

cobas[®] HSV 1 and 2 Test

per l'utilizzo con il sistema cobas[®] 4800

Per uso diagnostico *in vitro*



cobas[®] 4800 System Sample Preparation Kit	240 Tests 960 Tests	P/N: 05235782190 P/N: 05235804190
cobas[®] 4800 System Lysis Kit 1	240 Tests 960 Tests	P/N: 06768253190 P/N: 06768270190
cobas[®] 4800 System Wash Buffer Kit	240 Tests 960 Tests	P/N: 05235863190 P/N: 05235871190
cobas[®] 4800 System Internal Control Kit 1	20 Runs	P/N: 06768318190
cobas[®] 4800 HSV 1 and 2 Amplification/Detection Kit	80 Tests	P/N: 06768199190
cobas[®] 4800 HSV 1 and 2 Controls and Cofactor Kit	10 Runs	P/N: 06768296190

INDICE GENERALE

Uso previsto

Riassunto e spiegazione del test / Principi della procedura

Premessa: Screening HSV-1 e HSV-2.....	4
Spiegazione del test	5
Principi della procedura	5
Preparazione del campione.....	5
Amplificazione mediante PCR e rilevazione con TaqMan®	5
Amplificazione selettiva	6

Materiali, reagenti e campioni

Materiali e reagenti forniti	7
Conservazione e gestione dei reagenti.....	14
Materiali aggiuntivi necessari	15
Materiali opzionali	15
Strumentazione e software necessari ma non forniti	15

Precauzioni e requisiti per l'uso

Avvertimenti e precauzioni.....	16
Buone pratiche di laboratorio.....	16
Contaminazione	17
Integrità	17
Smaltimento	17
Fuoriuscite e pulizia	17
Prelievo, trasporto e conservazione dei campioni	18
Prelievo dei campioni	18
Conservazione e stabilità dei campioni durante il trasporto.....	18

Istruzioni per l'uso

Esecuzione del test.....	19
Flusso di lavoro.....	19
Procedura del test.....	19

Risultati

Controllo di qualità e validità dei risultati	24
Controllo Positivo	24
Controllo Negativo.....	24
Controllo Interno	24
Interpretazione dei risultati	24
Elenco dei flag dei risultati	26
Limiti della procedura	26

Valutazione delle prestazioni non cliniche	27
Sensibilità analitica	27
Identificazione dei ceppi di HSV-1 e HSV-2.....	28
Precisione	28
Inibizione competitiva.....	29
Specificità analitica	30
Interferenze	31
Prestazioni cliniche con i campioni clinici	32
Informazioni supplementari.....	34
Caratteristiche specifiche del saggio	34
Simboli	35
Assistenza tecnica.....	36
Produttore e importatore	36
Marchi e brevetti	36
Copyright.....	36
Bibliografia	37
Revisione del documento	38

Uso previsto

Il test **cobas**® HSV 1 e 2 per il Sistema **cobas**® 4800 è un test diagnostico qualitativo *in vitro* automatizzato, che utilizza la reazione a catena della polimerasi (Polymerase Chain Reaction, PCR) per la determinazione diretta e la tipizzazione del DNA del virus dell'herpes simplex 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2) in campioni prelevati da un clinico da lesione anogenitale di pazienti sintomatici di sesso sia maschile che femminile. Il test **cobas**® HSV 1 e 2 è da intendersi come ausilio per la diagnosi delle infezioni anogenitali da HSV-1 e HSV-2 in pazienti sintomatici.

Riassunto e spiegazione del test / Principi della procedura

Premessa: Screening HSV-1 e HSV-2

L'herpes genitale è una malattia a trasmissione sessuale causata dall'HSV tipo 1 e tipo 2, un virus a DNA a doppio filamento neurotropico ubiquitario che appartiene alla famiglia Herpesviridae¹ e che, dopo l'infezione primaria attraverso le secrezioni, resta nell'ospite per tutta la vita. Questo virus può rimanere latente per un lungo periodo di tempo e riattivarsi causando episodi ricorrenti di patologie sintomatiche. Il numero di recidive tende a diminuire nel corso degli anni. La maggior parte degli herpes genitali sono causati dall'HSV-2. Anche l'HSV-1 può causare l'herpes nella zona genitale, ma più spesso provoca infezioni a carico di bocca e labbra. Spesso l'herpes genitale viene trasmesso inconsapevolmente, da soggetti che non si sono accorti di essere infetti o che sono asintomatici.² La trasmissione prenatale e perinatale dell'HSV può provocare patologie gravi o perfino la morte del neonato.

L'infezione da herpes genitale è diffusa negli Stati Uniti, dove si registra una sieroprevalenza dell'HSV-2 fino al 30% nelle donne in gravidanza e anche superiore al 50% nei gruppi ad alto rischio, ad esempio i soggetti HIV-positivi e i professionisti del sesso.² È stata osservata una sieroprevalenza dell'HSV-2 fino all'80% nella popolazione adulta.³ La sieroprevalenza è doppia nelle donne rispetto agli uomini e aumenta con l'età.^{4,5}

I segnali e i sintomi associati all'herpes genitale possono variare. In un numero rilevante⁶ di soggetti, l'infezione è asintomatica o addirittura non viene diagnosticata. In genere dopo 4-7 giorni dal contatto sessuale, il soggetto avverte un dolore o un prurito locale, dopodiché compaiono gruppi bilaterali di papule e vescicole eritematose sui genitali esterni²; le lesioni possono interessare anche la regione perianale. Contemporaneamente possono comparire anche febbre, emicrania, malessere e linfadenopatia inguinale. Non è possibile distinguere l'infezione primaria da HSV-1 dall'infezione primaria da HSV-2 sulla base di criteri clinici. In circa il 70-90% della popolazione che ha subito un'infezione sintomatica da HSV-2 e nel 20-50% della popolazione che ha subito un'infezione genitale da HSV-1 si manifesta una recidiva entro un anno dall'infezione primaria.⁷⁻⁹ La diagnosi definitiva di infezione e la tipizzazione del virus sono dunque fondamentali per dare inizio alla cura e adottare una strategia mirata per la gestione del paziente.¹⁰

La diagnosi di herpes genitale può essere effettuata prelevando un campione delle lesioni anogenitali con un tampone da sottoporre a coltura e a immunofluorescenza tipo-specifica, oppure applicando le tecniche molecolari. I saggi basati sulla reazione a catena della polimerasi (PCR) sono caratterizzati da un'elevata sensibilità e da una produzione più rapida dei risultati rispetto al metodo basato sulla coltura.^{11,12} Per la diagnosi delle infezioni da HSV latenti vengono utilizzati i test di rilevazione degli anticorpi. La somministrazione tempestiva di una terapia antivirale ai soggetti infetti consente di limitare la trasmissione dell'HSV e le complicazioni associate all'infezione da HSV.

Il test **cobas**® HSV 1 e 2 analizza i campioni di lesioni anogenitali prelevati con i tamponi del kit di raccolta, trasporto e conservazione COPAN MSwab. Questi campioni primari devono essere caricati sul sistema **cobas**® 4800, dove vengono avviate automaticamente le procedure di estrazione dell'acido nucleico e di allestimento della reazione PCR. Successivamente la PCR Real-time rileva l'eventuale presenza nel campione di DNA target specifico per HSV-1 e HSV-2, quindi identifica il tipo. Il test può essere eseguito contemporaneamente ai test **cobas**® Cdiff e **cobas**® MRSA/SA predisponendo un batch misto per la stessa seduta. Tutti e tre questi test utilizzano la stessa procedura automatica di estrazione del campione e lo stesso profilo PCR di amplificazione e rilevazione.

Spiegazione del test

Il test **cobas**® HSV 1 e 2 si basa su due procedure principali: (1) preparazione automatica dei campioni per estrarre gli acidi nucleici dai campioni di lesioni anogenitali; (2) amplificazione simultanea mediante PCR delle sequenze di DNA target utilizzando primer specifici per HSV-1 e HSV-2 e rilevazione real-time delle sonde di rilevazione oligonucleotidiche fluorescenti scisse, specifiche per HSV-1 e HSV-2. Durante la procedura di preparazione automatica, a tutti i campioni viene aggiunto un controllo interno contenente una sequenza di DNA randomizzata non correlata. Il controllo interno viene sottoposto ad amplificazione e rilevazione insieme ad ogni campione a scopo di verifica della regolarità della procedura.

Principi della procedura

Preparazione del campione

La preparazione dei campioni per il test **cobas**® HSV 1 e 2 avviene in modo automatico sullo strumento **cobas**® x 480. I virus presenti nei campioni di lesioni anogenitali vengono lisati con agente caotropico, proteinasi K e reagenti SDS. Gli acidi nucleici liberati, insieme al DNA del controllo interno aggiunto, formano legami con le biglie magnetiche. Vengono sottoposti a lavaggio ed eluizione in un piccolo volume di tampone. Lo strumento preleva un'aliquota del materiale eluito e prepara la reazione PCR con un reagente Master Mix attivato.

Amplificazione mediante PCR e rilevazione con TaqMan®

Le fasi del ciclo PCR e la rilevazione del segnale target si svolgono sull'analizzatore **cobas**® z 480. Il reagente Master Mix contiene coppie di primer e sonde per cinque target: la regione B della DNA polimerasi e la regione C della timidina chinasi per HSV-1; la regione finale in 3' della glicoproteina B e la regione C della timidina chinasi per HSV-2; il controllo interno (Internal Control, IC). La struttura a doppio target per HSV-1 e HSV-2 rafforza l'affidabilità del saggio. Se sono presenti sequenze degli acidi nucleici target, l'amplificazione con i primer corrispondenti viene avviata da una DNA polimerasi termostabile e vengono generati i prodotti della PCR (ampliconi). Questi prodotti vengono riconosciuti da sonde TaqMan specifiche, che contengono un colorante fluorescente e un quencher. In condizioni normali il quencher sopprime la fluorescenza del colorante. Tuttavia se è presente il prodotto della PCR, la sonda ibridizza con il prodotto e viene scissa dall'attività di esonucleasi 5' > 3' della polimerasi. Questa reazione determina l'emissione di fluorescenza dal colorante. Il segnale viene registrato in tempo reale durante ogni ciclo di PCR dall'analizzatore **cobas**® z 480. Il segnale viene interpretato dal software del sistema **cobas**® 4800 e refertato come risultato finale.

Amplificazione selettiva

Il test **cobas**® HSV 1 e 2 consente l'amplificazione selettiva dell'acido nucleico target nel campione attraverso l'azione dell'enzima AmpErase (uracil-N-glicosilasi) e del trifosfato di deossiuridina (dUTP). L'enzima AmpErase riconosce e catalizza la reazione di distruzione dei filamenti di DNA contenenti deossiuridina¹³ ma non del DNA contenente deossitimidina. La deossiuridina non è presente nel DNA naturale, ma è sempre presente nell'amplicone perché il trifosfato di deossiuridina è uno dei dNTP utilizzati nel reagente Master Mix e, di conseguenza, soltanto l'amplicone contiene deossiuridina. La deossiuridina rende l'amplicone contaminante suscettibile alla distruzione da parte dell'enzima AmpErase prima dell'amplificazione del DNA target. L'enzima AmpErase contenuto nel reagente Master Mix catalizza la scissione del DNA contenente deossiuridina in corrispondenza dei residui di deossiuridina, aprendo la catena di deossiribosio nella posizione C1. Quando viene riscaldata nella prima fase del ciclo termico (pH alcalino del reagente Master Mix), la catena del DNA amplicone si spezza in corrispondenza della posizione della deossiuridina, rendendo il DNA non amplificabile. L'AmpErase è inattivo a temperature superiori a 55°C (cioè durante tutte le fasi del ciclo termico) e di conseguenza non distrugge l'amplicone target. È dimostrato che il test **cobas**® HSV 1 e 2 rende inattive almeno 1000 copie dell'amplicone di HSV 1 e 2 contenente deossiuridina ad ogni ciclo di PCR.

Materiali, reagenti e campioni

Materiali e reagenti forniti

Kit/Cassette	Componenti e ingredienti dei reagenti	Quantità per test	Simbolo di sicurezza e avvertimento*
cobas® 4800 System Sample Preparation Kit (Kit di preparazione dei campioni per il sistema cobas® 4800) 240 test (P/N: 05235782190)	MGP (Biglie magnetiche per il sistema cobas® 4800) Biglie magnetiche 93% Alcol isopropilico**	10 × 4,5 ml	 <p>PERICOLO H225 Liquido e vapori facilmente infiammabili. H319 Provoca grave irritazione oculare. H336 Può provocare sonnolenza o vertigini. P210 Tenere lontano da fonti di calore, superfici calde, scintille, fiamme libere o altre fonti di accensione. Non fumare. P233 Tenere il recipiente ben chiuso. P261 Evitare di respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol. 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. P370 + P378 In caso di incendio: utilizzare sabbia asciutta, polvere chimica secca o schiuma resistente all'alcol per estinguere. 67-63-0 Propan-2-olo</p>
	EB (Tampone di eluizione per il sistema cobas® 4800) Tampone Tris 0,09% Sodio azide	10 × 18 ml	N/D

Kit/Cassette	Componenti e ingredienti dei reagenti	Quantità per test	Simbolo di sicurezza e avvertimento*
cobas® 4800 System Sample Preparation Kit (Kit di preparazione dei campioni per il sistema cobas® 4800) 960 test (P/N: 05235804190)	MGP (Biglie magnetiche per il sistema cobas® 4800) Biglie magnetiche 93% Alcol isopropilico**	10 × 13,5 ml	 <p>PERICOLO H225 Liquido e vapori facilmente infiammabili. H319 Provoca grave irritazione oculare. H336 Può provocare sonnolenza o vertigini. P210 Tenere lontano da fonti di calore, superfici calde, scintille, fiamme libere o altre fonti di accensione. Non fumare. P233 Tenere il recipiente ben chiuso. P261 Evitare di respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol. 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. P370 + P378 In caso di incendio: utilizzare sabbia asciutta, polvere chimica secca o schiuma resistente all'alcol per estinguere. 67-63-0 Propan-2-olo</p>
	EB (Tampone di eluizione per il sistema cobas® 4800) Tampone Tris 0,09% Sodio azide	10 × 18 ml	N/D

Kit/Cassette	Componenti e ingredienti dei reagenti	Quantità per test	Simbolo di sicurezza e avvertimento*
<p>cobas® 4800 System Lysis Kit 1 (Kit di lisi 1 per cobas® 4800 System) 240 test (P/N: 06768253190)</p>	<p>LYS-1 (Tampone di lisi 1 per il sistema cobas® 4800) Citrato di sodio 5% Polidocanolo** 42,6% Tiocianato di guanidinio** Ditiotreitolo**</p>	<p>10 x 10 ml</p>	 <p>PERICOLO H302: Nocivo per ingestione. H314: Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari. H411: Tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata. EUH032: A contatto con acidi libera gas molto tossici. EUH071: Corrosivo per le vie respiratorie. P273: Non disperdere nell'ambiente. P280: Indossare guanti/indumenti protettivi/ proteggere gli occhi/proteggere il viso/ proteggere l'udito. 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. P391: Raccogliere il materiale fuoriuscito. 593-84-0 Tiocianato di guanidinio 9002-92-0 Polidocanolo 3483-12-3 (R*,R*)-1,4-dimercapto-2,3-butandiolo</p>

Kit/Cassette	Componenti e ingredienti dei reagenti	Quantità per test	Simbolo di sicurezza e avvertimento*
cobas® 4800 System Lysis Kit 1 (Kit di lisi 1 per cobas® 4800 System) 240 test (P/N: 06768253190)	PK (Proteinasi K per il sistema cobas® 4800) Tampone Tris EDTA Cloruro di calcio Acetato di calcio < 2,0% proteinasi K** Glicerina	10 × 0,9 ml	 <p>PERICOLO</p> <p>H317: Può provocare una reazione allergica cutanea.</p> <p>H334: Può provocare sintomi allergici o asmatici o difficoltà respiratorie se inalato.</p> <p>P261: Evitare di respirare la nebbia o i vapori.</p> <p>P280: Indossare guanti protettivi.</p> <p>P284: Indossare un apparecchio di protezione respiratoria.</p> <p>P304 + P340: IN CASO DI INALAZIONE: trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione.</p> <p>P333 + P313: In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico.</p> <p>P342 + P311: In caso di sintomi respiratori: contattare un CENTRO ANTIVELENI/un medico.</p> <p>39450-01-6 Proteinasi, <i>Tritirachium album</i> serina</p>
	SDS (Reagente SDS per il sistema cobas® 4800) Tampone Tris Dodecil solfato di sodio 0,09% Sodio azide	10 × 3 ml	N/D

Kit/Cassette	Componenti e ingredienti dei reagenti	Quantità per test	Simbolo di sicurezza e avvertimento*
<p>cobas® 4800 System Lysis Kit 1 (Kit di lisi 1 per cobas® 4800 System) 960 test (P/N: 06768270190)</p>	<p>LYS-1 (Tampone di lisi 1 per il sistema cobas® 4800) Citrato di sodio 5% Polidocanolo** 42,6% Tiocianato di guanidinio** Ditiotreitolo**</p>	<p>10 x 36 ml</p>	 <p>PERICOLO H302: Nocivo per ingestione. H314: Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari. H411: Tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata. EUH032: A contatto con acidi libera gas molto tossici. EUH071: Corrosivo per le vie respiratorie. P273: Non disperdere nell'ambiente. P280: Indossare guanti/indumenti protettivi/ proteggere gli occhi/proteggere il viso/ proteggere l'udito. 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. P391: Raccogliere il materiale fuoriuscito. 593-84-0 Tiocianato di guanidinio 9002-92-0 Polidocanolo 3483-12-3 (R*,R*)-1,4-dimercapto-2,3-butandiolo</p>

Kit/Cassette	Componenti e ingredienti dei reagenti	Quantità per test	Simbolo di sicurezza e avvertimento*
cobas® 4800 System Lysis Kit 1 (Kit di lisi 1 per cobas® 4800 System) 960 test (P/N: 06768270190)	PK (Proteinasi K per il sistema cobas® 4800) Tampone Tris EDTA Cloruro di calcio Acetato di calcio < 2,0% proteinasi K** Glicerina	20 × 1,2 ml	 <p>PERICOLO</p> <p>H317: Può provocare una reazione allergica cutanea.</p> <p>H334: Può provocare sintomi allergici o asmatici o difficoltà respiratorie se inalato.</p> <p>P261: Evitare di respirare la nebbia o i vapori.</p> <p>P280: Indossare guanti protettivi.</p> <p>P284: Indossare un apparecchio di protezione respiratoria.</p> <p>P304 + P340: IN CASO DI INALAZIONE: trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione.</p> <p>P333 + P313: In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico.</p> <p>P342 + P311: In caso di sintomi respiratori: contattare un CENTRO ANTIVELENI/un medico.</p> <p>39450-01-6 Proteinasi, <i>Tritirachium album</i> serina</p>
	SDS (Reagente SDS per il sistema cobas® 4800) Tampone Tris Dodecil solfato di sodio 0,09% Sodio azide	10 × 9 ml	N/D
cobas® 4800 System Wash Buffer Kit (Kit del tampone di lavaggio per cobas® 4800 System) 240 test (P/N: 05235863190)	WB (Tampone di lavaggio per il sistema cobas® 4800) Citrato di sodio diidrato 0,05% N-Metilisotiazolone-HCl	10 × 55 ml	N/D
cobas® 4800 System Wash Buffer Kit (Kit del tampone di lavaggio per cobas® 4800 System) 960 test (P/N: 05235871190)	WB (Tampone di lavaggio per il sistema cobas® 4800) Citrato di sodio diidrato 0,05% N-Metilisotiazolone-HCl	10 × 200 ml	N/D

Kit/Cassette	Componenti e ingredienti dei reagenti	Quantità per test	Simbolo di sicurezza e avvertimento*
cobas® 4800 System Internal Control Kit 1 (Kit di controllo interno 1 per il sistema cobas® 4800) 20 sedute (P/N: 06768318190)	IC-1 (cobas® 4800 IC-1) Tampone Tris EDTA < 0,01% Poly rA RNA (sintetico) 0,05% sodio azide < 0,01% DNA del controllo interno sintetico, non infettivo, incapsulato in proteina di rivestimento batteriofago Lambda	20 × 0,5 ml	N/D
cobas® 4800 HSV 1 and 2 Amplification/Detection Kit (Kit di amplificazione/rilevazione cobas® 4800 HSV 1 e 2) 80 test (P/N: 06768199190)	HSV MMX (Master Mix cobas® HSV 1 e 2) Tampone tricina EDTA Acetato di potassio Idrossido di potassio Tween 20 Glicerolo < 0,19% dATP, dCTP, dGTP, dUTP < 0,01% Primer upstream e downstream HSV-1, HSV-2 e IC < 0,01% Sonde fluorescenti per HSV-1, HSV-2 e IC < 0,01% Aptamero oligonucleotidico < 0,01% DNA polimerasi Z05 (batterica) < 0,02% Enzima AmpErase (uracil-N-glicosilasi) (batterico) 0,09% Sodio azide	10 × 0,3 ml	N/D

Kit/Cassette	Componenti e ingredienti dei reagenti	Quantità per test	Simbolo di sicurezza e avvertimento*
cobas® 4800 HSV 1 and 2 Controls and Cofactor Kit (Kit di controllo e cofattore cobas® 4800 HSV 1 e 2) 10 sedute (P/N: 06768296190)	HSV (+) C (Controllo positivo cobas® HSV 1 e 2) Tampone Tris EDTA < 0,01% Poly rA RNA (sintetico) 0,05% Sodio azide < 0,01% DNA plasmidico non infettivo (batterico) contenente una sequenza di HSV 1 < 0,01% DNA plasmidico non infettivo (batterico) contenente una sequenza di HSV 2	10 × 0,5 ml	N/D
	(-) C (Controllo negativo cobas® 4800) Tampone Tris EDTA 0,05% Sodio azide < 0,01% Poly rA RNA (sintetico)	10 × 0,5 ml	N/D
	Cofactor-2 (Cofattore 2 cobas® 4800) Acetato di manganese Acetato di magnesio 0,09% Sodio azide	10 × 1,7 ml	N/D

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

** Sostanza pericolosa.

Conservazione e gestione dei reagenti

Reagente	Temperatura di conservazione	Tempo di conservazione
cobas® 4800 System Sample Preparation Kit (Kit di preparazione dei campioni per il sistema cobas® 4800)	2-8°C	Stabile fino alla data di scadenza indicata
cobas® 4800 System Lysis Kit 1 (Kit di lisi 1 per il sistema cobas® 4800)	2-8°C	Stabile fino alla data di scadenza indicata
cobas® 4800 System Internal Control Kit 1 (Kit di controllo interno 1 per il sistema cobas® 4800)	2-8°C	Stabile fino alla data di scadenza indicata
cobas® 4800 HSV 1 and 2 Amplification/Detection Kit (Kit di amplificazione/rilevazione cobas® 4800 HSV 1 e 2)	2-8°C	Stabile fino alla data di scadenza indicata
cobas® 4800 HSV 1 and 2 Controls and Cofactor Kit (Kit di controllo e cofattore cobas® 4800 HSV 1 e 2)	2-8°C	Stabile fino alla data di scadenza indicata
cobas® 4800 System Wash Buffer Kit (Kit del tampone di lavaggio per il sistema cobas® 4800)	15-25°C	Stabile fino alla data di scadenza indicata

Nota: Non congelare i reagenti.

La data di scadenza del reagente è basata sul tempo coordinato universale (UTC). L'ora locale della scadenza del reagente può discostarsi di ±12 ore, a seconda del fuso orario locale in relazione all'UTC.

Materiali aggiuntivi necessari

Materiali	P/N
Puntali CORE da 1000 µl, rack da 96	04639642001
Vaschetta per reagenti da 50 ml	05232732001
Vaschetta per reagenti da 200 ml	05232759001
Piastra di estrazione (a pozzetti profondi) per il sistema cobas ® 4800	05232716001
Piastra per PCR (a micropozzetti) da 0,3 ml e pellicola adesiva per il sistema cobas ® 4800	05232724001
Applicatore per pellicola adesiva	04900383001
Rack da 32 posizioni	04639529001
Sacchetto per rifiuti solidi	05530873001 (piccolo) o 04691989001 (grande)
Manica di smaltimento in plastica Hamilton STAR	04639669001
Sistema di raccolta, trasporto e conservazione MSwab	7007248190 o COPAN 404C.R
Guanti monouso, senza talco	È ammesso l'uso di guanti senza talco monouso di qualsiasi marca.
Miscelatore vortex (monoprovetta)	È ammesso l'uso di un miscelatore vortex di qualsiasi marca.

Per maggiori informazioni sui prodotti venduti separatamente, rivolgersi al rappresentante Roche locale.

Materiali opzionali

Materiali	P/N
Coperchio per piastra di estrazione	Hamilton 6474-01
Tappi, colore bianco (per ritappare i campioni primari dopo la seduta)	07033893001 o COPAN 2U008N100.R

Per maggiori informazioni sui materiali opzionali, rivolgersi al rappresentante Roche locale.

Strumentazione e software necessari ma non forniti

Strumentazione e software necessari, non forniti
Sistema cobas ® 4800 Strumento cobas ® x 480 Analizzatore cobas ® z 480 Unità di controllo
Software cobas ® HSV 1 e 2 AP versione 1.0.0 o successiva per il sistema cobas ® 4800
Software di applicazione (Core) versione 2.2.0 o successiva per il sistema cobas ® 4800

Per maggiori informazioni sui prodotti venduti separatamente, rivolgersi al rappresentante Roche locale.

Precauzioni e requisiti per l'uso

Avvertimenti e precauzioni

Com'è auspicabile per qualsiasi procedura di analisi, per lo svolgimento di questo test è necessario attenersi alla buona pratica di laboratorio. Data l'elevata sensibilità analitica di questo test, prestare attenzione affinché i reagenti, i campioni e le miscele di amplificazione siano esenti da contaminazioni.

- Solo per uso diagnostico *in vitro*.
- Evitare la contaminazione dei reagenti e dei campioni con batteri e DNA.
- Le schede di sicurezza (Safety Data Sheets, SDS) sono disponibili su richiesta presso la sede Roche locale.
- Il reagente LYS-1 contiene guanidina tiocianato. Impedire il contatto diretto tra la guanidina tiocianato e l'ipoclorito di sodio (candeggina) o altri reagenti fortemente reattivi, ad esempio acidi o basici. Queste miscele possono rilasciare un gas nocivo.
- Il reagente MGP contiene isopropanolo ed è facilmente infiammabile. Tenere al riparo da fiamme libere e da ambienti dove si possono verificare scintille.
- I reagenti EB, HSV 1/2 MMX, SDS, Cofactor-2, (-)C, HSV 1/2 (+)C e IC-1 contengono sodio azide.
- Per ulteriori avvertimenti, precauzioni e procedure volte a ridurre il rischio di contaminazione per il **cobas**® x 480 instrument o il **cobas**® z 480 analyzer, consultare l'Assistenza Utente del **cobas**® 4800 System. In caso di sospetta contaminazione, eseguire la pulizia e la manutenzione settimanale seguendo le istruzioni contenute nell'Assistenza Utente del **cobas**® 4800 System.
- In caso di un grave incidente verificatosi durante l'uso di questo test, segnalarlo alla propria autorità competente locale.

Nota: per istruzioni specifiche, vedere la sezione “Prelievo, trasporto e conservazione dei campioni”.

Buone pratiche di laboratorio

- Non pipettare con la bocca.
- Non mangiare, bere o fumare nelle aree di lavoro del laboratorio.
- Dopo avere manipolato i campioni e i reagenti del kit, lavarsi accuratamente le mani.
- Durante la manipolazione dei reagenti, indossare camici da laboratorio, guanti monouso e una protezione adeguata per gli occhi. Evitare il contatto di questi materiali con la pelle, gli occhi o le membrane mucose. In caso di contatto, lavare immediatamente con abbondante acqua. Intervenire tempestivamente per prevenire possibili ustioni. In caso di fuoriuscita del reagente, diluire il liquido con acqua prima di asciugare.
- Pulire e disinfettare accuratamente tutte le superfici di lavoro del laboratorio con una soluzione fresca a base di ipoclorito di sodio al 0,5% e acqua deionizzata o distillata (candeggina per uso domestico diluita 1:10). Successivamente pulire la superficie con etanolo al 70%.

Contaminazione

- Per evitare contaminazioni è necessario indossare i guanti, che dovranno essere sostituiti dopo avere manipolato i campioni e prima di utilizzare i reagenti **cobas®** HSV 1 e 2. Evitare di contaminare i guanti durante la manipolazione dei campioni e dei controlli. Indossare guanti, camici da laboratorio e protezioni per gli occhi durante la manipolazione dei campioni e dei reagenti del kit.
- Evitare la contaminazione dei reagenti con batteri e ribonucleasi.
- Potrebbero essere generati risultati falsi positivi senza un'adeguata prevenzione del carryover durante la manipolazione dei campioni.
- I campioni devono essere manipolati come se fossero infettivi, adottando le procedure di sicurezza del laboratorio delineate in *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*¹⁴ e nel documento CLSI M29-A3.¹⁵

Integrità

- Non utilizzare i kit dopo le date di scadenza.
- Non combinare i reagenti.
- Non utilizzare i materiali di consumo dopo la data di scadenza.
- Tutti i materiali di consumo sono monouso. Non riutilizzare.
- La manutenzione di tutte le apparecchiature deve essere conforme alle istruzioni fornite dal produttore.
- Non utilizzare reagenti o contenitori visibilmente danneggiati o con segni di perdite.

Smaltimento

- I reagenti **cobas®** 4800 e i reagenti specifici del test **cobas®** HSV 1 e 2 contengono azoturo di sodio (vedere "Avvertimenti e precauzioni"). La sodio azide può reagire con le tubature di piombo e rame formando azidi metallici altamente esplosivi. Quando le soluzioni contenenti azoturo di sodio vengono smaltite nei lavelli del laboratorio, è necessario sciacquare gli scarichi con abbondante acqua fredda per impedire l'accumulo di azidi.
- Smaltire i reagenti inutilizzati e i materiali di scarto nel rispetto delle leggi vigenti.

Nota: per lo smaltimento dei rifiuti liquidi, consultare l'Assistenza Utente del **cobas® 4800 System.**

Fuoriuscite e pulizia

- Il reagente LYS-1 contiene guanidina tiocianato. In caso di fuoriuscita di liquido contenente guanidina tiocianato, pulire con acqua e un detergente da laboratorio idoneo. Se il liquido fuoriuscito contiene agenti potenzialmente infettivi, pulire la superficie interessata PRIMA con acqua e un detergente da laboratorio e poi con ipoclorito di sodio allo 0,5%.
- Se fuoriesce un liquido sul **cobas®** 4800 instrument, pulire attenendosi alle istruzioni contenute nell'Assistenza Utente - **cobas®** 4800 System.
- Non utilizzare una soluzione di ipoclorito di sodio (candeggina) per pulire lo strumento **cobas®** x 480 o l'analizzatore **cobas®** z 480. Pulire il **cobas®** x 480 instrument o il **cobas®** z 480 analyzer attenendosi alle procedure descritte nell'Assistenza Utente del **cobas®** 4800 System.

Prelievo, trasporto e conservazione dei campioni

Nota: manipolare tutti i campioni come se fossero in grado di trasmettere agenti infettivi.

Prelievo dei campioni

I campioni di lesioni anogenitali prelevati con i tamponi del sistema di raccolta, trasporto e conservazione MSwab sono approvati per l'uso con il test **cobas**® HSV 1 e 2. Raccogliere i campioni seguendo la procedura dettagliata descritta nella sezione "Procedura di raccolta dei campioni", rispettando le procedure operative standard adottate dalla propria organizzazione.

Conservazione e stabilità dei campioni durante il trasporto

I campioni di lesioni anogenitali prelevati con i tamponi del sistema di raccolta, trasporto e conservazione MSwab sono stabili per il trasporto e la conservazione a 2-30°C per 4 giorni, o a 2-8°C per 14 giorni. I campioni congelati sono stabili per almeno 30 giorni prima dello svolgimento del test sul sistema **cobas**® 4800. La stabilità è stata dimostrata eseguendo i test sui campioni dopo un periodo ininterrotto di conservazione a $31 \pm 1^\circ\text{C}$ per 4 giorni, seguito da un periodo di conservazione a 2-8°C per 14 giorni, seguito da un periodo di conservazione a -20°C per 30 giorni.

Il trasporto dei campioni HSV 1 e 2 deve avvenire nel rispetto di tutti i regolamenti locali, regionali e nazionali per il trasporto di agenti eziologici.

Istruzioni per l'uso

Esecuzione del test

Flusso di lavoro

Figura 1. Flusso di lavoro del test cobas® HSV 1 e 2

1	Avviare il sistema.
2	Eeguire la manutenzione dello strumento.
3	Prendere i campioni e i reagenti dal luogo in cui sono conservati.
4	Avviare la seduta: <ul style="list-style-type: none"> • Caricare i rack con i campioni.
5	Con sistema LIS: confermare il work order Senza sistema LIS: creare il work order
6	Caricare il materiale di consumo (piastra di estrazione, piastra per PCR, rack per puntali) e reagenti
7	Avviare la seduta per la preparazione dei campioni
8	Scaricare e coprire la piastra per PCR
9	Rimuovere i campioni, i reagenti usati e la piastra di estrazione.
10	Caricare la piastra per PCR sull'analizzatore
11	Rivedere i risultati
12	Con sistema LIS: inviare i risultati al sistema LIS
13	Scaricare tutto il materiale dall'analizzatore

Procedura del test

Procedura di raccolta dei campioni

Il metodo di raccolta dei campioni è fondamentale per ottenere risultati ottimali. È possibile consultare le linee guida per il prelievo dei campioni e la rilevazione dei virus in pubblicazioni specifiche (CLSI M41-A).¹⁷

Per conseguire risultati ottimali, è opportuno prelevare i campioni da analizzare con il test **cobas**® HSV 1 e 2 nella fase acuta della malattia, preferibilmente entro 3 giorni e comunque non oltre 7 giorni dalla comparsa della malattia (eruzione delle lesioni).

Il prelievo dei campioni deve rispettare le procedure operative standard adottate dalla propria organizzazione.

A. Presenza di vescicole (bolle piene di liquido trasparente)

1. Lavare/pulire la lesione in superficie con una soluzione fisiologica sterile.
2. Aprire (rompere) delicatamente la vescicola con un tampone FLOQSwab (opzione preferibile), un ago o un bisturi e raccogliere il liquido con il tampone FLOQSwab.
3. Con lo stesso FLOQSwab sfregare vigorosamente la base della vescicola per raccogliere le cellule che si trovano alla base della lesione.
4. Riporre il tampone nella provetta di trasporto MSwab. Fare leva sul bordo della provetta per spezzare l'asticella del tampone nel punto contrassegnato.

5. Chiudere il tappo verificando che l'estremità superiore dell'asticella del tampone sia in posizione centrale.
- B. Assenza di vescicole (vescicole scoppiate o trasudanti o ulcere con crosta)
1. Assenza di crosta (vescicole scoppiate o trasudanti)
 - a. Raccogliere le cellule sfregando vigorosamente la base della lesione con un tampone FLOQSwab secco o preinumidito con due gocce di soluzione fisiologica sterile.
 - b. Riporre il tampone nella provetta di trasporto MSwab. Fare leva sul bordo della provetta per spezzare l'asticella del tampone nel punto contrassegnato.
 - c. Chiudere il tappo verificando che l'estremità superiore dell'asticella del tampone sia in posizione centrale.
 2. Presenza di crosta (ulcera con crosta)
 - a. Rimuovere delicatamente la crosta con un tampone FLOQSwab preinumidito con una soluzione fisiologica sterile.
 - b. Prelevare il campione sfregando vigorosamente la base della lesione.
 - c. In alternativa, raschiare la lesione con un bisturi o un ago sterile fino a fare emergere liquido sieroso (evitare il sanguinamento), quindi raccogliere il campione sfregando vigorosamente la base della vescicola con un tampone FLOQSwab preinumidito.
 - d. Riporre il tampone nella provetta di trasporto MSwab. Fare leva sul bordo della provetta per spezzare l'asticella del tampone nel punto contrassegnato.

Etichettare il campione e trasportarlo al laboratorio di analisi seguendo le procedure operative standard della propria organizzazione (consultare anche la sezione “Prelievo, trasporto e conservazione dei campioni”). Per le note sui campioni, consultare la sezione “Flusso di lavoro”.

Tutti i reagenti, ad eccezione di HSV 1/2 MMX e Cofactor-2, devono raggiungere la temperatura ambiente prima di essere caricati sullo strumento **cobas**® x 480. I reagenti HSV 1 e 2 MMX e Cofactor-2 possono essere prelevati direttamente dal luogo in cui sono conservati a 2-8°C, in quanto potranno raggiungere la temperatura ambiente sullo strumento **cobas**® x 480 prima del loro utilizzo nella seduta.

Nota: per istruzioni operative dettagliate, consultare l'Assistenza Utente del cobas® 4800 System.

Dimensioni della seduta

Il sistema **cobas**® 4800 è progettato per supportare sedute di batch misti con i test **cobas**® HSV 1 e 2, **cobas**® Cdiff e **cobas**® MRSA/SA. Il kit generico **cobas**® 4800 System Sample Preparation Kit, il kit generico **cobas**® 4800 System Lysis Kit 1 e il kit generico **cobas**® 4800 System Wash Buffer Kit sono disponibili in due formati, ognuno sufficiente per 10 sedute da 24 o 96 campioni al massimo, compresi i controlli e i campioni di analisi per tutti i test da eseguire. Il kit di rilevazione/amplificazione **cobas**® 4800 HSV 1 e 2 è disponibile in due formati, ognuno sufficiente per analizzare 80 o 240 campioni al massimo, compresi i controlli HSV 1 e 2 e i campioni di analisi. È possibile utilizzare più flaconi di reagente Master Mix **cobas**® 4800 HSV 1 e 2 in una seduta, purché siano dello stesso formato. Il kit generico di controllo interno 1 per il sistema **cobas**® 4800 e i kit di controllo e co-fattore **cobas**® 4800 HSV 1 e 2 sono disponibili in un unico formato, sufficiente rispettivamente per 20 e 10 sedute e compatibile con tutte le configurazioni delle sedute. Ogni seduta con campioni HSV 1 e 2 deve includere anche un controllo positivo **cobas**® 4800 HSV 1 e 2 e un controllo negativo **cobas**® 4800 (vedere la sezione “Controllo di qualità”). Una seduta analitica singola può includere al massimo 94 campioni e 2 controlli.

Nota: *sebbene non sia un uso ottimale dei reagenti, è possibile utilizzare un reagente generico da 96 test per una seduta con 1-22 campioni. Non è tuttavia possibile mescolare formati diversi del kit WB (tamponi di lavaggio per il sistema cobas® 4800), del kit di preparazione dei campioni per il sistema cobas® 4800 e del kit di lisi 1 per il sistema cobas® 4800. Ad esempio, se all'inizio della seduta viene letto il codice a barre di un flacone di reagente WB da 96 test, anche gli altri due kit dovranno essere nei formati da 96 test.*

Nota: *sebbene non sia un uso ottimale dei reagenti, è possibile utilizzare un reagente cobas® 4800 HSV 1 e 2 MMX da 24 test per una seduta composta da 1-6 campioni HSV. Per informazioni su come cambiare il formato del kit, consultare l'Assistenza Utente del cobas® 4800 System.*

Flusso di lavoro

Il test cobas® HSV 1 e 2 viene eseguito con il flusso di lavoro completo configurato nel software cobas® 4800. Dopo la preparazione dei campioni sul cobas® x 480 instrument, è prevista la fase di amplificazione/rilevazione sul cobas® z 480 analyzer. La seduta può essere limitata ai soli campioni HSV 1 e 2 o includere batch misti con i test cobas® Cdiff e/o cobas® MRSA/SA. Per maggiori dettagli, consultare l'Assistenza Utente del cobas® 4800 System.

Campioni

Nota: *il test cobas® HSV 1 e 2 è approvato per l'uso con il sistema di raccolta, trasporto e conservazione MSwab. Non utilizzare altri dispositivi di raccolta o terreni di trasporto dei tamponi.*

Nota: *se il campione della lesione anogenitale è stato prelevato correttamente con il tampone, la provetta deve contenere un solo tampone FLOQSwab con l'asticella trattenuta dal tappo. Se i campioni consegnati in laboratorio non contengono nessun tampone o ne contengono più d'uno, non analizzarli poiché evidentemente non sono stati raccolti secondo le istruzioni corrette.*

Nota: *non analizzare i campioni di lesioni anogenitali in cui sono presenti tracce di sangue o il cui colore è marrone scuro.*

Nota: *i campioni devono trovarsi all'interno delle provette di raccolta per campioni primari (provette primarie) e devono avere un codice a barre valido per poter essere analizzati sullo strumento cobas® x 480. Fare riferimento all'Assistenza Utente del cobas® 4800 System per conoscere le corrette procedure per i codici a barre e consultare un elenco dei codici a barre supportati dal cobas® 4800 System.*

Nota: *per prevenire la contaminazione crociata, si consiglia di trattare le provette primarie sul sistema cobas® 4800 prima di sottoporre i campioni ad altri trattamenti o test.*

Nota: *per prevenire la contaminazione crociata dei campioni già trattati, utilizzare tappi di un colore diverso (bianco, vedere "Materiali opzionali") per tappare nuovamente le provette primarie MSwab dopo il trattamento dei campioni.*

Nota: *il volume dei campioni di lesioni anogenitali prelevati con i tamponi del sistema di raccolta, trasporto e conservazione MSwab è sufficiente per eseguire due test su sistema cobas® 4800. La provetta primaria MSwab deve contenere un volume minimo di 700 µl, in caso contrario non è possibile eseguire una seduta cobas® HSV 1 e 2.*

Esecuzione del test cobas® HSV 1 e 2

Nota: *è possibile eseguire sedute in batch miste con i test cobas® HSV 1 e 2 e cobas® Cdiff e/o cobas® MRSA/SA. Per maggiori informazioni, consultare l'Assistenza Utente del cobas® 4800 System.*

1. Eseguire l'avvio del sistema e le procedure di manutenzione seguendo le istruzioni contenute nell'Assistenza Utente del **cobas®** 4800 System.
2. Raccogliere tutti i reagenti e il materiale di consumo necessario. Tutti i reagenti, ad eccezione di **cobas®** HSV 1 e 2 MMX e Cofactor-2, devono avere raggiunto la temperatura ambiente all'avvio della seduta.

Nota: *tutti i reagenti e tutte le vaschette per reagenti sono monouso e sono provvisti di codice a barre. Il software cobas® 4800 tiene traccia dell'uso dei reagenti e delle vaschette e rifiuta i reagenti e le vaschette già utilizzati.*

3. Ispezionare visivamente i campioni di lesioni anogenitali su tamponi in terreno di trasporto MSwab, verificando che siano conformi alla descrizione fornita nella sezione “Campioni”. Assicurarsi che tutti i tappi siano chiusi. Agitare in vortex il campione per almeno 5 secondi. Stappare la provetta (l'estremità superiore del tampone deve essere trattenuta dal tappo) e ruotare rapidamente il tampone sulla parete interna della provetta di modo che il liquido in eccesso sgoccioli via. Gettare via il tappo con il tampone un attimo prima di caricare il campione sul sistema **cobas®** 4800. Assicurarsi che il tampone sia venuto via insieme al tappo. Se il tampone viene lasciato all'interno della provetta, ostacolerà lo svolgimento del test **cobas®** HSV 1 e 2.
4. Avviare una nuova seduta e definire il work order. È possibile creare il work order in tre modi:
 - Utilizzando il Sample Editor prima di caricare il rack per campioni sullo strumento **cobas®** x 480 (pulsante “Editor” sulla destra del menu principale). È possibile salvare, modificare e ricaricare i work order secondo necessità.
 - Utilizzando la procedura guidata per creare una nuova seduta e caricare i campioni sullo strumento **cobas®** x 480 seguendo le istruzioni visualizzate. Il codice a barre dei campioni viene letto automaticamente. Devono invece essere specificati i risultati richiesti per ogni campione.
 - Utilizzando il sistema LIS della propria organizzazione.

Per maggiori dettagli, consultare l'Assistenza Utente del **cobas®** 4800 System. Quando si selezionano i risultati richiesti, scegliere l'opzione “HSV 1 and 2”.

5. Caricare i campioni e definire/selezionare il work order oppure utilizzare il sistema LIS. L'opzione “Unload sample carriers after transferring to deep well plate” è selezionata per impostazione predefinita. Questa opzione consente all'operatore di scaricare i rack con i campioni rimanenti subito dopo avere trasferito le aliquote necessarie sullo strumento **cobas®** x 480. I contenitori dei campioni devono essere richiusi con un nuovo tappo (vedere “Materiali opzionali”) in caso di conservazione.
6. Seguire la procedura guidata per caricare il materiale di consumo. Non aggiungere o rimuovere singoli puntali da un rack parzialmente utilizzato, poiché il software tiene il conto dei puntali rimanenti. Se i puntali disponibili non sono sufficienti per la seduta, viene generato un allarme.
7. Caricare i reagenti per la preparazione dei campioni nelle apposite vaschette provviste di codice a barre. Le vaschette per reagenti sono disponibili in due formati: 200 ml e 50 ml. Seguire la procedura guidata per selezionare la vaschetta per reagenti del formato desiderato. Il codice a barre delle vaschette per reagenti deve essere rivolto verso il lato destro del rack. Caricare i reagenti necessari per la preparazione dei campioni seguendo il metodo “scan-scan-pour-place”:
 - “Scan”: scansionare il codice a barre dei flaconi dei reagenti.
 - “Scan”: scansionare il codice a barre delle vaschette per reagenti.

- “Pour”: versare il reagente nella vaschetta.
- Collocare la vaschetta piena di reagente nella posizione prevista sul rack per reagenti.

Nota: il cronometro interno del sistema cobas® 4800 registra il tempo di permanenza dei reagenti sullo strumento. Dopo la scansione del tampone di lavaggio (WB), è necessario completare il caricamento e fare clic sul pulsante “Start” entro 1 ora. Nella scheda “Workplace” compare un cronometro del tempo residuo. Il sistema non permetterà alla seduta di iniziare se il tempo è scaduto.

Nota: per garantire un trasferimento accurato delle biglie magnetiche (magnetic glass particles, MGP), agitare con vigore il flacone MGP immediatamente prima di versarlo nella vaschetta per reagenti.

8. Caricare i reagenti di amplificazione/rilevazione (HSV 1 e 2 MMX e Cofactor-2), la proteinasi K (PK) e i controlli [HSV 1 e 2 (+) C, IC e (-) C] direttamente sui rack per reagenti. Per prevenire il rischio di contaminazione, è necessario cambiare i guanti dopo avere manipolato i controlli positivi.

Nota: la procedura guidata calcola il numero e il formato ottimale dei reagenti cobas® HSV 1 e 2 MMX da utilizzare. Il risultato di questo calcolo viene riportato nella colonna “Kit size” della schermata di caricamento dei reagenti MMX e Co-factor. Per utilizzare un diverso formato del reagente cobas® HSV 1 e 2 MMX, fare clic sul pulsante “Change kit size”.

9. Avviare la preparazione dei campioni facendo clic su “Start run”.
10. Se la seduta di preparazione dei campioni termina correttamente, vengono visualizzati i pulsanti “Sample Preparation results” e “Unload”. Se lo si desidera, è possibile selezionare il pulsante “Sample Preparation results” per rivedere i risultati e quindi selezionare “Unload” per scaricare il rack per piastre. In alternativa è possibile selezionare “Unload” per scaricare il rack per piastre senza rivedere i risultati. Consultare l'Assistenza Utente del **cobas® 4800 System**.
11. Seguire le istruzioni contenute nell'Assistenza Utente del **cobas® 4800 System** per sigillare la piastra per PCR, trasferirla sull'analizzatore **cobas® z 480** e avviare la seduta di amplificazione e rilevazione.

Nota: il cronometro interno del sistema cobas® 4800 registra il tempo trascorso dopo l'aggiunta dei campioni preparati alla soluzione Master Mix attivata. L'amplificazione e la rilevazione devono iniziare il prima possibile e comunque non oltre 90 minuti dopo la fine della seduta sullo strumento cobas® x 480. Nella scheda “Workplace” compare un cronometro del tempo residuo. Il sistema annullerà la seduta allo scadere del tempo.

12. Al termine della seduta di amplificazione e rilevazione, scaricare la piastra per PCR dall'analizzatore **cobas® z 480**.
13. Seguire le istruzioni contenute nell'Assistenza Utente del **cobas® 4800 System** per rivedere e accettare i risultati.

Risultati

Controllo di qualità e validità dei risultati

In ogni seduta viene incluso un set di controlli positivi e negativi per il test **cobas**® HSV 1 e 2. Ogni seduta deve generare risultati validi sia per il controllo positivo che per il controllo negativo, affinché il software **cobas**® 4800 possa mostrare i risultati dei campioni sottoposti al test **cobas**® HSV 1 e 2 nella stessa seduta.

Controllo Positivo

Il controllo HSV 1 e 2 (+) contiene plasmidi di DNA non infettivo dei virus HSV-1 e HSV-2. Il controllo HSV 1 e 2 (+) verifica la regolarità delle fasi di estrazione, amplificazione e rilevazione dell'acido nucleico in una determinata seduta del test. Il risultato del controllo HSV 1 e 2 (+) deve essere "Valid". Se i risultati del controllo HSV 1 e 2 (+) sono costantemente non validi, rivolgersi all'ufficio Roche locale per richiedere assistenza tecnica.

Controllo Negativo

Il risultato del controllo (-) deve essere "Valid". Se i risultati del controllo (-) sono costantemente non validi, rivolgersi all'ufficio Roche locale per richiedere assistenza tecnica.

Controllo Interno

Il Controllo Interno (Internal Control, IC) è una molecola del fago lambda che contiene le sequenze e i target randomizzati per i primer e le sonde IC-specifici. Durante la preparazione dei campioni sullo strumento **cobas**® x 480, l'IC viene aggiunto a tutti i campioni e ai controlli (positivi e negativi). L'IC verifica la regolarità delle fasi di estrazione, amplificazione e rilevazione dell'acido nucleico per un determinato tipo di campione. L'IC deve inoltre attestare la validità dei controlli della seduta.

Interpretazione dei risultati

Nota: la validazione di test e sedute compete al software cobas® 4800.

Nota: una seduta valida può includere sia risultati validi che risultati non validi.

Se una seduta è valida, i risultati dei campioni possono essere interpretati con le modalità descritte nella Tabella 1.

Tabella 1. Interpretazione dei risultati del test cobas® HSV 1 e 2

Test cobas® HSV 1 e 2	Report e interpretazione dei risultati
POS HSV 1, POS HSV 2	HSV-1 positivo, HSV-2 positivo Il campione è positivo alla presenza dei DNA di HSV-1 e HSV-2.
NEG HSV 1, NEG HSV 2	HSV-1 negativo*, HSV-2 negativo* L'eventuale presenza dei DNA di HSV-1 e HSV-2 non è stata rilevata.
NEG HSV 1, POS HSV 2	HSV-1 negativo*, HSV-2 positivo L'eventuale presenza del DNA di HSV-1 non è stata rilevata. Il campione è positivo alla presenza del DNA di HSV-2.
POS HSV 1, NEG HSV 2	HSV-1 positivo, HSV-2 negativo* Il campione è positivo alla presenza del DNA di HSV-1. L'eventuale presenza del DNA di HSV-2 non è stata rilevata.
Invalid HSV 1, NEG HSV 2	HSV-1 non valido, HSV-2 negativo* Il risultato HSV-1 non è valido. Il campione originale deve essere analizzato di nuovo per ottenere un risultato valido per HSV-1. L'eventuale presenza del DNA di HSV-2 non è stata rilevata.
NEG HSV 1, Invalid HSV 2	HSV-1 negativo*, HSV-2 non valido L'eventuale presenza del DNA di HSV-1 non è stata rilevata. Il risultato HSV-2 non è valido. Il campione originale deve essere analizzato di nuovo per ottenere un risultato valido per HSV-2.
Invalid HSV 1, Invalid HSV 2	HSV-1 non valido, HSV-2 non valido Risultati non validi per HSV-1 e HSV-2. Il campione originale deve essere analizzato di nuovo per ottenere risultati validi per HSV-1 e HSV-2.
Invalid HSV 1, POS HSV 2	HSV-1 non valido, HSV-2 positivo Il risultato HSV-1 non è valido. Il campione originale deve essere analizzato di nuovo per ottenere un risultato valido per HSV-1. Il campione è positivo alla presenza del DNA di HSV-2.
POS HSV 1, Invalid HSV 2	HSV-1 positivo, HSV-2 non valido Il campione è positivo alla presenza del DNA di HSV-1. Il risultato HSV-2 non è valido. Il campione originale deve essere analizzato di nuovo per ottenere un risultato valido per HSV-2.
Failed	Nessun risultato per il campione Consultare l'Assistenza Utente del cobas® 4800 System per istruzioni sull'interpretazione dei flag e le azioni consigliate. Il campione originale deve essere agitato in vortex per almeno 5 secondi e analizzato di nuovo per ottenere risultati validi per il virus HSV.

*Un risultato negativo non esclude la presenza di HSV-1 e/o HSV-2, poiché i risultati sono influenzati dal metodo di raccolta del campione, dalla presenza o assenza di inibitori e dal volume di DNA da rilevare.

Si potrebbero ottenere risultati non validi se il campione contenesse sostanze inibitorie che impediscono l'estrazione e/o l'amplificazione/rilevazione dell'acido nucleico target. Per un elenco delle sostanze interferenti note, consultare la sezione "Limiti della procedura". In caso di risultati non validi, diluire il campione originale aggiungendone 0,2 ml in una nuova provetta MSwab, agitare in vortex per almeno 5 secondi e ripetere il test.

Si potrebbero non ottenere risultati se il campione contiene coaguli che ostacolano la preparazione dei campioni sullo strumento **cobas®** 4800.

Elenco dei flag dei risultati

La tabella seguente riporta gli avvisi (flag) rilevanti ai fini dell'interpretazione dei risultati.

Tabella 2 Elenco dei flag per il test cobas® HSV 1 e 2

Test cobas® HSV 1 e 2	Test cobas® HSV 1 e 2	Report e interpretazione dei risultati
R20	Il controllo positivo non è valido.	Un controllo esterno non è valido. 1. Ripetere l'intera seduta utilizzando reagenti nuovi. 2. Se il problema persiste, contattare l'assistenza tecnica Roche.
R21	Il controllo negativo non è valido.	Un controllo esterno non è valido. 1. Ripetere l'intera seduta utilizzando reagenti nuovi. 2. Se il problema persiste, contattare l'assistenza tecnica Roche.
X3	Errore: rilevato coagulo. Il campione non è stato analizzato.	Verificare che i campioni siano stati manipolati conformemente alla descrizione del flusso di lavoro. 1. Verificare se il campione contiene coaguli. 2. Ripetere l'analisi del campione.
X4	Errore: errore di pipettamento. Il campione non è stato analizzato.	La causa più probabile è che il volume del campione è insufficiente oppure si è verificato un errore meccanico durante il pipettamento. 1. Verificare che il volume del campione sia sufficiente. 2. Verificare che la piastra di espulsione puntali sia nella posizione corretta. 3. Ripetere l'analisi del campione.

Limiti della procedura

1. Il test **cobas**® HSV 1 e 2 è approvato per l'uso esclusivamente con campioni di lesioni anogenitali, prelevati con i tamponi del sistema di raccolta, trasporto e conservazione MSwab.
2. L'affidabilità dei risultati dipende dall'adeguatezza delle procedure di prelievo, trasporto, conservazione e trattamento dei campioni. Rispettare le procedure descritte nel presente documento di Istruzioni per l'uso (definito anche Foglio illustrativo), nei Fogli illustrativi del sistema di raccolta, trasporto e conservazione MSwab e nell'Assistenza Utente del **cobas**® 4800 System.
3. L'interferenza di altre sostanze potrebbe determinare risultati falsi negativi o non validi. L'IC è incluso nel test **cobas**® HSV 1 e 2 perché contribuisce all'identificazione dei campioni che contengono sostanze potenzialmente interferenti con l'estrazione dell'acido nucleico e con l'amplificazione mediante PCR. Segue un elenco di alcune delle sostanze interferenti note:
 - I campioni contenenti sangue in quantità superiori al 40% del volume assorbito da ogni tampone possono produrre risultati falsi negativi. Non analizzare i campioni di colore rosso scuro o marrone.
 - I campioni contenenti mucina in quantità superiori a 4,8 mg per tampone possono produrre risultati falsi negativi.
 - I campioni contenenti feci in quantità superiori a 1,6 mg per tampone possono produrre risultati falsi negativi.
 - I campioni contenenti Vagisil crema in quantità superiori a 20 mg possono produrre risultati falsi negativi.

4. Un risultato positivo è indicativo della presenza del DNA di HSV, non necessariamente della presenza di virus vitali. Un risultato negativo non esclude la presenza di HSV, ma può essere causato da DNA insufficiente nel campione clinico.
5. Le mutazioni o i polimorfismi nelle regioni di legame al primer o alla sonda possono influenzare l'identificazione di varianti nuove o sconosciute, generando un risultato falso negativo con il test **cobas**® HSV 1 e 2.
6. Il valore predittivo di un saggio dipende dalla prevalenza della patologia in una determinata popolazione.
7. L'aggiunta dell'enzima AmpErase alla soluzione Master Mix del test **cobas**® 4800 HSV 1 e 2 consente l'amplificazione selettiva del DNA target, tuttavia per evitare la contaminazione dei reagenti e delle miscele di amplificazione è necessario attenersi scrupolosamente alle buone pratiche di laboratorio e alle procedure descritte nel presente foglio illustrativo.
8. L'uso di questo prodotto deve essere consentito esclusivamente a personale adeguatamente addestrato nelle tecniche PCR e nell'uso del sistema **cobas**® 4800.
9. Soltanto lo strumento **cobas**® x 480 e l'analizzatore **cobas**® z 480 sono stati approvati per l'uso con questo prodotto. Non è possibile utilizzare altri strumenti per la preparazione dei campioni o sistemi PCR con questo prodotto.
10. 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 allo scopo di qualificare tali differenze. Non è dunque prevedibile una concordanza percentuale del 100% tra i risultati, proprio a causa delle differenze descritte tra le tecnologie.
11. La contaminazione crociata può essere la causa di risultati falsi positivi. Uno studio non clinico, in cui campioni positivi molto alti sono stati alternati a campioni negativi in più sedute, ha individuato l'1,18% di contaminazioni crociate da campione a campione con il test **cobas**® HSV 1 e 2 eseguito sul sistema **cobas**® 4800. È stata studiata anche la contaminazione crociata da seduta a seduta.

Valutazione delle prestazioni non cliniche

Sensibilità analitica

Per determinare la sensibilità analitica (Limit of Detection, LOD) del test **cobas**® HSV 1 e 2 sono state analizzate alcune colture virali di HSV-1 e HSV-2 quantificate a più livelli di concentrazione, in una matrice simulata del campione di lesioni anogenitali. La matrice simulata era composta da mucina e cellule umane e imitava l'effetto dell'area clinica anogenitale sul test **cobas**® HSV 1 e 2. Tutti i livelli sono stati analizzati con almeno 21 replicati utilizzando il flusso di lavoro completo del test **cobas**® HSV 1 e 2, con cinque lotti di reagenti per il test **cobas**® HSV 1 e 2. Il limite di rilevazione (LOD) del test è definito come la concentrazione target a cui $\geq 95\%$ dei replicati è risultato positivo al test, sulla base dei risultati generati dal lotto di reagenti con le prestazioni peggiori.

Lo studio sulla sensibilità analitica ha preso in esame i ceppi HSV-1 MacIntyre e HSV-2 G. Il limite di rilevazione (LOD) del test **cobas**® HSV 1 e 2 per questi isolati è riportato nella Tabella 3.

Tabella 3. Limite di rilevazione (LOD) del test cobas® HSV 1 e 2

Organismo	Ceppo	ID ATCC	Livelli analizzati	LOD (TCID ₅₀ unità/ml)
HSV-1	MacIntyre	VR-539	6	0,479
HSV-2	G	VR-734	6	0,112

Identificazione dei ceppi di HSV-1 e HSV-2

Per verificare il limite di rilevazione (LOD) del test **cobas**® HSV 1 e 2 per i 4 ceppi di HSV-1 (VR-260, VR-733, VR-735 e VR-1493) e 3 ceppi di HSV-2 (VR-1779, VR-1781 e VR-540), sono stati analizzati 40 replicati per livello per più livelli di concentrazione. La preparazione delle diluizioni e dei campioni di analisi è avvenuta secondo una modalità simile a quella descritta in precedenza per lo studio sulla sensibilità analitica. Nella Tabella 4 e nella Tabella 5 sono riportati i livelli minimi a cui è stato osservato un tasso di successo di almeno il 95%.

Tabella 4. Limite di rilevazione (LOD) del test cobas® HSV 1 e 2 per i ceppi di HSV-1

Ceppi di HSV-1	ID ATCC	Livelli analizzati	LOD (TCID ₅₀ unità/ml)
KOS	VR-1493	5	3,41
HF	VR-260	6	14,07
F	VR-733	5	5,20
MP	VR-735	4	0,04

Tabella 5. Limite di rilevazione (LOD) del test cobas® HSV 1 e 2 per i ceppi di HSV-2

Ceppi di HSV-2	ID ATCC	Livelli analizzati	LOD (TCID ₅₀ unità/ml)
ATCC-2011-2	VR-1779	5	0,26
ATCC-2011-4	VR-1781	5	0,24
MS	VR-540	5	2,34

Precisione

Lo studio sulla precisione in-house è stato condotto con i virus HSV-1 e HSV-2 diluiti in una matrice di tampone anogenitale simulata, a livelli di concentrazione inferiori, prossimi e superiori al limite di rilevazione (LOD) del test **cobas**® HSV 1 e 2. È stato inoltre analizzato un livello negativo costituito solo dalla matrice di campione anogenitale simulata. Per lo studio sono stati utilizzati tre lotti unici di reagenti **cobas**® HSV 1 e 2 e tre strumenti, per un totale di 36 sedute in 12 giorni. Nella Tabella 6 è riportata una descrizione dei pannelli e i risultati dello studio di precisione. È stata eseguita un'analisi della varianza dei valori Ct dai test validi sui membri positivi del pannello, a concentrazioni superiori al limite di rilevazione (LOD). L'analisi ha evidenziato un coefficiente di variazione (CV %) pari al 2,2% per il valore Ct dell'HSV-1 e pari all'1,9% per il valore Ct dell'HSV-2 (vedere la Tabella 7 e la Tabella 8).

Tabella 6. Analisi del tasso di successo per lo studio di precisione in-house

Membro del pannello	Concentrazione		HSV-1 (N=72)			HSV-2 (N=72)		
	HSV-1	HSV-2	Risultati positivi	Tasso di successo	LC superiore bilaterale 95%	Risultati positivi	Tasso di successo	LC superiore bilaterale 95%
P1	Negativo	Negativo	0	0%	5%	0	0%	5%
P2	< LOD	< LOD	36	50%	62%	40	56%	67%
P3	~ LOD	Negativo	72	100%	100%	0	0%	5%
P4	Negativo	~ LOD	0	0%	5%	71	99%	100%
P5	~ 3 x LOD	~ LOD	72	100%	100%	72	100%	100%
P6	~ LOD	~ 3 x LOD	72	100%	100%	72	100%	100%

Tabella 7. Analisi dei componenti della varianza per il pannello dello studio di precisione a 3 x LOD

Target	Livello HSV	Ct medio	Componenti varianza/Incidenza percentuale sul totale					Totale
			Lotto	Formato kit	Strumento	Seduta/Giorno	Random	
HSV-1	~ 3 x LOD	37,4	0	0,06	0	0,355	0,289	0,704
			0%	8,60%	0%	50,40%	41,10%	100%
HSV-2	~ 3 x LOD	38,2	0,035	0	0,049	0,102	0,345	0,53
			6,50%	0%	9,10%	19,30%	65,00%	100%

Tabella 8. Deviazioni standard e coefficienti di variazione (%) per il pannello dello studio di precisione a 3 x LOD

Target	N	Ct medio	Componenti deviazione standard / CV (%)					Totale
			Lotto	Formato kit	Strumento	Seduta/Giorno	Random	
HSV-1	72	37,4	0	0,245	0	0,595	0,538	0,839
			0%	0,70%	0%	1,60%	1,40%	2,20%
HSV-2	72	38,2	0,186	0	0,22	0,32	0,587	0,728
			0,50%	0%	0,60%	0,80%	1,50%	1,90%

Inibizione competitiva

Sono stati creati dei pannelli con HSV-1 a ~ 3 x LOD e HSV-2 competitivo a ~ 300 x LOD (limite di rilevazione del test **cobas**® HSV 1 e 2) e viceversa. La concentrazione cento volte più alta dell'HSV-1 non ha impedito la rilevazione dell'HSV-2 a una concentrazione ~ 3 x LOD. La concentrazione cento volte più alta dell'HSV-2 non ha a sua volta impedito la rilevazione dell'HSV-1 a una concentrazione ~ 3 x LOD.

Specificità analitica

Per valutare la specificità analitica del test **cobas**® HSV 1 e 2 sono stati analizzati i seguenti pannelli di organismi: 1) 71 batteri, funghi e virus che possono essere presenti nei campioni dei tamponi anogenitali (Tabella 9), 2) cellule umane (Tabella 9) e 3) HSV-1 o HSV-2 ad alto titolo (Tabella 9). Tutti gli organismi, le cellule umane e i virus HSV-1 e HSV-2 sono stati aggiunti a 1×10^6 unità*/ml o a concentrazioni più elevate, fatta eccezione per *Treponema pallidum*, virus dell'herpes umano 8, *Chlamydia trachomatis* serovar H, *Mycoplasma genitalium* e *Mycoplasma hominis*, che sono stati aggiunti a concentrazioni inferiori a causa dei limiti di disponibilità dei rispettivi stock. Per determinare la specificità analitica del test **cobas**® HSV 1 e 2, i test sono stati eseguiti con gli organismi e le cellule umane soltanto, oppure con la presenza di HSV-1 e HSV-2 a concentrazioni $\sim 3 \times$ LOD, in modo da valutare la potenziale interferenza degli organismi e delle cellule umane rispetto all'identificazione dell'HSV-1 e dell'HSV-2 con il test **cobas**® HSV 1 e 2. I risultati consentono di affermare che né gli organismi analizzati, né le cellule umane presenti in concentrazioni elevate hanno prodotto risultati positivi in assenza dei target HSV-1 e HSV-2. Né gli organismi analizzati, né le cellule umane presenti in concentrazioni elevate hanno interferito con l'identificazione dei target HSV-1 e HSV-2. La presenza di HSV-1 a una concentrazione elevata ($1e6$ vp/ml) non ha determinato risultati falsi positivi all'HSV-2 e, analogamente, la presenza di HSV-2 a una concentrazione elevata ($1e6$ vp/ml) non ha determinato risultati falsi positivi all'HSV-1.

*La quantificazione di tutti i batteri è espressa in CFU (unità formanti colonie), fatta eccezione per: *Chlamydia trachomatis* serovar H e *Chlamydia trachomatis* serovar I, espresse in IFU (unità formanti inclusione); *Toxoplasma gondii* e *Treponema pallidum*, espressi in copie di DNA; *Trichomonas vaginalis*, espressa in cellule. La quantificazione dei seguenti virus è espressa in unità TCID₅₀: citomegalovirus (HHV5); virus dell'herpes umano 6B, ceppo Z29; virus dell'herpes umano 7, ceppo SB; virus dell'herpes umano 8; echovirus 11; enterovirus umano 71; rubivirus. La quantificazione dei virus HHV-6A, ceppo GS e HSV-1 e HSV-2 è espressa in particelle virali. La quantificazione dei virus HIV-1, ceppo IIIB e HBV è espressa in UI (unità internazionali). La quantificazione dell'HIV-2, ceppo NIH-Z, del virus di Epstein-Barr (HHV4), del virus Varicella-Zoster (HHV3) e dei plasmidi di HPV (HPV11, HPV16, HPV18, HPV06) è espressa in copie di DNA. Le cellule mononucleate di sangue periferico (PBMC) sono espresse in numero di cellule.

Tabella 9. Test della specificità analitica di microorganismi e cellule

Adenovirus umano tipo 7	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	<i>Moraxella catarrhalis</i>
Citomegalovirus (HHV5)	<i>Staphylococcus aureus</i> (MSSA)	<i>Moraxella lacunata</i>
Virus di Epstein-Barr (HHV4)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Virus Varicella-Zoster (HHV3)	<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i> *
Virus dell'herpes umano 6A, ceppo GS	<i>Escherichia coli</i>	<i>Mycoplasma hominis</i> *
Virus dell'herpes umano 6B, ceppo Z29	<i>Chlamydia trachomatis</i> serovar H*	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
Virus dell'herpes umano 7, ceppo SB	<i>Chlamydia trachomatis</i> serovar I	<i>Neisseria meningitidis</i>
Virus dell'herpes umano 8*	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Prevotella melaninogenica</i>
Echovirus 11	<i>Clostridium difficile</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
Enterovirus 71	<i>Corynebacterium genitalium</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
HBV	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
HIV-1, ceppo IIIB	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
HIV-2, ceppo NIH-Z	<i>Enterococcus faecalis</i> vanB	<i>Streptococcus mitis</i>
HPV11	<i>Enterococcus faecium</i> vanA	<i>Streptococcus mutans</i>
HPV16	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
HPV18	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>

HPV6	<i>Gemella haemolysans</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>
Rubivirus	<i>Haemophilus ducreyi</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Treponema pallidum</i> *
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	<i>Kingella kingae</i>	<i>Trichomonas vaginalis</i>
<i>Actinomyces israelii</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> sottospecie <i>ozaenae</i>	<i>Veillonella parvula</i>
<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	PBMC (DNA genomico umano)
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	Virus dell'herpes simplex 1
<i>Candida albicans</i>	<i>Mobiluncus curtisii</i> spp. <i>curtisii</i>	Virus dell'herpes simplex 2
<i>Candida glabrata</i>	<i>Mobiluncus mulieris</i>	-

* Il virus dell'herpes umano 8 è stato analizzato a $1,3 \times 10^4$ TCID₅₀ unità/ml; la *Chlamydia trachomatis* serovar H è stata analizzata a $1,9 \times 10^4$ IFU/ml; il *Mycoplasma genitalium* è stato analizzato a $1,0 \times 10^5$ CFU/ml; il *Mycoplasma hominis* è stato analizzato a $1,5 \times 10^4$ CFU/ml; il *Treponema pallidum* è stato analizzato a $9,0 \times 10^4$ copie/ml.

Interferenze

Per verificare la potenziale interferenza di alcuni prodotti d'uso comune con il test **cobas**® HSV 1 e 2, sono stati analizzati 20 farmaci da banco e antivirali, oltre a sangue intero, albumina serica umana, urina, feci e mucina. Tutti i prodotti da banco sono stati analizzati ai livelli uguali o superiori a quelli verosimilmente raccolti da un normale campione di lesione anogenitale, ovvero 20 mg e 40 mg per tampone nel caso dei solidi e 100% della capacità di assorbimento del tampone nel caso dei liquidi. Tutti i farmaci antivirali sono stati analizzati a un livello 3 volte superiore alla concentrazione massima (3 x C_{max}) nel campione prelevato. L'HSV-1 e l'HSV-2 sono stati aggiunti a una concentrazione circa 3 volte superiore al limite di rilevazione (~ 3 x LOD) del test **cobas**® HSV 1 e 2 e sono stati utilizzati come target nei test.

Non è stata osservata nessuna interferenza dei prodotti da banco, ad eccezione di Vagisil crema (interferenza osservata a 20 mg). Per quanto riguarda il sangue intero, non è stata osservata nessuna interferenza fino al 40% della capacità del tampone; per la mucina, nessuna interferenza fino a 4,8 mg per tampone; per l'urina, nessuna interferenza fino al 100% della capacità del tampone; per le feci, nessuna interferenza fino a 1,6 mg per tampone; per l'albumina serica umana, nessuna interferenza fino a 16 mg per tampone. I risultati sono riassunti nella Tabella 10.

Tabella 10. Risultati dei test con le sostanze interferenti

Sostanza	Interpretazione
Sangue intero	Nessuna interferenza osservata fino al 40% della capacità del tampone
Mucina	Nessuna interferenza osservata fino a 4,8 mg per tampone
Urina	Nessuna interferenza osservata
Feci	Nessuna interferenza osservata fino a 1,6 mg per tampone
Albumina serica umana	Nessuna interferenza osservata fino a 16 mg per tampone
K-Y Brand Jelly, lubrificante intimo	Nessuna interferenza osservata
Gynol II, gel contraccettivo	Nessuna interferenza osservata
YeastGard, supposte vaginali	Nessuna interferenza osservata
Monistat 1	Nessuna interferenza osservata
Monistat 3	Nessuna interferenza osservata
VagiStat 1	Nessuna interferenza osservata

Clotrimazolo, crema vaginale	Nessuna interferenza osservata
Preparazione H, crema per emorroidi	Nessuna interferenza osservata
Abreva, trattamento delle screpolature	Nessuna interferenza osservata
Releev, trattamento delle screpolature	Nessuna interferenza osservata
Aciclovir crema	Nessuna interferenza osservata
Vagisil crema	Interferenza osservata a 20 mg*
Balneol, lozione di pulizia intima	Nessuna interferenza osservata fino a 20 mg*
Vagicaïne, crema antiprurito	Nessuna interferenza osservata fino a 20 mg*
VH Essentials, lavanda vaginale	Nessuna interferenza osservata
Denavir	Nessuna interferenza osservata
Famciclovir	Nessuna interferenza osservata
Valaciclovir	Nessuna interferenza osservata
Cidofovir	Nessuna interferenza osservata
Aciclovir	Nessuna interferenza osservata

* 20 mg sono la quantità media tipica di prodotto non liquido direttamente assorbita dal tampone FLOQSwab.

Prestazioni cliniche con i campioni clinici

Le prestazioni del test **cobas**® HSV 1 e 2 sono state valutate rispetto a quelle di uno tra i più avanzati test di amplificazione degli acidi nucleici (Nucleic Acid Tests, NAAT), dotato di approvazione FDA e marchio CE. Da ogni soggetto arruolato nello studio sono stati prelevati due campioni su tamponi anogenitali. Il campione destinato al test **cobas**® HSV 1 e 2 è stato prelevato con il sistema di raccolta, trasporto e conservazione MSwab; il campione destinato al test comparativo è stato prelevato con il sistema di trasporto virale universale COPAN.

In totale sono stati prelevati 370 tamponi di lesioni anogenitali presso vari siti negli USA, successivamente analizzati con il test **cobas**® HSV-1 e 2 e con il test comparativo. Sono stati identificati 33 campioni positivi all'HSV-1 e 147 campioni positivi all'HSV-2 in base al test **cobas**® HSV 1 e 2 (prevalenza: HSV-1 8,9%, HSV-2 39,7%). Nella Tabella 11 sono illustrate le prestazioni del test **cobas**® HSV 1 e 2 e del test NAAT comparativo senza risoluzione delle discrepanze. I risultati discrepanti tra il test **cobas**® HSV 1 e 2 e il test comparativo sono stati risolti con il sequenziamento. Dopo avere risolto le discrepanze, sono state stimate la sensibilità e la specificità del test **cobas**® HSV 1 e 2. I risultati sono illustrati nella Tabella 12.

Tabella 11. Test cobas® HSV 1 e 2 e test NAAT comparativo

HSV-1		Test NAAT comparativo		
		Positivi	Negativi	Totale
cobas ® HSV 1 e 2	Positivi	31	2	33
	Negativi	1	336	337
	Totale	32	338	370
		Stima	IC inferiore monolaterale 95%	
Concordanza positiva percentuale		96,9%	86,0%	
Concordanza negativa percentuale		99,4%	98,1%	

HSV-2		Test NAAT comparativo		
		Positivi	Negativi	Totale
cobas® HSV 1 e 2	Positivi	127	20	147
	Negativi	0	223	223
	Totale	127	243	370
		Stima	IC inferiore monolaterale 95%	
Concordanza positiva percentuale		100%	97,7%	
Concordanza negativa percentuale		91,8%	88,3%	

Tabella 12. Test cobas® HSV-1 e 2 e test NAAT comparativo dopo la risoluzione delle discrepanze

HSV-1		Test NAAT comparativo		
		Positivi	Negativi	Totale
cobas® HSV 1 e 2	Positivi	32	1	33
	Negativi	0	337	337
	Totale	32	338	370
		Stima	IC inferiore monolaterale 95%	
Sensibilità*		100%	91,1%	
Specificità*		99,7%	98,6%	

HSV-2		Test NAAT comparativo		
		Positivi	Negativi	Totale
cobas® HSV 1 e 2	Positivi	141	5	146
	Negativi	0	223	223
	Totale	141	228	369**
		Stima	IC inferiore monolaterale 95%	
Sensibilità*		100%	97,9%	
Specificità*		97,8%	95,4%	

* sono stati sequenziati solo i campioni discrepanti per risolvere la discrepanza.

** dall'analisi è stato escluso un campione discrepante per il quale non erano disponibili i dati di sequenziamento.

Sulla base delle stime della sensibilità e specificità dopo la risoluzione delle discrepanze tramite sequenziamento, i valori predittivi dei risultati positivi al test **cobas®** HSV 1 e 2 per i campioni dello studio rappresentano il 97,0% per HSV-1 e il 96,8% per HSV-2; i valori predittivi dei risultati negativi rappresentano il 100% sia per HSV-1 che per HSV-2.

Informazioni supplementari

Caratteristiche specifiche del saggio

Tipo di campione	Campioni di lesioni anogenitali
Quantità di campione richiesta	1,6 ml di terreno di trasporto MSwab nella provetta primaria; minimo 700 µl per l'esecuzione di un test cobas ® HSV 1 e 2.
Durata del test	Risultati disponibili entro 2,5 ore dal caricamento dei campioni sul sistema (1-22 campioni).
Sensibilità analitica	0,479 TCID ₅₀ unità/ml per HSV-1 (ceppo MacIntyre, ATCC VR-539); 0,112 TCID ₅₀ unità/ml per HSV-2 (ceppo G, ATCC VR-734)
Specificità	Assenza di reattività crociata con 71 organismi strettamente correlati o organismi comunemente presenti nei campioni di lesioni anogenitali. Assenza di falsi positivi all'HSV-2 in presenza di HSV-1 a 1×10^6 vp/ml; assenza di falsi positivi all'HSV1 in presenza di HSV-2 a 1×10^6 vp/ml.
Inclusività	Analizzati 5 ceppi di HSV-1 e 4 ceppi di HSV-2.

Simboli

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

Tabella 13. 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	 SN Numero di serie
 Assigned Range [copies/mL] Intervallo assegnato (copie/mL)	 Distributore <i>(Nota: il paese e/o la regione applicabili potrebbero essere indicati sotto il simbolo.)</i>	 Site Laboratorio
 Assigned Range [IU/mL] Intervallo assegnato (UI/mL)	 Non riutilizzare	 Procedure Standard Procedura standard
 EC REP Mandatario nella Comunità Europea	 Femmina	 STERILE EO Sterilizzazione con ossido di etilene
 BARCODE Foglio di dati del barcode	 Solo per valutazione delle prestazioni IVD	 Conservare al buio
 LOT Codice del batch	 GTIN Global Trade Item Number	 Limiti di temperatura
 Rischio biologico	 Importatore	 File di definizione del test
 REF Numero di catalogo	 IVD Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i>	 TDF
 CE Contrassegno di conformità CE: questo dispositivo è conforme ai requisiti pertinenti del marchio CE relativamente ai dispositivi medico-diagnostici <i>in vitro</i>	 LLR Limite inferiore dell'intervallo assegnato	 Alto
 Collect Date Data di raccolta	 Maschio	 Procedure UltraSensitive Procedura ultrasensibile
 Consultare le istruzioni per l'uso	 Fabbricante	 UDI Identificazione univoca del dispositivo
 Contenuto sufficiente per <n> test	 CONTROL - Controllo negativo	 ULR Limite superiore dell'intervallo assegnato
 CONTENT Contenuto del kit	 Non sterile	 Urine Fill Line Riga di riempimento urina
 CONTROL Controllo	 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.
 Data di produzione	 Numero del paziente	 Utilizzare entro la data
 Dispositivo idoneo ai test POC	 Staccare qui	
 Dispositivo idoneo all'autodiagnosi	 CONTROL + Controllo positivo	
	 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 14 Produttore e importatore



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

Prodotto in USA



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, Germany

Marchi e brevetti

Vedere <https://diagnostics.roche.com/us/en/about-us/patents>

Copyright

©2024 Roche Molecular Systems, Inc.



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116
68305 Mannheim
Germany



Bibliografia

1. Fatahzadeh M, Schwartz RA. Human herpes simplex virus infections: epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management. *J Am Acad Dermatol.* 2007;57(5):737-763; quiz 764-766.
2. Gupta R, Warren T, Wald A. Genital herpes. *Lancet.* 2007;370(9605):2127-2137.
3. Paz-Bailey G, Ramaswamy M, Hawkes SJ, Geretti AM. Herpes simplex virus type 2: epidemiology and management options in developing countries. *Sex Transm Infect.* 2007;83(1):16-22.
4. Xu F, Sternberg MR, Kottiri BJ, et al. Trends in herpes simplex virus type 1 and type 2 seroprevalence in the United States. *JAMA.* 2006;296(8):964-973.
5. Seroprevalence of herpes simplex virus type 2 among persons aged 14-49 years--United States, 2005-2008. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2010;59(15):456-459.
6. Langenberg AG, Corey L, Ashley RL, Leong WP, Straus SE. A prospective study of new infections with herpes simplex virus type 1 and type 2. Chiron HSV vaccine study group. *N Engl J Med.* 1999;341(19):1432-1438.
7. Lafferty WE, Coombs RW, Benedetti J, Critchlow C, Corey L. Recurrences after oral and genital herpes simplex virus infection. Influence of site of infection and viral type. *N Engl J Med.* 1987;316(23):1444-1449.
8. Engelberg R, Carrell D, Krantz E, Corey L, Wald A. Natural history of genital herpes simplex virus type 1 infection. *Sex Transm Dis.* 2003;30(2):174-177.
9. Benedetti J, Corey L, Ashley R. Recurrence rates in genital herpes after symptomatic first-episode infection. *Ann Intern Med.* 1994;121(11):847-854.
10. Ryan C, Kinghorn G. Clinical assessment of assays for diagnosis of herpes simplex infection. *Expert Rev Mol Diagn.* 2006;6(5):767-775.
11. Scoular A, Gillespie G, Carman WF. Polymerase chain reaction for diagnosis of genital herpes in a genitourinary medicine clinic. *Sex Transm Infect.* 2002;78(1):21-25.
12. Strick LB, Wald A. Diagnostics for herpes simplex virus: is PCR the new gold standard? *Mol Diagn Ther.* 2006;10(1):17-28.
13. Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene.* 1990;93(1):125-128.
14. 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. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. 5th edition. Revised December 2009.
15. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections. CLSI document M29-A3 Villanova, PA. Approved guideline-third edition. 2005.
16. International Air Transport Association. Dangerous Goods Regulations. 48th edition. 2007.
17. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Viral Culture. CLSI document M41-A Wayne, PA. Approved guideline. 2006.

Revisione del documento

Informazioni sulla revisione del documento	
Doc. Rev. 4.0 02/2024	Le informazioni sui rischi del Lysis Kit 1 sono state aggiornate. Aggiornamento della sezione Marchi e brevetti , collegamento incluso. Aggiornamento dei marchi cobas® . Per ulteriori domande e chiarimenti, è possibile rivolgersi al rappresentante Roche locale.

Per prendere visione del report sintetico sulla sicurezza e sulle prestazioni, utilizzare il seguente collegamento:
<https://ec.europa.eu/tools/eudamed>