante Roche locale.