cobas® DPX

Test degli acidi nucleici duplex HAV e Parvovirus B19 per l'utilizzo sui cobas® 6800/8800 Systems

Per uso diagnostico in vitro

cobas® DPX – 96	P/N: 07001088190
cobas® DPX Control Kit	P/N: 07001126190
cobas® Buffer Negative Control Kit	P/N: 07002238190
cobas omni MGP Reagent	P/N: 06997546190
cobas omni Specimen Diluent	P/N: 06997511190
cobas omni Lysis Reagent	P/N: 06997538190
cobas omni Wash Reagent	P/N: 06997503190

Indice generale

Uso previsto **4**

Riassunto e spiegazione del test **4**

Reagenti e materiali **7**

Reagenti e controlli **cobas**® DPX 7

Reagenti **cobas omni** per la preparazione dei campioni 10

Requisiti per la conservazione e la manipolazione dei reagenti 11

Materiali aggiuntivi necessari 12

Strumentazione e software necessari 12

Precauzioni e requisiti per l'uso **13**

Avvertimenti e precauzioni 13

Manipolazione dei reagenti 14

Buone pratiche di laboratorio 14

Raccolta, trasporto, conservazione e creazione di pool di campioni **15**

Campioni di donatori viventi 15

Istruzioni per l'uso **17**

Pipettamento automatico dei campioni e creazione di pool (opzionale) 17

Impostazione del valore cut-off per il parvovirus B19 17

Note sulla procedura 17

Esecuzione del test **cobas**® DPX 18

Risultati **19**

Controllo di qualità e validità dei risultati 19

Interpretazione dei risultati 20

Test di ripetizione su singolo campione 21

Limiti della procedura 21

Valutazione delle prestazioni non cliniche 22

Caratteristiche delle prestazioni (campioni da donatori viventi) 22

Limite di sensibilità (LoD) 22

Intervallo lineare della quantificazione del parvovirus B19 23

Riproducibilità 24

Precisione 25

Inclusività del genotipo (HAV) 26

Verifica del genotipo per il parvovirus B19 27

Specificità analitica 28

Specificità analitica e sostanze interferenti 29

Correlazione 30

Tasso globale d'errore del sistema 31

Contaminazione crociata 31

Performance clinica 32

Riproducibilità 32

Informazioni supplementari 34

Caratteristiche del test 34

Simboli 35

Produttore e distributori 36

Marchi e brevetti 36

Copyright 36

Bibliografia 37

Revisione del documento 40

Uso previsto

Il test **cobas**® DPX è un esame *in vitro* destinato alla quantificazione diretta del DNA del parvovirus B19, genotipi 1, 2 e 3, e alla rilevazione qualitativa diretta dell'RNA del virus dell'epatite A (HAV), genotipi I, II e III, in plasma umano.

Questo test può essere utilizzato come "test in processo" per quantificare soltanto il DNA del parvovirus B19 o per quantificare il DNA del parvovirus B19 e simultaneamente rilevare l'RNA dell'HAV nel plasma destinato ad ulteriore lavorazione, ottenuto da donatori di sangue intero, emocomponenti o plasma. Il plasma ottenuto da tutti i donatori o dai pool in lavorazione può essere analizzato in campioni individuali o in pool costituiti dalle aliquote dei campioni individuali.

Questo test non è destinato all'uso con campioni di sangue da cordone ombelicale.

Questo test non è destinato all'uso come ausilio per la diagnosi di parvovirus B19 o HAV.

Riassunto e spiegazione del test

Premessa: screening del sangue per rilevare infezioni virali trasmesse tramite trasfusione

Il parvovirus B19 umano è un piccolo virus privo di involucro (envelope), con DNA a filamento singolo, appartenente al genere *Erythrovirus* della famiglia *Parvoviridae*.[1] Gli eritrovirus umani sono raggruppati in tre genotipi distinti: genotipo 1 (ceppi B19), genotipo 2 (ceppi A6) e genotipo 3 (ceppi V9/D91/1).[2, 3] Pressoché tutti i campioni virali appartengono al genotipo 1.[1] Il genotipo 2 viene riscontrato sporadicamente negli USA, in Europa e in Sud America, in prevalenza in soggetti nati prima del 1940.[1] Il genotipo 3 è presente principalmente in Africa settentrionale e occidentale, ma è stato riscontrato anche in Francia.[1]

Il parvovirus B19 è un patogeno comune con diffusione in tutto il mondo. La prevalenza degli anticorpi IgG anti-parvovirus B19, indicativa di un'infezione pregressa, aumenta con l'età e sale dal 20% dei soggetti di età compresa tra 1 e 4 anni, al 60% e oltre dei soggetti adulti, fino a picchi dell'85% tra la popolazione geriatrica.[4-6] Sebbene l'anticorpo sia prevalente nella popolazione generale, la viremia o la presenza del DNA virale sono rare.[4] Il tipo di manifestazione e la gravità della patologia clinica dipendono dalle condizioni immunologiche ed ematologiche del soggetto infetto.[1, 7, 8] Nei soggetti immunocompetenti l'infezione è spesso asintomatica o si manifesta in forme lievi, con una patologia autolimitante, ad esempio con un eritema infettivo ("quinta malattia") nei pazienti pediatrici o con un'artropatia negli adulti.[1, 7, 9, 10] Il parvovirus B19 è tuttavia in grado di causare patologie anche gravi, ad esempio crisi aplastiche transitorie in soggetti con disfunzioni ematologiche o idrope, anemia congenita o morte del feto nelle donne in gravidanza.[1, 7, 11-13] La prevalenza del parvovirus B19 nei donatori di sangue e plasma è compresa tra lo 0,16% e lo 0,9%, per gran parte con livelli di DNA virale molto bassi.[14-18] Secondo alcuni studi condotti dal produttore del plasma, la prevalenza osservata è addirittura più bassa.[19]

La trasmissione del parvovirus B19 avviene normalmente per via aerea, ma occasionalmente può anche avvenire attraverso i derivati del plasma e le trasfusioni di globuli rossi.[1, 20] La letteratura scientifica sull'argomento fornisce ampie descrizioni della presenza del DNA del parvovirus B19 e della sua trasmissione ai riceventi dei derivati del plasma, inclusi il concentrato di fattore VIII, altri fattori di coagulazione e il plasma in pool trattato con solvente-detergente.[20-30] La trasmissione attraverso i derivati del plasma sembra essere correlata alle dimensioni dei pool di plasma, all'incidenza delle infezioni acute e asintomatiche da parvovirus B19, a livelli elevati di DNA virale (fino a 10^{12} UI/ml) nelle donazioni viremiche e anche alla resistenza del parvovirus B19 rispetto alla maggior parte dei trattamenti di inattivazione/rimozione virale più comuni, ad esempio il trattamento con solvente/detergente (S/D) e la pastorizzazione.[20, 21, 27-30] I casi clinici con segnalazioni di trasmissione del parvovirus B19 attraverso una trasfusione di globuli rossi sono pochi.[20] Inoltre è estremamente rara la trasmissione ai riceventi attraverso componenti contenenti livelli di DNA del parvovirus B19 tra bassi e moderati ($< 10^6$ UI/ml).[20]

L'HAV è un piccolo virus con RNA privo di involucro (envelope), appartenente al gruppo degli Hepatovirus della famiglia *Picornaviridae*.[31] L'HAV ha una diffusione globale e si trasmette per via orale-fecale, principalmente attraverso il contatto personale ravvicinato.[32-34] Sono stati identificati molteplici genotipi e sottotipi di questo virus.[34] Nei Paesi in via di sviluppo, dove gli standard igienici sono bassi e l'infezione viene tipicamente contratta nei primi anni di vita, le epidemie sono comuni e gran parte della popolazione ha sviluppato gli anticorpi protettivi anti-HAV.[31-34] Nei Paesi industrializzati, invece, la diminuzione del tasso di incidenza del virus e la disponibilità dei vaccini hanno fatto sì che il rischio di infezione si spostasse più in avanti nell'età adulta.[31, 34] Nell'Europa del Nord, in Giappone, in Canada e negli USA la prevalenza nella popolazione generale è molto bassa (~0,01%) e le epidemie sono principalmente associate ai gruppi a rischio, come i viaggiatori che si recano nelle regioni endemiche.[32, 33]

Le manifestazioni delle infezioni da HAV negli esseri umani possono variare da infezioni totalmente asintomatiche, soprattutto in età pediatrica, a epatiti fulminanti con esito addirittura fatale in alcuni casi.[31, 32] L'HAV può causare un'infezione acuta che si risolve senza che il soggetto diventi portatore cronico. L'HAV è raramente un'infezione correlata alle trasfusioni e le banche del sangue tendono a non eseguire i test per l'HAV sulle donazioni, affidandosi piuttosto alla storia medica dei donatori per scartare le donazioni dei soggetti che dichiarano di aver sofferto di epatite in passato.[35] Le segnalazioni di infezioni da HAV trasmesse per via trasfusionale, che hanno causato lievi patologie epatiche, sono poche.[36, 37] Sebbene l'HAV infettivo possa essere presente nel sangue nel periodo finestra sierologico, il rischio di trasmissione dell'HAV per via trasfusionale è molto basso.[35, 38] Sono stati segnalati anche casi di trasmissione dell'HAV da donatori che erano in uno stato viremico asintomatico.[35-38] Non avendo un involucro (envelope) lipidico, l'HAV non viene facilmente inattivato con un trattamento S/D o una pastorizzazione, ad esempio durante la lavorazione dei derivati del plasma.[35] Per questa ragione sono stati segnalati alcuni casi di trasmissione dell'HAV attraverso i derivati del plasma, principalmente i fattori di coagulazione.[36, 39, 40]

Mentre una singola donazione può contenere sia il DNA del parvovirus B19, sia l'RNA dell'HAV, la prevalenza della coinfezione da parvovirus B19/HAV tra la popolazione dei donatori non è mai stata studiata approfonditamente o documentata in letteratura.[41-43] Sono stati segnalati rari casi di coinfezione da parvovirus B19/HAV umani in età neonatale e pediatrica, ovvero in soggetti che non rientrano tra la popolazione dei donatori.[41-43] Il rischio di coinfezione può essere calcolato sulla base della prevalenza dei singoli virus. Sebbene la prevalenza dell'HAV non sia caratterizzata adeguatamente tra la popolazione dei donatori, la prevalenza tra la popolazione generale è di ~0,01% ed è inferiore tra i donatori di plasma da aferesi (~0,0004%).[32, 33, 44, 45] Partendo da una prevalenza del parvovirus B19 di ~0,9%[14-18], il rischio calcolato di coinfezione da parvovirus B19/HAV è di ~0,0000036% (0,0004% × 0,9%), ovvero 1 possibilità ogni ~28.000.000 di donazioni.

Perché utilizzare i test degli acidi nucleici

È possibile utilizzare i test NAT per rilevare la contaminazione da HAV e da parvovirus B19. Per affrontare il problema dei casi di trasmissione di questi due virus attraverso i derivati del plasma, verso l'inizio del 2000 alcuni produttori hanno iniziato ad eseguire uno screening del plasma destinato ad ulteriore lavorazione eseguendo i test NAT per rilevare la presenza dell'RNA di HVA e del DNA del parvovirus B19.[46] I test NAT, considerati "test in processo", avevano lo scopo di rimuovere le eventuali unità contaminate dall'HAV e di ridurre l'incidenza del parvovirus B19 nei pool di plasma.[47] Nel 2004 la farmacopea europea (PhEur) ha introdotto per i produttori dei plasmaderivati l'obbligo di assicurare livelli di DNA del parvovirus B19 inferiori a 10^4 UI/ml sia nei pool di lavorazione che vengono utilizzati per produrre le immunoglobuline anti-D, sia nei pool di plasma umano trattati per l'inattivazione virale.[48] In una disposizione analoga del 2009, la FDA ha richiesto ai produttori di plasma di eseguire i test NAT per la presenza del parvovirus B19 in tutti i plasmaderivati, così da assicurare che il carico virale del DNA del parvovirus B19 nei pool di lavorazione non superi 10^4 UI/ml.[47] Né gli enti regolatori statunitensi, né gli enti regolatori europei attualmente obbligano ad eseguire i test NAT per l'HAV sui pool di plasma destinati ad ulteriore lavorazione. Ciononostante la legislazione europea prevede che, se

i test NAT per l'HAV vengono utilizzati sui pool di lavorazione come parte integrante dei "test in processo", tali test devono essere in grado di rilevare un controllo contenente 100 UI/ml di RNA di HAV.[49]

Spiegazione del test

Il test **cobas**® DPX è un test duplex che viene eseguito sul **cobas**® 6800 System e sul **cobas**® 8800 System. Il test **cobas**® DPX consente la quantificazione simultanea del DNA del parvovirus B19, genotipi 1, 2 e 3 e la rilevazione qualitativa dell'RNA del virus dell'epatite A (HAV), genotipi I, II e III, in plasma umano.

Principi della procedura

Il test **cobas**® DPX si basa sulla tecnologia real-time PCR su una preparazione di campioni completamente automatizzata (estrazione e purificazione dell'acido nucleico) e sulla successiva amplificazione e rilevazione mediante PCR. 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 automatizzata dei dati è affidata al software **cobas**® 6800/8800, che assegna i risultati dei test in base ad un valore quantitativo (in UI/ml) per il parvovirus B19 mediante l'uso di uno Standard di Quantificazione (QS) tracciabile direttamente allo Standard Internazionale B19 dell'OMS.[47] Inoltre il software **cobas**® 6800/8800 assegna i risultati dei test con riferimento alla presenza del virus dell'epatite A classificandoli in non reattivi, reattivi o non validi. I risultati possono essere visualizzati direttamente sullo schermo del sistema o stampati in un report.

È possibile analizzare i campioni uno ad uno oppure, facoltativamente, creare un pool costituito da più campioni e analizzarlo. Nel caso in cui sia necessario creare i pool, è possibile utilizzare facoltativamente il **cobas p** 680 instrument oppure **cobas**® **Synergy** Software con Hamilton Microlab® STAR IVD (**cobas**® **Synergy** Core) in un passaggio pre-analitico.

L'acido nucleico viene estratto simultaneamente dal campione del donatore, dalle molecole di Armored RNA del controllo interno (IC) aggiunto e anche dalle molecole dello standard di quantificazione (QS) del DNA (che fungono da controlli del processo di preparazione e amplificazione/rilevazione dei campioni). Gli acidi nucleici virali vengono rilasciati grazie all'aggiunta della proteinasi e del reagente di lisi nel campione. 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, come l'emoglobina) 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.

Per ottenere l'amplificazione selettiva dell'acido nucleico target dal campione del donatore vengono utilizzati dei primer forward e reverse che sono specifici del virus e sono selezionati da regioni altamente conservate dell'acido nucleico virale. Un enzima DNA polimerasi termostabile viene utilizzato sia per la trascrizione inversa che per l'amplificazione. La soluzione Master Mix contiene trifosfato di deossiuridina (dUTP) anziché trifosfato di deossitimidina (dTTP), che è incorporato nel DNA appena sintetizzato (amplicone).[50-52] Tutti gli ampliconi contaminanti che sono stati prodotti da sessioni precedenti di PCR verranno distrutti dall'enzima AmpErase [uracil-N-glicosilasi] contenuto nella soluzione Master Mix per PCR, durante il riscaldamento nel primo passaggio del ciclo termico. Al contrario, gli ampliconi che si sono appena formati non verranno distrutti perché l'enzima AmpErase si inattiva dopo l'esposizione a temperature superiori a 55°C.

La soluzione Master Mix **cobas**® DPX contiene sonde di rilevazione specifiche per gli acidi nucleici di parvovirus B19 e HAV, oltre che dello standard di quantificazione (QS) e del controllo interno (IC). Le sonde di rilevazione specifiche per B19, HAV, IC e QS sono marcate con uno dei quattro fluorocromi univoci, che agiscono da rivelatori (reporter). Ogni sonda include anche un quinto fluorocromo, che agisce da soppressore (quencher). Le misurazioni dei quattro fluorocromi reporter vengono effettuate a lunghezze d'onda fisse, consentendo così l'identificazione e la discriminazione dei target amplificati di parvovirus B19, HAV, IC e QS.[53, 54] Il segnale fluorescente delle sonde intatte è soppresso dal fluorocromo quencher. Nella fase di amplificazione mediante PCR, le sonde ibridizzano con lo stampo specifico di DNA a filamento unico e vengono scisse dall'attività nucleasica in direzione 5'→3' della DNA polimerasi, con la conseguente separazione dei fluorocromi reporter e quencher e la produzione di un segnale fluorescente. Con ogni ciclo di PCR viene generata una quantità crescente di sonde scisse e, parallelamente, si assiste all'aumento del segnale cumulativo del fluorocromo reporter. Poiché le misurazioni dei quattro fluorocromi reporter avvengono a lunghezze d'onda fisse, è possibile assistere alla rilevazione e alla discriminazione simultanea dei target amplificati di parvovirus B19, HAV, QS e IC.

Reagenti e materiali

Reagenti e controlli cobas® DPX

Tutti i reagenti e i controlli non ancora aperti devono essere conservati rispettando le condizioni indicate dalla Tabella 1 alla Tabella 4.

Tabella 1 Test **cobas**® DPX

Test cobas® DPX
Conservare a 2-8°C
Cassetta per 96 test (P/N 07001088190)

Componenti del kit	Ingredienti del reagente	Quantità per kit
Soluzione proteinasi (PASE)	Tampone Tris, < 0,05% EDTA, cloruro di calcio, acetato di calcio, 8% proteinasi EUH210: Scheda dati di sicurezza disponibile su richiesta. EUH208: Contiene subtilisina, 9014-01-1. Può provocare una reazione allergica.	13 ml
Controllo interno e standard di quantificazione DPX (DPX IC/QS)	Tampone Tris, < 0,05% EDTA, < 0,01% costrutto di Armored RNA di controllo interno (RNA non infettivo, incapsulato in batteriofago MS2), < 0,01% DNA di QS B19 sintetico, non infettivo, incapsulato in proteina di rivestimento batteriofago Lambda, < 0,002% Poly rA RNA (sintetico), < 0,1% sodio azide	13 ml
Tampone di eluizione (EB)	Tampone Tris, 0,2% metil-4 idrossibenzoato	13 ml
Master Mix Reagente 1 (MMX-R1)	Acetato di manganese, idrossido di potassio, < 0,1% sodio azide	5,5 ml
DPX Master Mix Reagente 2 (DPX MMX-R2)	Tampone tricina, acetato di potassio, glicerolo, 18% dimetil sulfoxide, Tween 20, EDTA, < 0,06% dATP, dGTP, dCTP, < 0,14% dUTP, < 0,01% primer upstream e downstream di parvovirus B19, HAV, controllo interno e standard di quantificazione, < 0,01% sonde fluorescenti di parvovirus B19 e HAV, < 0,01% sonde fluorescenti di QS di parvovirus B19 e di IC di HAV, < 0,01% aptamero oligonucleotidico, < 0,01% DNA polimerasi Z05D, < 0,01% enzima AmpErase (uracil-N-glicosilasi) (batterico), < 0,1% sodio azide	6 ml

Tabella 2 **cobas**® DPX Control Kit

cobas® DPX Control Kit
Conservare a 2-8°C
(P/N 07001126190)

Componenti del kit	Ingredienti dei reagenti	Quantità per kit	Simbolo di sicurezza e avvertimento*
Controllo positivo doppio DPX (DPX D(+)C)	< 0,001% RNA sintetico (armored) di HAV incapsulato in proteina di rivestimento batteriofago MS2, < 0,001% DNA sintetico (plasmide) di parvovirus B19 incapsulato in proteina di rivestimento batteriofago Lambda, plasma umano normale, non reattivo in base ai test brevettati per gli anticorpi anti-B19, RNA di HAV non rilevabili con i metodi PCR, DNA di B19 non rilevabile con i metodi PCR o al di sotto del livello che compromette la funzionalità del controllo(≤ 5 UI/ml). 0,1% Conservante ProClin® 300**	8 ml (8 × 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 miscela 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 DPX (DPX H(+)C)	< 0,001% DNA sintetico (plasmide) di parvovirus B19 incapsulato in proteina di rivestimento batteriofago Lambda, plasma umano normale, non reattivo in base ai test brevettati per gli anticorpi anti-B19, RNA di HAV non rilevabili con i metodi PCR, DNA di B19 non rilevabile con i metodi PCR o al di sotto del livello che compromette la funzionalità del controllo(≤ 5 UI/ml). 0,1% Conservante ProClin® 300**	8 ml (8 × 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 miscela 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**® Buffer Negative Control Kit

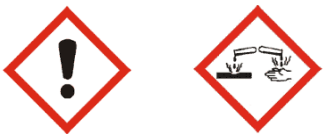
cobas® Buffer Negative Control Kit

Conservare a 2-8°C
(P/N 07002238190)

Componenti del kit	Ingredienti del reagente	Quantità per kit	Simbolo di sicurezza e avvertimento
Controllo negativo tampone (Buffer-NC)	Tampone Tris, EDTA, 0,002% poly rA RNA (sintetico), < 0,1% sodio azide	16 ml (16 x 1 ml)	Non applicabile

Reagenti cobas omni per la preparazione dei campioni

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

Reagenti	Ingredienti del reagente	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 x 875 ml	Non applicabile
cobas omni Lysis Reagent (LYS) Conservare a 2–8°C (P/N: 06997538190)	42,56% (p/p) guanidina tiocianato**, 5% (p/v) polidocanolo**, 2% (p/v) ditiotreitolo, citrato di sodio diidrato	4 x 875 ml	 **PERICOLO** H302 + H332: Nocivo se ingerito o inalato. H318: Provoca 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: Proteggere gli occhi/il viso. P304 + P340 + P312: IN CASO DI INALAZIONE: trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione. In caso di malessere, contattare 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. P501: Smaltire il prodotto/recipiente in un impianto d'eliminazione dei rifiuti autorizzato. 593-84-0 Tiocianato di guanidina 9002-92-0 Polidocanolo
cobas omni Wash Reagent (WASH) Conservare a 15-30°C (P/N: 06997503190)	Citrato di sodio diidrato, 0,1% metil-4 idrossibenzoato	4,2 litri	Non applicabile

* Questi reagenti non sono inclusi nel kit del test cobas® DPX. Consultare l'elenco dei materiali aggiuntivi necessari (Tabella 7).

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

Requisiti per la conservazione e la manipolazione dei reagenti

I reagenti devono essere conservati e manipolati rispettando le condizioni indicate dalla Tabella 5 alla Tabella 6.

I reagenti che non sono ancora stati caricati sui **cobas**® 6800/8800 Systems devono essere conservati alla temperatura indicata nella Tabella 5.

Tabella 5 Conservazione dei reagenti (non ancora caricati sul sistema)

Reagente	Temperatura di conservazione
cobas® DPX – 96	2-8°C
cobas® DPX Control Kit	2-8°C
cobas® Buffer 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

Dopo il caricamento sui **cobas**® 6800/8800 Systems, i reagenti sono conservati alla temperatura appropriata e la data di scadenza viene monitorata dal sistema. Il sistema consente l'utilizzo dei reagenti soltanto se sono rispettate tutte le condizioni descritte nella Tabella 6. Il sistema impedisce automaticamente l'uso dei reagenti scaduti. La Tabella 6 fornisce all'utente informazioni utili sulle condizioni di manipolazione dei reagenti previste per i **cobas**® 6800/8800 Systems.

Tabella 6 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® DPX – 96	Data non superata	30 giorni dal primo utilizzo	Max 10 sedute	Max 8 ore
cobas® DPX Control Kit	Data non superata	Non applicabile	Non applicabile	Max 8 ore
cobas® Buffer Negative Control Kit	Data non superata	Non applicabile	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

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

Materiali aggiuntivi necessari

Tabella 7 Materiali e consumabili da utilizzare 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	07435967001
Contenitore per rifiuti solidi	07094361001

Strumentazione e software necessari

Il software **cobas**® 6800/8800 e il pacchetto di analisi **cobas**® DPX verranno installati sullo strumento (o sugli strumenti). Il server IG (Instrument Gateway) verrà fornito con il sistema.

Tabella 8 Strumentazione

cobas® 6800/8800 Systems	**P/N**
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
Opzioni per pipettamento e creazione di pool	**P/N**
cobas p 680 instrument	06570577001
cobas® Synergy Software per l'uso con Hamilton Microlab® STAR IVD	07788096001 e 07788339001
Hamilton Microlab® STAR IVD	04640535001

Per ulteriori informazioni sui tubi primari e secondari accettati dagli strumenti, consultare il Manuale Operatore dei **cobas**® 6800/8800 Systems e il Manuale Operatore del **cobas p** 680 instrument oppure l'Assistenza Utente del **cobas® Synergy** Software.

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*.
- Tutti i campioni e i controlli devono essere manipolati come materiale a rischio biologico, seguendo le buone pratiche di laboratorio descritte in Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories e nel documento M29-A4 del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).[55, 56] Questa procedura deve essere eseguita esclusivamente da personale esperto nella manipolazione di materiale a rischio biologico e nell'uso del test **cobas**® DPX, dei **cobas**® 6800/8800 Systems e (facoltativamente) del **cobas p** 680 instrument o dell'Hamilton Microlab® STAR IVD con **cobas**® **Synergy** Core.
- 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.
- Il prodotto **cobas**® DPX Control Kit contiene plasma derivato da sangue umano. Il materiale di provenienza è stato analizzato con un test degli anticorpi brevettato ed è risultato non reattivo agli anticorpi IgG e IgM anti-B19. I test basati sui metodi PCR eseguiti sul plasma umano normale hanno inoltre confermato l'assenza di RNA di HAV e livelli di DNA B19 non rilevabili o abbastanza bassi da non compromettere la funzionalità dei controlli DPX positivi. Allo stato attuale, tuttavia, nessun metodo di analisi garantisce con assoluta certezza che i prodotti derivati da sangue umano non trasmettano agenti infettivi.
- Non congelare il sangue intero.
- È consigliato l'uso di pipette sterili monouso e puntali di pipettamento privi di nucleasi. 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.

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 reagente di lisi **cobas omni** 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 del test **cobas**® DPX, **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 il reagente di lisi **cobas omni**, contenente guanidina tiocianato, entri 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**® DPX 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 fuoriuscita di liquidi sui **cobas**® 6800/8800 Systems, seguire le istruzioni contenute nel Manuale Operatore dei **cobas**® 6800/8800 Systems per pulire accuratamente e decontaminare la superficie dello strumento (o degli strumenti).

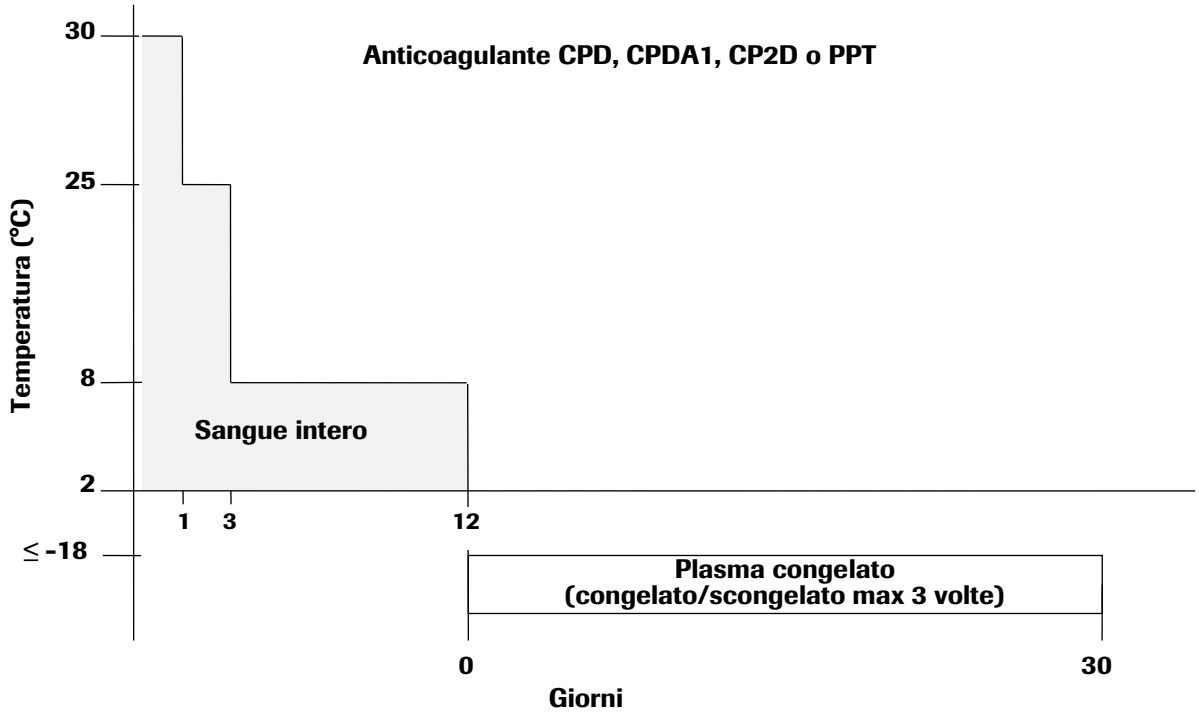
Raccolta, trasporto, conservazione e creazione di pool di campioni

Nota: manipolare tutti i campioni e i controlli come se fossero in grado di trasmettere agenti infettivi.
Conservare tutti i campioni dei donatori alle temperature indicate.
La stabilità dei campioni risente delle temperature elevate.

Campioni di donatori viventi

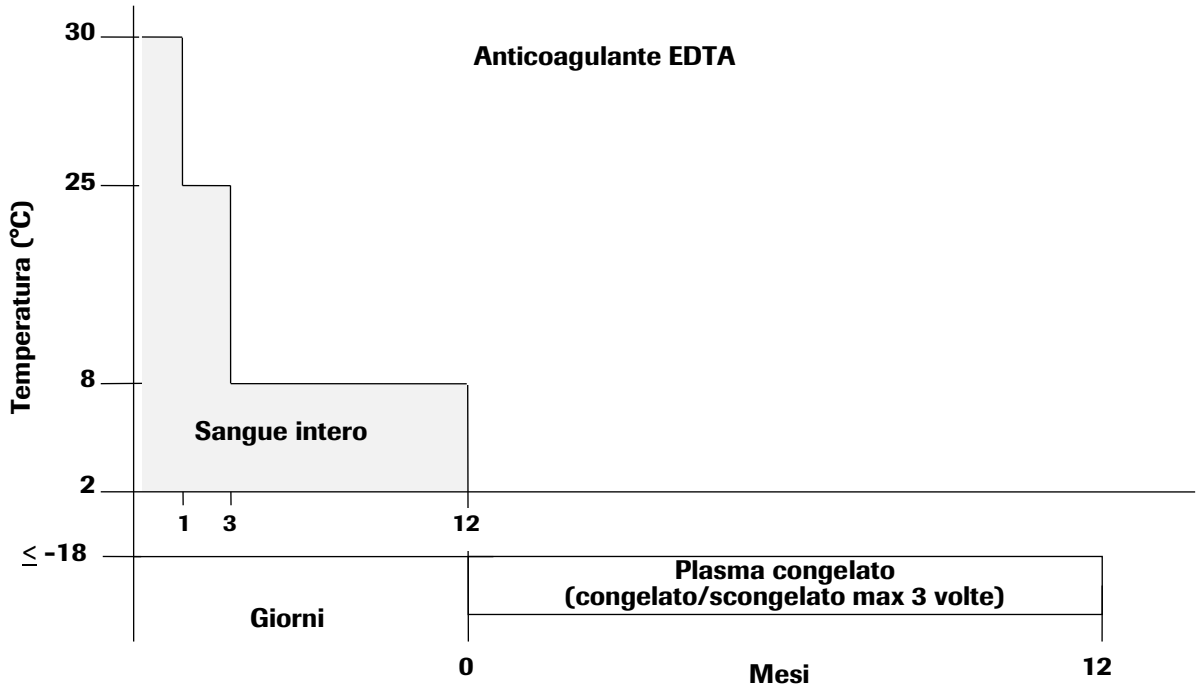
- Il test **cobas**® DPX può essere eseguito su plasma raccolto con gli anticoagulanti EDTA, CPD, CPDA1, CP2D o sodio citrato al 4%. Per la manipolazione e la centrifugazione, attenersi alle istruzioni fornite dal produttore della provetta/sacca di raccolta del campione.
- Il sangue raccolto con gli anticoagulanti CPD, CPDA1, CP2D o con le provette BD PPT™ (Becton-Dickinson EDTA Plasma Preparation Tubes) può essere conservato per un massimo di 12 giorni alle seguenti condizioni:
    - I campioni devono essere centrifugati entro e non oltre 72 ore dal prelievo.
    - Se conservati a più di 8°C, i campioni sono stabili per 72 ore fino a 25°C (e per 24 ore fino a 30°C nell'arco delle 72 ore).
    - A parte nei casi sopra descritti, i campioni devono essere conservati a 2-8°C. Il plasma separato dalle cellule può inoltre essere conservato per 30 giorni a ≤-18°C con tre cicli di congelamento/scongelamento. Vedere la Figura 1.

Figura 1 Condizioni di conservazione dei campioni dei donatori



- Il sangue trattato con l'anticoagulante EDTA può essere conservato per un massimo di 12 giorni nelle condizioni descritte di seguito:
    - I campioni devono essere centrifugati entro e non oltre 72 ore dal prelievo.
    - Se conservati a più di 8°C, i campioni sono stabili per 72 ore fino a 25°C (e per 24 ore fino a 30°C nell'arco delle 72 ore).
    - A parte nei casi sopra descritti, i campioni devono essere conservati a 2-8°C. Il plasma separato dalle cellule può inoltre essere conservato per 12 mesi a ≤-18°C con tre cicli di congelamento/scongelamento. Vedere la Figura 2.

Figura 2 Condizioni di conservazione dei campioni dei donatori



- Il plasma con l'anticoagulante citrato di sodio al 4% può essere conservato per un massimo di 30 giorni a 2-8°C.
    - A più di 8°C, i campioni possono essere conservati per 72 ore ad una temperatura massima di 25°C (e per 24 ore ad una temperatura massima di 30°C nell'arco delle 72 ore).
    - A parte nei casi sopra descritti, i campioni devono essere conservati a 2-8°C. Il plasma separato dalle cellule può inoltre essere conservato per 12 mesi a ≤-18°C con tre cicli di congelamento/scongelamento.

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

Istruzioni per l'uso

Pipettamento automatico dei campioni e creazione di pool (opzionale)

È possibile utilizzare il **cobas p** 680 instrument o **cobas**® **Synergy** Core come componente opzionale dei **cobas**® 6800/8800 Systems per il pipettamento automatico e la creazione di un pool con le aliquote di più campioni primari.

Per ulteriori informazioni, consultare il Manuale Operatore del **cobas p** 680 instrument o l'Assistenza Utente del **cobas**® **Synergy** Software.

Impostazione del valore cut-off per il parvovirus B19

cobas® 6800/8800 Systems

Il responsabile del laboratorio definisce un limite soglia per il titolo B19V, impostando il valore cut-off per i pool costituiti da 1 campione. Il valore specificato viene utilizzato dal software per assegnare un risultato "B19V < cut off " o "B19V ≥ cut off" (Tabella 10). Il software calcola automaticamente il risultato in base al valore cut-off specificato e alla dimensione del pool.

Per assegnare il valore cut-off del titolo B19V:

Il valore cut-off per DPX-B19V è disponibile nell'interfaccia utente, selezionando Amministrazione --> Impostazioni --> Impostazioni preparazione --> Test Roche. Nell'area "Impostazioni" di DPX-B19V ASAP, il valore cut-off può essere impostato utilizzando il pulsante "Modifica".

Soluzione **cobas**® **Synergy**

I risultati finali dei test B19 e DPX sono disponibili soltanto nel **cobas**® **Synergy** Software e non sui **cobas**® 6800/8800 Systems.

Per assegnare il valore cut-off del titolo B19V (in base alla dimensione del pool in UI/ml), attenersi alla descrizione contenuta nell'Assistenza Utente del **cobas**® **Synergy** Software. È consigliabile impostare il valore cut-off su 1 nel software **cobas**® 6800/8800.

Note sulla procedura

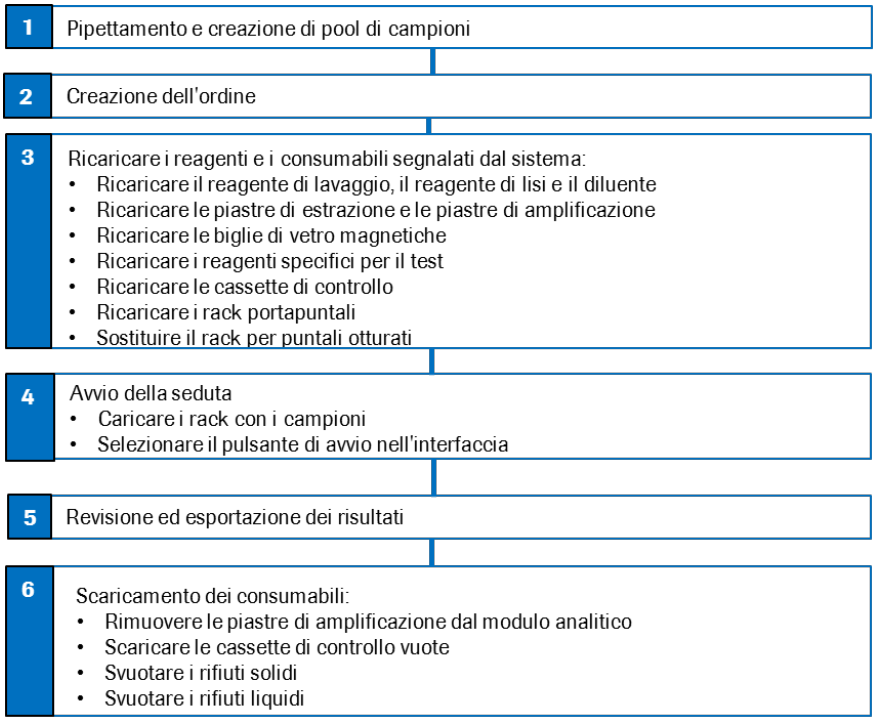
- Non utilizzare i reagenti **cobas**® DPX Test, **cobas**® DPX Control Kit, **cobas**® Buffer Negative Control Kit o **cobas omni** oltre la data di scadenza.
- Non riutilizzare i consumabili. Sono esclusivamente monouso.
- Per informazioni sulla corretta manutenzione degli strumenti, consultare il Manuale Operatore dei **cobas**® 6800/8800 Systems o l'Assistenza Utente del **cobas**® **Synergy** Software.

Esecuzione del test cobas® DPX

La procedura di analisi è descritta dettagliatamente nel Manuale Operatore dei **cobas**® 6800/8800 Systems. Per informazioni dettagliate sulle procedure opzionali per la creazione dei pool, consultare il Manuale Operatore del **cobas p** 680 instrument o l'Assistenza Utente del **cobas**® **Synergy** Software.

Nella Figura 3 è illustrata una sintesi della procedura.

Figura 3 Procedura del test **cobas**® DPX



Risultati

I **cobas**® 6800/8800 Systems rilevano automaticamente la concentrazione del DNA di parvovirus B19 per i campioni dei donatori e i controlli. La concentrazione del DNA di parvovirus B19 si esprime in unità internazionali per millilitro (UI/ml). Inoltre i **cobas**® 6800/8800 Systems rilevano automaticamente l'RNA di HAV per i campioni e i controlli.

Controllo di qualità e validità dei risultati

- Insieme ad ogni batch vengono analizzati un controllo negativo [(–)C] e due controlli positivi [DPX D(+)C e DPX 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 sono presenti flag per nessuno dei tre controlli.

I risultati vengono automaticamente considerati non validi dal software **cobas**® 6800/8800 in caso di fallimento del controllo negativo e dei controlli positivi.

Flag dei controlli

Tabella 9 Flag per i controlli positivi e negativi

Controllo negativo	**Flag**	**Risultato**	**Interpretazione**
(–)C	Q02	Invalid	L'intero batch è considerato non valido se il risultato del controllo (–)C non è valido.
Controllo positivo	**Flag**	**Risultato**	**Interpretazione**
DPX D(+)C	Q02	Invalid	Un risultato non valido, oppure il risultato del titolo calcolato per il parvovirus B19 non rientra nell'intervallo assegnato, oppure il risultato è non reattivo per HAV. Solo B19: un risultato non valido causato dal QS corrispondente, oppure il risultato o il titolo calcolato per il parvovirus B19 non rientrano nell'intervallo assegnato. Solo HAV: un risultato non valido causato dall'IC corrispondente, oppure il risultato è non reattivo per HAV.
DPX H(+)C	Q02	Invalid	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.

Interpretazione dei risultati

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

- Un batch valido può includere risultati sia validi che non validi per i campioni dei donatori, a seconda di quali sono i flag associati ai singoli campioni.
- I risultati dei campioni sono validi soltanto se sono validi i controlli positivi e il controllo negativo del batch corrispondente.

Per ogni campione vengono misurati simultaneamente quattro parametri: uno per il parvovirus B19, uno per l'HAV, uno per lo standard di quantificazione e uno per il controllo interno. I risultati finali del test **cobas**® DPX sono visualizzati nel software. I campioni dei donatori inclusi in un pool non valido dovranno essere analizzati nuovamente. Oltre ai risultati generali, nel software **cobas**® 6800/8800 vengono visualizzati anche i risultati dei singoli target, che dovranno essere interpretati applicando i seguenti criteri:

Tabella 10 Risultati per i singoli target e relativa interpretazione

Risultati dei target	Interpretazione
HAV Non-Reactive	Nessun segnale rilevato per il target HAV; rilevato il segnale IC.
HAV Reactive	Rilevato il segnale per il target HAV; il segnale IC potrebbe essere stato rilevato o non rilevato.
B19 < valore cut-off	Titolo B19 inferiore al cut-off definito dall'utente; titolo fornito. B19 Non-Reactive: nessun segnale rilevato per il target DNA di B19; rilevato il segnale QS. B19 < Titer Min: B19 rilevato e titolo calcolato al di sotto del limite inferiore di quantificazione (LLoQ) del saggio. Nota: **cobas p** 680; il valore cut-off B19 è visualizzato nel **cobas**® 6800/8800 Systems Software. **cobas**® **Synergy**; il valore cut-off B19 è visualizzato nel **cobas**® **Synergy** Software.
B19 ≥ valore cut-off	Titolo B19 superiore al cut-off definito dall'utente; titolo fornito. B19 > Titer Max: titolo calcolato al di sopra del limite superiore di quantificazione (ULoQ) del saggio.[a] Nota: **cobas p** 680; il valore cut-off B19 è visualizzato nel **cobas**® 6800/8800 Systems Software. **cobas**® **Synergy**; il valore cut-off B19 è visualizzato nel **cobas**® **Synergy** Software.
Invalid	Segnale del target HAV e segnale IC non rilevati. I risultati non reattivi per l'HAV verranno classificati come Invalid se il titolo B19 è $>10^6$ UI/ml. Segnale QS B19 non rilevato; il target B19 potrebbe essere stato rilevato o non rilevato.

[a] Se si desidera ottenere un risultato quantitativo, è necessario diluire il campione originale con plasma EDTA umano negativo per il parvovirus B19 e ripetere il test. Moltiplicare il risultato ottenuto per il fattore di diluizione.

Test di ripetizione su singolo campione

Le provette campione che generano il risultato finale Invalid per un target devono essere analizzate di nuovo, anche se hanno generato risultati validi per gli altri target. Il risultato del test di ripetizione di un campione classificato come Invalid per l'HAV a causa di un alto titolo B19 (> 10^6 UI/ml) resterà non valido.

Limiti della procedura

- Il test **cobas**® DPX è stato valutato soltanto in combinazione con i prodotti **cobas**® DPX Control Kit, **cobas**® Buffer 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**® 6800/8800 Systems.
- L'affidabilità dei risultati è influenzata dal metodo di raccolta, conservazione e manipolazione dei campioni.
- Con questo test non è consentito utilizzare plasma con eparina, poiché l'eparina svolge un'azione inibitoria sulla PCR.
- Anche se rare, le mutazioni nelle regioni altamente conservate di un genoma virale coperte dal test **cobas**® DPX 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, è consigliabile che gli utenti, prima di passare da una tecnologia a un'altra, svolgano studi sulla correlazione tra i metodi nei propri laboratori alla scopo di qualificare tali differenze. Si consiglia agli utenti di elaborare norme/procedure specifiche.

Valutazione delle prestazioni non cliniche

Caratteristiche delle prestazioni (campioni da donatori viventi)

Limite di sensibilità (LoD)

Standard Internazionali OMS

I limiti di sensibilità (Limits of Detection, LoD) del test **cobas**® DPX sia per l'RNA di HAV che per il DNA di parvovirus B19 sono stati determinati utilizzando gli standard internazionali dell'OMS per l'HAV (codice NIBSC 00/560) e per il parvovirus B19 (codice NIBSC 99/802).

Sono state preparate tre serie di diluizioni indipendenti di ogni standard virale, utilizzando dei pool di plasma umano normale, negativo ai virus, raccolto nell'anticoagulante EDTA. Ogni serie di diluizioni è stata analizzata con tre diversi lotti di reagenti **cobas**® DPX, con circa 21 ripetizioni per lotto, per un totale di circa 189 ripetizioni per concentrazione. L'analisi PROBIT dei dati combinati, ottenuti da tutte le ripetizioni analizzate per ogni virus, ha consentito di stimare il valore LoD e gli intervalli di confidenza bilaterali al 95%. I risultati complessivi dello studio sul limite di sensibilità sono riassunti dalla Tabella 11 alla Tabella 13.

Tabella 11 Risultati dell'analisi PROBIT sui dati del limite di sensibilità raccolti con gli standard virali in plasma EDTA

Analita	Unità di misura	LoD	Limite inferiore di confidenza al 95%	Limite superiore di confidenza al 95%
HAV	UI/ml	1,1	0,9	1,3
Parvovirus B19	UI/ml	13,9	11,7	17,4

Tabella 12 Riepilogo delle percentuali di reattività per HAV in plasma EDTA

Concentrazione dell'RNA di HAV (UI/ml)	N. reattivi	N. ripetizioni valide	% reattivi	Limite inferiore di confidenza al 95% (monolaterale)
6	189	189	100%	98,1%
3	189	189	100%	98,1%
1,5	186	189	98,4%	98,9%
0,75	165	189	87,3%	81,7%
0,375	119	189	63,0%	55,7%

Tabella 13 Riepilogo delle percentuali di reattività per parvovirus B19 in plasma EDTA

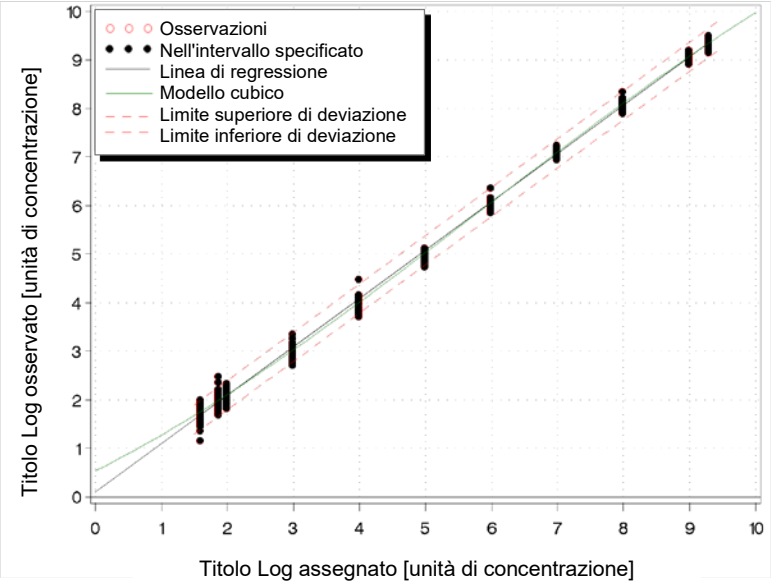
Concentrazione del DNA di parvovirus B19 (UI/ml)	N. reattivi	N. ripetizioni valide	% reattivi	Limite inferiore di confidenza al 95% (monolaterale)
40	187	189	98,9%	96,2%
20	184	189	97,4%	93,9%
10	175	189	92,6%	87,9%
5	145	189	76,7%	70,0%
2,5	91	189	48,1%	40,8%

Intervallo lineare della quantificazione del parvovirus B19

Lo studio sulla linearità della quantificazione del parvovirus B19 con il test **cobas**® DPX è stato eseguito utilizzando una serie di diluizioni, costituita da un pannello di 12 campioni rappresentativi dell'intervallo lineare previsto per il genotipo 1 predominante di parvovirus B19. La valutazione è avvenuta in conformità alle linee guida CLSI EP6-A. Sono stati analizzati tre lotti di reagenti su tre **cobas**® 6800/8800 Systems, utilizzati da tre operatori, per un totale di 16 ripetizioni per ogni campione del pannello e lotto nell'arco di 12 giorni.

Lo studio è stato condotto con tre lotti di reagenti. L'intervallo lineare, che è stato fissato tra 40 UI/ml e 1,00E+09 UI/ml (38,5 UI/ml - 1,93E+09 UI/ml), mostra una deviazione assoluta dalla regressione nonlineare di migliore adattamento inferiore a ±0,3 $\log_{10}$ in plasma EDTA umano (Figura 4).

Figura 4 Definizione dell'intervallo lineare per parvovirus B19 in plasma EDTA



Riproducibilità

La riproducibilità del test **cobas**® DPX è stata valutata utilizzando tre lotti di reagenti, tre giorni, quattro sistemi/operatori e con riferimento alla variabilità tra sessioni. I risultati relativi ai lotti di reagenti sono riassunti nella Tabella 14.

Tabella 14 Riproducibilità tra lotti di reagenti

Analita	Concentrazione	Lotto di reagenti	% reattivi (ripetizioni reattive/valide)	Limite inferiore dell'intervallo di confidenza al 95%	Limite superiore dell'intervallo di confidenza al 95%
HAV	2 x LoD	1	100,0% (63/63)	94,3%	100,0%
		2	100,0% (63/63)	94,3%	100,0%
		3	100,0% (63/63)	94,3%	100,0%
	1 x LoD	1	98,4% (62/63)	91,5%	100,0%
		2	96,8% (61/63)	89,0%	99,6%
		3	100,0% (63/63)	94,3%	100,0%
	0,5 x LoD	1	79,4% (50/63)	67,3%	88,5%
		2	90,5% (57/63)	80,4%	96,4%
		3	92,1% (58/63)	82,4%	97,4%

Precisione

La precisione del test **cobas**® DPX con riferimento al parvovirus B19 è stata determinata analizzando diluizione seriali di un campione positivo al parvovirus B19 in plasma EDTA negativo. Sono stati analizzati otto livelli di diluizione in 48 ripetizioni per livello, con tre lotti di reagenti del test **cobas**® DPX, utilizzando tre strumenti e tre operatori per 12 giorni. Ogni campione è stato sottoposto all'intera procedura prevista per il test **cobas**® DPX, che è completamente automatizzata sui **cobas**® 6800/8800 Systems. La precisione riferita in questa sede è dunque rappresentativa di tutti gli aspetti della procedura del test. I risultati sono illustrati nella Tabella 15.

La precisione del test **cobas**® DPX per il parvovirus B19 è risultata elevata con i tre lotti di reagenti analizzati, lungo tutto l'intervallo di concentrazione compreso tra 1,00 E+03 UI/ml e 2,0 E+09 UI/ml.

Tabella 15 Precisione intra-laboratorio del test **cobas**® DPX*

Concentrazione nominale (UI/ml)	Concentrazione assegnata (UI/ml)	Materiale di origine	Plasma EDTA			
			Lotto 1	Lotto 2	Lotto 3	Tutti i lotti
			DS	DS	DS	DS in pool
2,00E+09	1,93E+09	Campione clinico	0,08	0,05	0,04	0,06
1,00E+09	9,63E+08	Campione clinico	0,05	0,06	0,04	0,05
1,00E+08	9,63E+07	Campione clinico	0,04	0,07	0,04	0,05
1,00E+07	9,63E+06	Campione clinico	0,04	0,04	0,03	0,04
1,00E+06	9,63E+05	Campione clinico	0,12	0,04	0,04	0,08
1,00E+05	9,63E+04	Campione clinico	0,06	0,05	0,02	0,05
1,00E+04	9,63E+03	Campione clinico	0,06	0,12	0,04	0,08
1,00E+03	9,63E+02	Campione clinico	0,05	0,09	0,04	0,06

*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.

Inclusività del genotipo (HAV)

Le prestazioni del test **cobas**® DPX con riferimento all'identificazione dei tre genotipi di HAV sono state determinate analizzando 12 campioni clinici univoci, lo standard OMS per l'HAV (codice NIBSC 00/560) e ben otto isolati da coltura di HAV con genotipi noti. Tutti i campioni clinici e gli isolati da coltura sono stati quantificati con il test **cobas**® DPX, applicando il metodo di bracketing del calibratore. Tutti i campioni clinici sono stati analizzati sia in forma non diluita, sia dopo essere stati diluiti con plasma EDTA umano normale, negativo al virus HAV, ad una concentrazione di 3,6 × LoD del test **cobas**® DPX. Tutti gli otto isolati da coltura e lo standard OMS per l'HAV sono stati analizzati dopo essere stati diluiti con plasma EDTA umano normale, negativo al virus HAV, ad una concentrazione di 3,6 × LoD del test **cobas**® DPX. Tutti i campioni clinici e gli isolati da coltura sono stati identificati in forma non diluita e/o a 3,6 × LoD (Tabella 16).

Tabella 16 Campioni clinici e isolati da coltura di HAV

Genotipo	Campioni clinici		Isolati da coltura
	% reattivi (n. reattivi/n. campioni analizzati) non diluiti	% reattivi (n. reattivi/n. campioni analizzati) diluiti a 3,6 x LoD	% reattivi (n. reattivi/n. campioni analizzati) diluiti a 3,6 x LoD
I A	100,0% (11/11)	100,0% (12/12)**	non analizzato*
I B	100,0% (1/1)	100,0% (1/1)	100,0% (1/1)
II A	non analizzato*	non analizzato*	100,0% (1/1)
II B	non analizzato*	non analizzato*	100,0% (1/1)
III A	non analizzato*	non analizzato*	100,0% (3/3)
III B	non analizzato*	non analizzato*	100,0% (2/2)

* Volume insufficiente per eseguire il test senza diluizione/con diluizione

** Standard OMS per HAV (codice NIBSC 00/560) incluso

Verifica del genotipo per il parvovirus B19

Le prestazioni del test **cobas**® DPX rispetto ai genotipi del parvovirus B19 sono state valutate con i seguenti metodi:

- Verifica del limite di sensibilità per i genotipi 1, 2 e 3
- Verifica della linearità per i genotipi 2 e 3.

Verifica del limite di sensibilità per i genotipi dall'1 al 3

I campioni clinici di DNA di parvovirus B19 appartenenti a tre diversi genotipi (1, 2, 3a) sono stati diluiti in plasma EDTA fino ad un certo livello di concentrazione. Il plasmide del parvovirus B19 per il genotipo 3b è stato diluito in plasma EDTA fino ad un certo livello di concentrazione. Il calcolo del tasso di reattività è stato effettuato eseguendo 21 ripetizioni. I test sono stati eseguiti utilizzando un lotto di reagenti **cobas**® DPX. I risultati ottenuti con il plasma EDTA sono riassunti nella Tabella 17. Questi risultati confermano che il test **cobas**® DPX ha rilevato il DNA del parvovirus B19 per tre differenti genotipi a concentrazioni comprese tra 10,3 UI/ml e 17,4 UI/ml con un tasso di reattività del 100%.

Tabella 17 Inclusività dei genotipi di parvovirus B19

Genotipo	Concentrazione	% reattivi (ripetizioni reattive/valide)	Limite inferiore dell'intervallo di confidenza al 95%	Limite superiore dell'intervallo di confidenza al 95%
1	17,4 UI/ml	100% (21/21)	83,9%	100,0%
2	10,3 UI/ml	100% (21/21)	83,9%	100,0%
3a	10,3 UI/ml	100% (21/21)	83,9%	100,0%
3b	17,4 UI/ml	100% (20/20)	83,2%	100,0%

Verifica dell'intervallo lineare per i genotipi 2 e 3a

La serie di diluizioni utilizzata per la verifica dello studio di linearità del test **cobas**® DPX rispetto ai genotipi era costituita da un pannello di sette campioni, rappresentativi dell'intervallo lineare previsto. Per la preparazione dei campioni del pannello, i componenti con titolo alto sono stati preparati da uno stock di DNA plasmide con titolo alto e i campioni con titolo basso sono stati preparati a partire dal 1° pannello di riferimento internazionale dell'OMS per i genotipi di parvovirus B19 (NIBSC 09/110). Il pannello dello studio di linearità è stato concepito prevedendo una sovrapposizione del titolo di 2 $\log_{10}$ circa tra i due materiali di origine. L'intervallo lineare del test **cobas**® DPX era compreso tra LLoQ (40 UI/ml) e ULoQ (1,00E+09 UI/ml) e includeva una concentrazione ritenuta significativa per le decisioni mediche. I test sono stati eseguiti utilizzando un lotto di reagenti **cobas**® DPX, con 11 ripetizioni per livello in plasma EDTA. L'intervallo lineare del test **cobas**® DPX è stato verificato per entrambi i genotipi 2 e 3a. La deviazione massima tra le regressione lineare e la regressione nonlineare di migliore adattamento è risultata minore o uguale a 0,3 $\log_{10}$.

Specificità analitica

È stata valutata la specificità analitica del test **cobas**® DPX con riferimento alla reattività crociata, analizzando un pannello di 27 microrganismi ad una concentrazione di 10^6 particelle, UI, copie o CFU/ml, come illustrato nella Tabella 18. Questi microrganismi sono stati aggiunti ai pool di plasma umano normale, negativo ai virus, e sono stati analizzati con e senza l'aggiunta di HAV o di parvovirus B19 ad una concentrazione approssimativa di 3 × LoD (HAV) e di 5 × LLoQ (parvovirus B19) rispetto ai limiti di sensibilità del test **cobas**® DPX. Sono stati ottenuti risultati non reattivi eseguendo il test **cobas**® DPX su tutti i campioni contenenti i microrganismi senza l'aggiunta di HAV o parvovirus B19; sono stati ottenuti tutti risultati reattivi dai campioni contenenti i microrganismi e arricchiti con HAV o parvovirus B19. Inoltre, per ognuno dei campioni positivi al parvovirus B19 contenenti organismi che possono causare potenziali reazioni crociate, la media del titolo $\log_{10}$ si è attestata entro ±0,5 $\log_{10}$ della media del titolo $\log_{10}$ del rispettivo controllo spike. I microrganismi analizzati non producono una reazione crociata con il test **cobas**® DPX.

I microrganismi analizzati non producono interferenze con il test **cobas**® DPX.

Tabella 18 Microrganismi analizzati ai fini della specificità analitica

Virus	Flavivirus	Batteri	Lieviti
Adenovirus 5	Virus del Nilo Occidentale (WNV)	*Escherichia coli*	*Candida albicans*
Virus della chikungunya	Virus Dengue tipo 1	*Propionibacterium acnes*	
Citomegalovirus (CMV)	Virus Usutu	*Staphylococcus aureus*	
Virus di Epstein Barr (EBV)		*Staphylococcus epidermidis*	
Virus dell'epatite B (HBV)		*Staphylococcus haemolyticus*	
Virus dell'epatite C (HCV)		*Streptococcus viridans*	
Virus dell'epatite E (HEV)			
Virus dell'epatite G (GBV C)			
Virus dell'herpes simplex tipo 1 (HSV-1)			
Virus dell'herpes simplex tipo 2 (HSV-2)			
Herpesvirus umano 6A (HHV-6)			
Virus dell'immunodeficienza umana (sottotipi HIV-1M e HIV-2)			
Virus linfotropico delle cellule T umane tipo I (HTLV I)			
Virus linfotropico delle cellule T umane tipo II (HTLV II)			
Virus dell'influenza A			
Virus varicella-zoster (VZV)			

I campioni di plasma ottenuto da ciascuna delle condizioni patologiche elencate nella Tabella 19 sono stati analizzati con e senza l'aggiunta di HAV o di parvovirus B19 ad una concentrazione approssimativa di 3 × LoD (HAV) e di 5 × LLoQ (parvovirus B19) rispetto ai limiti di sensibilità del test **cobas**® DPX. Il test **cobas**® DPX ha generato risultati non reattivi per i campioni rappresentativi di tutti gli stati patologici, non arricchiti con HAV o parvovirus B19. Il test **cobas**® DPX ha generato risultati reattivi per i campioni rappresentativi di tutti gli stati patologici, arricchiti con HAV o parvovirus B19. Inoltre, per ognuno dei campioni positivi al parvovirus B19 contenenti organismi che possono causare potenziali reazioni crociate, la media del titolo $\log_{10}$ si è attestata entro ±0,5 $\log_{10}$ della media del titolo $\log_{10}$ del rispettivo controllo spike. Gli stati patologici analizzati non producono interferenze con il test **cobas**® DPX.

Tabella 19 Campioni degli stati patologici analizzati ai fini della specificità analitica

Stato patologico		
Adenovirus tipo 5	Virus dell'epatite C	Virus linfotropico delle cellule T umane tipo I
Citomegalovirus	Virus dell'epatite E	Virus linfotropico delle cellule T umane tipo II
Virus Dengue	Virus dell'Herpes simplex tipo 1	Virus del Nilo Occidentale
Virus di Epstein Barr	Virus dell'Herpes simplex tipo 2	
Virus dell'epatite B	Virus dell'immunodeficienza umana (HIV-1M)	

Specificità analitica e sostanze interferenti

Sostanze interferenti di tipo endogeno

Campioni di plasma contenenti livelli patologicamente elevati di trigliceridi (fino a 33 g/l), emoglobina (fino a 2 g/l), bilirubina non coniugata (fino a 0,2 g/l), bilirubina coniugata (fino a 0,2 g/l), albumina (fino a 60 g/l) o DNA umano (fino a 1,8 mg/l) sono stati analizzati con e senza l'aggiunta di HAV o di parvovirus B19 ad una concentrazione approssimativa di 3 × LoD (per HAV) e di 5 × LLoQ (per parvovirus B19), ovvero i limiti di sensibilità del test **cobas**® DPX. I campioni contenenti queste sostanze endogene non hanno interferito con la sensibilità, la quantificazione o la specificità del test **cobas**® DPX.

Sostanze interferenti di tipo esogeno

Sono stati analizzati alcuni campioni di plasma EDTA umano normale, negativi ai virus, contenenti concentrazioni particolarmente elevate di farmaci (Tabella 20) e arricchiti con HAV e parvovirus B19 ad una concentrazione approssimativa di 3 × LoD (per HAV) e di 5 × LLoQ (per parvovirus B19), ovvero i limiti di sensibilità del test **cobas**® DPX. Queste sostanze esogene non hanno interferito con la sensibilità, la quantificazione o la specificità del test **cobas**® DPX.

Tabella 20 Campioni clinici analizzati con vari principi attivi

Nome del principio attivo	Concentrazione
Acetaminofene (paracetamolo)	1324 µmol/l
Acido acetilsalicilico (aspirina)	3620 µmol/l
Acido ascorbico (vitamina C)	342 µmol/l
Atorvastatina	600 µg Eq/l
Fluoxetina	11,2 µmol/l
Ibuprofene	2425 µmol/l
Loratadina	0,78 µmol/l
Nadololo	3,88 µmol/l
Naprossene	2170 µmol/l
Paroxetina	3,04 µmol/l
Fenilefrina Cloridrato	491 µmol/l
Sertralina	1,96 µmol/l

Correlazione

Valutazione delle prestazioni del test cobas® DPX rispetto al test cobas® TaqScreen DPX

Le prestazioni del test **cobas**® DPX e del test **cobas**® TaqScreen DPX sono state messe a confronto utilizzando 84 campioni di plasma HAV-positivi in base ai test NAT, 100 campioni di plasma parvovirus B19-positivi in base ai test NAT e 100 campioni negativi a entrambi i virus HAV e parvovirus B19.

I campioni negativi hanno evidenziato una specificità del 100%, generando 100 risultati non reattivi su 100 totali con entrambi i metodi.

Nel caso dei campioni HAV-positivi, il test **cobas**® DPX e il test **cobas**® TaqScreen DPX hanno prodotto risultati concordanti per 84 campioni su 84 (Tabella 21). La concordanza percentuale positiva è stata dunque del 100%.

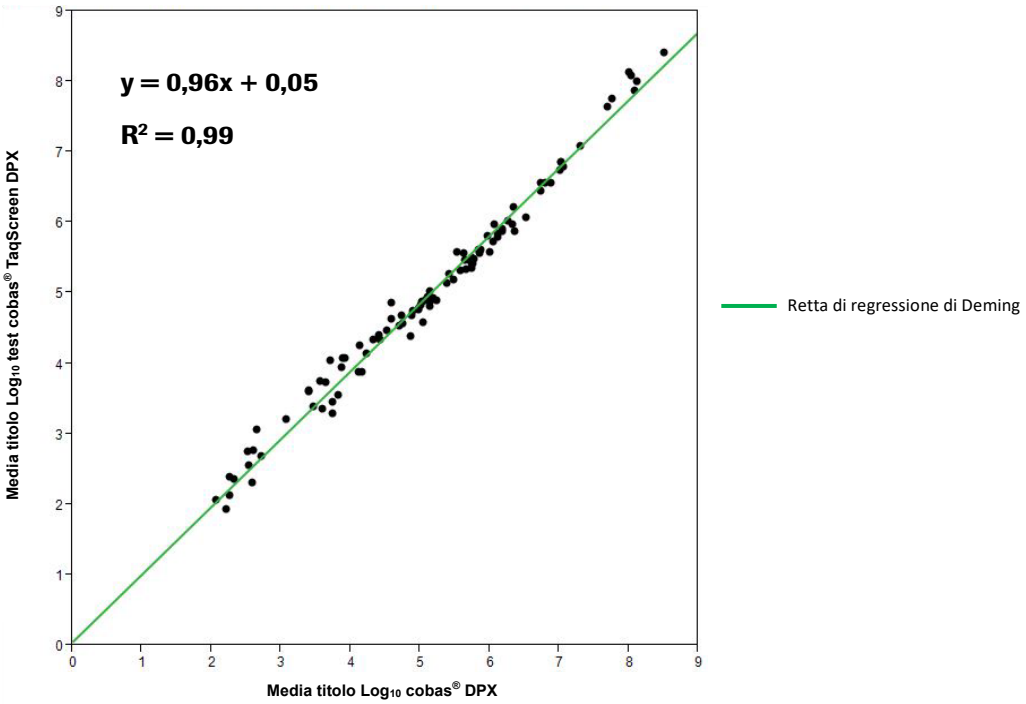
Tabella 21 Correlazione tra campioni positivi/negativi per HAV

Metodi		Risultati per HAV	
cobas® TaqScreen DPX	**cobas® DPX**	**Campioni positivi**	**Campioni negativi**
Non reattivi	Non reattivi	0	100
Reattivi	Non reattivi	0	0
Non reattivi	Reattivi	0	0
Reattivi	Reattivi	84	0
Totale		84	100
Test di McNemar, valore p (bilaterale, $\alpha = 0,05$)		1,00	1,00

I campioni parvovirus B19-positivi sono stati analizzati in duplicato con il test **cobas**® DPX e con il test **cobas**® TaqScreen DPX. È stata applicata l'analisi di regressione di Deming. La deviazione del titolo medio dei campioni analizzati con i due test è stata di 0,15 $\log_{10}$. Inoltre entro l'intervallo dei titoli (tra 1,0E+03 e 1,0E+06 UI/ml), la deviazione del titolo medio con i due test è stata di 0,14 $\log_{10}$.

I risultati della regressione di Deming sono riportati nella Figura 5.

Figura 5 Analisi di regressione del test **cobas**® DPX rispetto al test **cobas**® TaqScreen DPX, 100 campioni positivi (parvovirus B19)



Tasso globale d'errore del sistema

Il tasso globale d'errore del sistema per il test **cobas**® DPX è stato calcolato ripetendo 100 test su campioni di plasma EDTA, arricchiti con HAV e con parvovirus B19. L'analisi è stata eseguita ad una concentrazione del target di circa 3 × LoD e utilizzando pool costituiti da un solo campione (non diluito). Per questo studio sono stati utilizzati il **cobas**® 8800 System e il **cobas p** 680 instrument (pipettamento e creazione di pool).

Lo studio dimostra che tutte le ripetizioni dei test hanno prodotto risultati reattivi per il parvovirus B19, pertanto il tasso globale d'errore del sistema è dello 0%. L'intervallo di confidenza esatto al 95% bilaterale è pari allo 0% per il limite inferiore e al 3,62% per il limite superiore [0%: 3,62%].

Lo studio dimostra che 99 ripetizioni su 100 hanno prodotto risultati reattivi per l'HAV, pertanto il tasso globale d'errore del sistema è dell'1%. L'intervallo di confidenza esatto al 95% bilaterale è pari allo 0% per il limite inferiore e al 5,45% per il limite superiore [0%: 5,45%].

Contaminazione crociata

Il tasso di contaminazione crociata del test **cobas**® DPX è stato calcolato eseguendo 239 ripetizioni su un tampone di controllo negativo e 223 ripetizioni su un campione con alto titolo di parvovirus B19, ad una concentrazione di 1,00E+08 UI/ml. Lo studio è stato eseguito con il **cobas**® 8800 System. Complessivamente sono state eseguite cinque sedute con campioni positivi e negativi in una configurazione a scacchiera.

Tutte le 239 ripetizioni del tampone di controllo negativo hanno prodotto risultati non reattivi, pertanto il tasso di contaminazione crociata è dello 0%. L'intervallo di confidenza esatto al 95% bilaterale è pari allo 0% per il limite inferiore e all'1,53% per il limite superiore [0%: 1,53%].

Performance clinica

Riproducibilità

La riproducibilità del test **cobas**® DPX è stata dimostrata analizzando un pannello di 16 membri, costituito da due membri di plasma negativi all'HAV e sotto il limite inferiore di quantificazione (LLOQ) per il parvovirus B19, e da 14 campioni di plasma positivi, comprendenti due campioni positivi all'HAV a ciascuna delle 3 diverse concentrazioni (circa 0,5 ×, 1,0 × e 3,0 × LoD del test **cobas**® DPX per HAV) e due campioni di parvovirus B19 a ciascuna delle 4 diverse concentrazioni (tra 10^3 e 10^6 UI/ml).

Gli operatori in ognuno dei tre siti di prova del **cobas**® DPX hanno eseguito cinque giorni di test, usando 3 lotti di reagenti **cobas**® DPX per ottenere due batch validi ogni giorno. Sono stati analizzati due replicati per concentrazione in modo da ottenere un massimo di 180 test per virus del membro del pannello ad ognuna delle tre concentrazioni per il virus HAV e ad ognuna delle quattro concentrazioni per il parvovirus B19.

Per il virus HAV, tutti i batch validi e i risultati dei test validi sono stati analizzati calcolando la percentuale di risultati reattivi per ogni membro del pannello e la percentuale di risultati non reattivi per ogni membro del pannello di controllo negativo (Tabella 22). Lo studio ha dimostrato che il test **cobas**® DPX ha prestazioni riproducibili con tutte le variabili considerate (lotto, sito/strumento, giorno, batch e all'interno del batch) per ognuna delle tre diverse concentrazioni di HAV analizzate.

Tabella 22 Risultati del test HAV riepilogati per sito/strumento, lotto, giorno e batch (membri del pannello positivi)

				Numero di test reattivi/Numero totale di risultati validi											
Concentrazione HAV	**Ct medio**	**DS Ct**	**CV% Ct**	**Lotto**			**Laboratorio/ strumento**			**Giorno**			**Batch**		
				ID	**Reattivi/ Validi**	**%**	**ID**	**Reattivi/ Validi**	**%**	**ID**	**Reattivi/ Validi**	**%**	**ID**	**Reattivi/ Validi**	**%**
0,5 x LoD	37,50	0,799	2,1	1	53/60	88,3	1	48/60	80,0	1	30/36	83,3	1	76/90	84,4
				2	48/60	80,0	2	51/60	85,0	2	33/36	91,7	2	77/90	85,6
				3	52/60	86,7	3	54/60	90,0	3	31/36	86,1			
										4	26/36	72,2			
										5	33/36	91,7			
1,0 x LoD	37,04	0,763	2,1	1	57/59	96,6	1	55/60	91,7	1	34/36	94,4	1	88/89	98,9
				2	58/60	96,7	2	59/59	100,0	2	35/35	100,0	2	85/90	94,4
				3	58/60	96,7	3	59/60	98,3	3	36/36	100,0			
										4	34/36	94,4			
										5	34/36	94,4			
3,0 x LoD	35,95	0,725	2,0	1	60/60	100,0	1	60/60	100,0	1	36/36	100,0	1	90/90	100,0
				2	60/60	100,0	2	60/60	100,0	2	36/36	100,0	2	90/90	100,0
				3	60/60	100,0	3	60/60	100,0	3	36/36	100,0			
										4	36/36	100,0			
										5	36/36	100,0			

Nota: Ct = Ciclo soglia

Per il parvovirus B19, tutti i batch e i risultati dei test validi sono stati analizzati calcolando la deviazione standard per ognuna delle variabili (lotto, sito/strumento, giorno, batch e all'interno del batch) e la deviazione standard della precisione totale per ogni concentrazione di B19 (Tabella 23). Lo studio ha dimostrato che il test **cobas**® DPX ha prestazioni riproducibili con tutte le variabili considerate (lotto, sito/strumento, giorno, batch e all'interno del batch) per ognuna delle quattro diverse concentrazioni del parvovirus B19 analizzate.

Tabella 23 Risultati del test del Parvovirus B19 riepilogati per sito/strumento, lotto, giorno e batch (membri del pannello positivi)

Concentrazione del DNA di B19 attesa (log_{10} UI/ml)	Concentrazione del DNA di B19 attesa (UI/ml)	Concentrazione del DNA di B19 media (log_{10} UI/ml)	Concentrazione del DNA di B19 media log-normale (UI/ml)[a]	N. di test[b]	Lotto	Sito/ Strum.	Giorno	Batch	All'interno del batch	Deviazione standard totale della concentrazione del DNA di B19 (log_{10})
3,000	1000	3,09	1252	176	0,0444	0,0092	0,0000	0,0000	0,0559	0,072
4,000	10000	4,04	11008	178	0,0348	0,0141	0,0248	0,0135	0,0543	0,072
5,000	100000	5,04	111745	179	0,0305	0,0221	0,0000	0,0265	0,0663	0,081
6,000	1000000	6,08	1216471	179	0,0248	0,0181	0,0166	0,0141	0,0718	0,081

[a] Media log-normale = $10^{\hat{\mu}+\hat{\sigma}^2 \bullet 1.151}$ media e deviazione standard sono stime ricavate dai modelli a componenti di varianza di effetti casuali.

[b] Numero di test con carica virale rilevabile. Sono stati programmati almeno 180 test per ogni membro del pannello. I test non validi non sono stati ripetuti.

Informazioni supplementari

Caratteristiche del test

Tipo di campione	Plasma
Quantità di campione necessaria	1000 µl
Quantità di campione analizzata	850 µl
Durata del test	I risultati sono disponibili in meno di 3 ore e 30 minuti dal caricamento del campione sul sistema.

Simboli

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

Tabella 24 Simboli utilizzati sulle etichette dei prodotti diagnostici PCR di Roche

	Software ausiliario		Dispositivo medico-diagnostico *in vitro*
	Mandatario nella Comunità Europea		Limite inferiore dell'intervallo assegnato
	Foglio di dati del codice a barre		Fabbricante
	Codice del lotto		Conservare al buio
	Rischio biologico		Contenuto sufficiente per <*n*> test
	Numero di catalogo		Limiti di temperatura
	Consultare le istruzioni per l'uso		File di definizione del test
	Contenuto del kit		Limite superiore dell'intervallo assegnato
	Distribuito da		Utilizzare entro la data
	Solo per valutazione delle prestazioni IVD		Global Trade Item Number
Rx Only	Solo USA: la legge federale degli Stati Uniti limita la vendita di questo dispositivo a personale medico abilitato o provvisto di prescrizione medica.		
	Questo prodotto è conforme ai requisiti della Direttiva Europea 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici *in vitro*.		

Assistenza Tecnica ai clienti USA 1-800-526-1247

Produttore e distributori

Tabella 25 Produttore e distributori

Fabbricato negli USA

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, Germany
www.roche.com

Roche Diagnostics (Schweiz) AG
Industriestrasse 7
6343 Rotkreuz, Switzerland

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, Germany

Roche Diagnostics, SL
Avda. Generalitat, 171-173
E-08174 Sant Cugat del Vallès
Barcelona, Spain

Roche Diagnostica Brasil Ltda.
Av. Engenheiro Billings, 1729
Jaguaré, Building 10
05321-010 São Paulo, SP Brazil

Roche Diagnostics
201, boulevard Armand-Frappier
H7V 4A2 Laval, Québec, Canada
(For Technical Assistance call:
Pour toute assistance technique,
appeler le: 1-877-273-3433)

Roche Diagnostics
2, Avenue du Vercors
38240 Meylan, France

Distributore in Italia:
Roche Diagnostics S.p.A.
Viale G. B. Stucchi 110
20052 Monza, Milano, Italy

Distribuidor em Portugal:
Roche Sistemas de Diagnósticos Lda.
Estrada Nacional, 249-1
2720-413 Amadora, Portugal

Marchi e brevetti

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

Copyright

©2019 Roche Molecular Systems, Inc.

Bibliografia

1. Blümel J, Burger R, Drosten C, et al. Parvovirus B19 - Revised. Transfus Med Hemother. 2010;37:339-350.
2. Molenaar-deBacker MW, Lukashov VV, vanBinnendijk RS, Boot HJ, Zaaijer HL. Global co-existence of two evolutionary lineages of parvovirus B19 1a, different in genome-wide synonymous positions. PLoS One. 2012;7:e43206.
3. Servant A, Laperche S, Lallemand F, et al. Genetic diversity within human erythroviruses: identification of three genotypes. J Virol. 2002;76:9124-9134.
4. Heegaard ED, Brown KE. Human parvovirus B19. Clin Microbiol Rev. 2002;15:485-505.
5. Vyse AJ, Andrews NJ, Hesketh LM, Pebody R. The burden of parvovirus B19 infection in women of childbearing age in England and Wales. Epidemiol Infect. 2007;135:1354-1362.
6. Röhrer C, Gärtner B, Sauerbrei A, et al. Seroprevalence of parvovirus B19 in the German population. Epidemiol Infect. 2008;136:1564-1575.
7. Valentin MN, Cohen PJ. Pediatric parvovirus B19: spectrum of clinical manifestations. Cutis. 2013;92:179-184.
8. Young NS, Brown KE. Parvovirus B19. N Engl J Med. 2004;350:586-597.
9. Oiwa H, Shimada T, Hashimoto M, et al. Clinical findings in parvovirus B19 infection in 30 adult patients in Kyoto. Mod Rheumatol. 2011;21:24-31.
10. Waza K, Inoue K, Matsumura S. Symptoms associated with parvovirus B19 infection in adults: a pilot study. Intern Med. 2007;46:1975-1978.
11. Lassen J, Jensen AK, Bager P, et al. Parvovirus B19 infection in the first trimester of pregnancy and risk of fetal loss: a population-based case-control study. Am J Epidemiol. 2012;176;803-807.
12. Lamont RF, Sobel JD, Vaisbuch E, et al. Parvovirus B19 infection in human pregnancy. BJOG. 2011;118:175-186.
13. Sarfraz AA, Samuelsen SO, Bruu AL, Jenum PA, Eskild A. Maternal human parvovirus B19 infection and the risk of fetal death and low birthweight: a case-control study within 35 940 pregnant women. BJOG. 2009;116:1492-1498.
14. Kleinman SH, Glynn SA, Lee TH, et al., National Heart, Lung, Blood Institute Retrovirus Epidemiology Donor Study-II (REDS-II). Prevalence and quantitation of parvovirus B19 DNA levels in blood donors with a sensitive polymerase chain reaction screening assay. Transfusion. 2007;47:1756-1764.
15. Thomas I, Di Giambattista M, Gérard C, et al. Prevalence of human erythrovirus B19 DNA in healthy Belgian blood donors and correlation with specific antibodies against structural and non-structural viral proteins. Vox Sang. 2003;84:300-307.
16. Candotti D, Etiz N, Parsyan A, Allain JP. Identification and characterization of persistent human erythrovirus infection in blood donor samples. J Virol. 2004;78:12169-12178.
17. Plentz A, Hahn J, Knöll A, Holler E, Jilg W, Modrow S. Exposure of hematologic patients to parvovirus B19 as a contaminant of blood cell preparations and blood products. Transfusion. 2005;45:1811-1815.
18. Lee TH, Kleinman SH, Wen L, et al., NHLBI Retrovirus Epidemiology Donor Study-II (REDS-II). Distribution of parvovirus B19 DNA in blood components and persistence of virus in blood donors. Transfusion. 2011;51:1896-1908.
19. Koppelman MH, Cuypers HT, Emrich T, Zaaijer HL. Quantitative real-time detection of parvovirus B19 DNA in plasma. Transfusion. 2004;44:97-103.

20. Kleinman SH, Glynn SA, Lee TH, et al. A linked donor-recipient study to evaluate parvovirus B19 transmission by blood component transfusion. Blood. 2009;114:3677-3683.

21. Wu CG, Mason B, Jong J, et al. Parvovirus B19 transmission by a high-purity factor VIII concentrate. Transfusion. 2005;45:1003-1010.

22. Saldanha J, Minor P. Detection of human parvovirus B19 DNA in plasma pools and blood products derived from these pools: implications for efficiency and consistency of removal of B19 DNA during manufacture. Br J Haematol. 1996;93:714-719.

23. Eis-Hübinger AM, Sasowski U, Brackmann HH. Parvovirus B19 DNA contamination in coagulation factor VIII products. Thromb Haemost. 1999;81:476-477.

24. Schmidt I, Blümel J, Seitz H, Willkommen H, Löwer J. Parvovirus B19 DNA in plasma pools and plasma derivatives. Vox Sang. 2001;81:228-235.

25. Mortimer PP, Luban NL, Kelleher JF, Cohen BJ. Transmission of serum parvovirus-like virus by clotting-factor concentrates. Lancet. 1983;2:482-484.

26. Azzi A, Ciappi S, Zakvrzewska K, Morfini M, Mariani G, Mannucci PM. Human parvovirus B19 infection in hemophiliacs first infused with two high-purity, virally-attenuated factor VIII concentrates. Am J Hematol. 1992;39:228-230.

27. Blümel J, Schmidt I, Effenberger W, et al. Parvovirus B19 transmission by heat-treated clotting factor concentrates. Transfusion. 2002;42:1473-1481.

28. Koenigbauer UF, Eastlund T, Day JW. Clinical illness due to parvovirus B19 infection after infusion of solvent/detergent-treated pooled plasma. Transfusion. 2000;40:1203-1206.

29. Santagostino E, Mannucci PM, Gringeri A, et al. Transmission of parvovirus B19 by coagulation factor concentrates exposed to 100 degrees C heat after lyophilization. Transfusion. 1997;37:517-522.

30. Geng Y, Wu CG, Bhattacharyya SP, Tan D, Guo ZP, Yu MY. Parvovirus B19 DNA in Factor VIII concentrates: effects of manufacturing procedures and B19 screening by nucleic acid testing. Transfusion. 2007;47:883-889.

31. Martin A, Lemon SM. Hepatitis A virus: from discovery to vaccines. Hepatol. 2006;43:S164-S172.

32. Matheny SC, Kingery JE. Hepatitis A. Am Fam Phys. 2012;86:1027-1034.

33. Keeffe EB. Hepatitis A and B superimposed on chronic liver disease: vaccine-preventable disease. Trans Am Clin Climatol Assoc. 2006;117:227-237-238.

34. Vaughan G, Goncalves Rossi LM, Forbi JC, et al. Hepatitis A virus: host interactions, molecular epidemiology and evolution. Infect Genet Evol. 2014;21:227-243.

35. Perkins HA, Busch MP. Transfusion-associated infections: 50 years of relentless challenges and remarkable progress. Transfusion. 2010;50:2080-2099.

36. Gowland P, Fontana S, Niederhauser C, Taleghani BM. Molecular and serologic tracing of a transfusion-transmitted hepatitis A virus. Transfusion. 2004;44:1555-1561.

37. Diwan AH, Stubbs JR, Carnahan GE. Transmission of hepatitis A virus via WBC-reduced RBCs and FFP from a single donation. Transfusion. 2003;43:536-540.

38. Normann A, Jung C, Vallbracht A, Flehmig B. Time course of hepatitis A viremia and viral load in the blood of human hepatitis A patients. J Med Virol. 2004;72:10-16.

39. Soucie JM, Robertson BH, Bell BP, McCaustland KA, Evatt BL. Hepatitis A virus infections associated with clotting factor concentrate in the United States. Transfusion. 1998;38:573-579.
40. Chudy M, Budek I, Keller-Stanislawski B, et al. A new cluster of hepatitis A infection in hemophiliacs traced to a contaminated plasma pool. J Med Virol. 1999;57:91-99.
41. Kishore J, Sen M. Parvovirus B-19 induced thrombocytopenia and anemia in a child with fatal fulminant hepatic failure coinfected with hepatitis A and E. J Trop Pediatr. 2009;55:335-337.
42. Ozcay F, Bikmaz YE, Canan O, Ozbek N. Hepatitis A and parvovirus B19 infection in an infant with fulminant hepatic failure. Turk J Gastroenterol. 2006;17:148-150.
43. Dwivedi M, Manocha H, Tiwari S, et al. Coinfection of parvovirus B19 with other hepatitis viruses leading to fulminant hepatitis of unfavorable outcome in children. Pediatr Infect Dis J. 2009;28:649-650.
44. Hughes JA, Fontaine MJ, Gonzalez CL, Layon AG, Goodnough LT, Galel SA. Case report of a transfusion-associated hepatitis A infection. Transfusion. 2014;54:2202-2206.
45. Jones S, Leighton K, Chapa J, et al. Prevalence of hepatitis A virus (HAV) and high-titer parvovirus B19 in recovered and source plasma donations. Transfusion. 2013;53(Suppl 2):211A.
46. Müller MM, Fraile MI, Hourfar MK, et al. Evaluation of two, commercial, multi-dye, nucleic acid amplification technology tests for HBV/HCV/HIV-1/HIV-2 and B19V/HAV, for screening blood and plasma for further manufacture. Vox Sang. 2013;104:19-29.
47. U.S. Food and Drug Administration. Guidance for industry: nucleic acid testing (NAT) to reduce the possible risk of human parvovirus B19 transmission by plasma-derived products. 2009 July. http://www.fda.gov/biologicsbloodvaccines/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/blood/ucm071592.htm
48. Human anti-D immunoglobulin, Monograph 0557 (since 1/1/2004); Human anti-D immunoglobulin for intravenous administration, Monograph 1527 (since 1/1/2004); Human plasma pooled and treated for virus inactivation, Monograph 1646 (since 1/7/2004). Ph.Europe. 6th ed. Strasbourg, France: Council of Europe; 2011.
49. Human plasma pooled and treated for virus inactivation, Monograph 1646 (since 1/2011). Ph.Europe. 6th ed. Strasbourg, France: Council of Europe; 2011.
50. Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. Gene. 1990; 93:125-128.
51. Savva R, McAuley-Hecht K, Brown T, Pearl L. The structural basis of specific base-excision repair by uracil-DNA glycosylase. Nature. 1995; 373:487-493.
52. 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;80:869-878.
53. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. Biotechnology (NY). 1992;10:413-417.
54. Heid CA, Stevens J, Livak JK, Williams PM. Real time quantitative PCR. Genome Res. 1996;6:986-994.
55. Center for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th ed. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health HHS Publication No. (CDC) 21-1112, revised December 2009.
56. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections. Approved Guideline-Fourth Edition. CLSI Document M29-A4:Wayne, PA;CLSI, 2014.

Revisione del documento

Revisione del documento	
Doc Rev. 4.0 01/2019	Aggiornamento della descrizione dei test di screening usati per lo screening NHP nella **Tabella 2** e nella sezione **Avvertimenti e precauzioni**. Aggiunta della descrizione e del simbolo Rx Only e aggiornamento delle descrizioni nella pagina dei simboli armonizzati. Aggiornamento degli avvertimenti sui pericoli. Per ulteriori domande e chiarimenti, è possibile rivolgersi al rappresentante Roche locale.
Doc Rev. 5.0 05/2019	Aggiunti i dati del genotipo 3b alla **Tabella 17**. Chiarito il genotipo 3a nella verifica dell'intervallo lineare. Corretto un errore tipografico nel nome standard internazionale OMS (solo in inglese). Corretto il numero **Totale** di campioni analizzati nella **Tabella 21**. Per ulteriori domande e chiarimenti, è possibile rivolgersi al rappresentante Roche locale.