

cobas[®] CHIKV/DENV

Test degli acidi nucleici per l'uso sui cobas[®] 6800/8800 Systems

Per uso diagnostico in vitro

cobas[®] CHIKV/DENV – 480	P/N: 08042276190
cobas[®] CHIKV/DENV Control Kit	P/N: 08042136190
cobas[®] NHP Negative Control Kit	P/N: 07002220190
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	8
Reagenti e controlli cobas® CHIKV/DENV	8
Reagenti cobas omni per la preparazione dei campioni.....	10
Requisiti per la conservazione e la manipolazione dei reagenti.....	12
Materiali aggiuntivi necessari	13
Strumentazione e software necessari	13
Precauzioni e requisiti per l'uso.....	14
Avvertimenti e precauzioni.....	14
Manipolazione dei reagenti.....	15
Buone pratiche di laboratorio.....	15
Raccolta, trasporto, conservazione e creazione di pool di campioni.....	16
Campioni di donatori viventi	16
Istruzioni per l'uso.....	18
Pipettamento automatico dei campioni e creazione di pool (opzionale)	18
Note sulla procedura.....	18
Esecuzione del test cobas® CHIKV/DENV	18
Risultati	19
Controllo di qualità e validità dei risultati	19
Interpretazione dei risultati	20
Test di ripetizione su singolo campione.....	20
Limiti della procedura	20

Valutazione delle prestazioni non cliniche.....21

Caratteristiche delle prestazioni (campioni da donatori viventi)	21
Limite di sensibilità (LoD).....	21
Riproducibilità	24
Verifica del genotipo	26
Specificità analitica	26
Correlazione	29
Tasso globale d'errore del sistema	29

Informazioni supplementari.....30

Caratteristiche del test	30
Simboli.....	31
Produttore e distributori	32
Marchi e brevetti.....	32
Copyright.....	32
Bibliografia	33
Revisione del documento	35

Uso previsto

Il test cobas® CHIKV/DENV per l'uso sui cobas® 6800/8800 Systems è un esame *in vitro* qualitativo per la rilevazione diretta dell'RNA del virus Chikungunya (CHIKV) e dell'RNA dei sierotipi 1-4 del virus Dengue (DENV) in plasma umano.

Il test è destinato all'uso nello screening dell'RNA di CHIKV e dell'RNA di DENV, singolarmente o simultaneamente, in plasma ottenuto da singoli donatori umani, inclusi donatori di sangue intero, emocomponenti e altri donatori viventi. Il test è inoltre destinato all'uso nello screening di organi e tessuti ottenuti da donatori con prelievo del campione a cuore battente. Per lo screening del plasma di tutti i donatori, è possibile analizzare i campioni individualmente. Per lo screening del sangue intero e degli emocomponenti, è possibile analizzare i campioni di plasma individualmente o in pool costituiti da aliquote di singoli campioni.

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

Questo test non è destinato all'uso come supporto nella diagnosi di CHIKV o DENV.

Riassunto e spiegazione del test

Premessa

Il DENV è un virus a RNA portato da artropodi (arbovirus). Appartiene alla famiglia dei Flaviviridae, come il virus del Nilo Occidentale (WNV), il virus della febbre gialla e altri 70 virus circa.¹ Analogamente agli altri arbovirus, il virus DENV si mantiene in un ciclo enzootico tra insetti ematofagi (principalmente la zanzara *Aedes aegypti*) e ospiti vertebrati suscettibili (umani).^{2,3} L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) stima che il virus DENV sia endemico in oltre 100 paesi nelle regioni tropicali e subtropicali del mondo, dove sono a rischio 2,5 miliardi di persone.² In America latina e ai Caraibi, Porto Rico incluso, c'è stata una forte crescita dell'incidenza del virus DENV negli ultimi anni, al punto da far emergere la preoccupazione che la zanzara *Ae. aegypti* (vettore del virus DENV) e il virus DENV possano diffondersi fino agli Stati Uniti.⁴ La pandemia del 2010 ha causato un costo globale stimato attorno ai 390 milioni di infezioni da virus DENV, di cui 96 milioni di infezioni da virus DENV asintomatiche e 500.000 casi gravi di febbre Dengue.⁵

Le infezioni cliniche da virus DENV si manifestano per la maggior parte come “febbre Dengue”, definita dall'OMS come stato febbrile associato ad almeno altri 2 sintomi tra: brividi, dolori articolari (spesso forti, tanto che l'infezione da DENV è chiamata anche “febbre delle ossa rotte”), mialgia, artralgia, dolore agli occhi, esantema e lesioni elementari della cute.² La “febbre dengue grave” include febbre emorragica e convulsioni.² Il virus DENV è stato classificato in quattro sierotipi correlati, ma distinti dal punto di vista immunologico: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. L'infezione con un sierotipo DENV rende immuni a vita a quel sierotipo DEV e assicura una protezione incrociata a breve termine (≤ 2 mesi) contro l'infezione con gli altri tre sierotipi DENV.⁶

Il virus DENV può essere trasmesso per via trasfusionale.^{2,6,7} La prima trasmissione del virus DENV attraverso trasfusione fu documentata nel 2002 a Hong Kong, nel corso di un'epidemia locale. I test RT-PCR dimostrarono che i campioni del donatore e del ricevente erano entrambi positivi all'RNA di DENV-1.^{8,9} Alcuni focolai di trasmissioni di DENV associate a trasfusioni furono osservati a Singapore nel 2007¹⁰ e a Porto Rico nel 2007, quando fu riscontrato anche un caso di febbre emorragica trasmessa per via trasfusionale.^{1,6} Durante un'epidemia in Brasile nel 2012, 42 donazioni positive all'RNA di DENV-4 furono utilizzate per trasfusioni su 35 persone e causarono sei infezioni da DENV trasmesse per via trasfusionale.^{11,12}

Le infezioni da DENV sono per la maggior parte asintomatiche (tra il 53 e l'87%), per questo è possibile che dei soggetti infetti donino sangue.² Uno screening di ricerca sulle donazioni di sangue a Porto Rico ha rivelato percentuali di positività comprese tra lo 0,03% e lo 0,31% negli anni delle recenti epidemie (2005, 2007, 2010, 2011 e 2012).² In base a uno studio condotto su 39.134 donazioni di sangue raccolte durante l'epidemia di DENV del 2012 in Brasile, la viremia di DENV-4 interessava lo 0,51% delle donazioni di Rio de Janeiro e lo 0,80% delle donazioni di Recife.^{11,12} Anche i CDC (Centers for Disease Control) hanno elaborato modelli che stimano trend simili.⁴ Mentre continua la ricerca sull'immunizzazione, al momento non esiste un vaccino contro l'infezione da DENV; le cure sono di sostegno.⁵

Il CHIKV è un virus a RNA portato da artropodi (arbovirus) della famiglia dei Togaviridae. Il virus CHIKV si mantiene in un ciclo enzootico tra insetti ematofagi (la zanzara *Ae. aegypti* e, a partire almeno dal 2005, la zanzara tigre *Ae. albopictus*) e umani.² L'infezione da CHIKV è chiamata “Chikungunya” (espressione che nella lingua Makonde della Tanzania e del Mozambico significa “ciò che ti fa piegare”) e si manifesta con una sintomatologia simile a quella del virus DENV, oltre che negli stessi periodi endemici. Tuttavia l'infezione da CHIKV è caratterizzata da dolori alle articolazioni e artralgie talmente forti da immobilizzare i pazienti e impedirgli di alzarsi in piedi per il male.^{2,13} Raramente l'infezione da CHIKV può rivelarsi fatale in seguito a complicanze come encefalite o altre forme di encefalopatia, miocardite, epatite o insufficienza multiorgano.¹⁴

Il virus CHIKV fu scoperto per la prima volta in Tanzania nel 1952 e, per qualche decennio, è stato individuato come causa di epidemie sporadiche in Africa e in Asia.¹⁴ Sono stati identificati tre ceppi distinti di CHIKV: il ceppo dell'Africa occidentale, il ceppo dell'Africa centrale, orientale e meridionale (ECSA) e il ceppo asiatico, che deriva dal virus ECSA.¹⁴ Dal 2000 c'è stata una recrudescenza del virus CHIKV, che ha causato epidemie con forme più gravi rispetto a quelle documentate in passato.¹⁴ Dopo un'assenza durata 32 anni in India, il virus CHIKV causò una grave epidemia che coinvolse 13 stati nel 2006-2007.^{14,15} Ci fu una grande epidemia di CHIKV in India nel 2006 e nel 2007. Anche in altri paesi del sud-est asiatico ci sono state epidemie di CHIKV. Dal 2005 sono stati segnalati 1,9 milioni di casi di CHIKV tra India, Indonesia, Maldive, Myanmar e Thailandia.¹⁵ A luglio del 2017, in Pakistan e in Kenya erano ancora in corso epidemie iniziate nel 2016.¹⁵

Tra la fine del 2005 fino a tutto il 2007 un'epidemia esplosiva di CHIKV interessò l'isola della Riunione e altre isole dell'Oceano Indiano sud-occidentale fino all'Africa orientale, con 300.000 casi clinici rilevati sulla sola isola della Riunione (il 40% della popolazione dell'isola), di cui il 75% sintomatici.^{2,16} Qui venne identificata una mutazione della proteina associata all'envelope virale nella zanzara *Ae. albopictus* (alternativa alla zanzara *Ae. aegypti*, già nota come vettore del virus CHIKV), che causò un aumento della carica virale e della virulenza nell'epidemia sull'isola della Riunione.¹⁷ In seguito la zanzara *Ae. albopictus* fu identificata come insetto vettore nelle epidemie che colpirono l'India, l'Italia settentrionale e i Caraibi.^{2,18,19} Sebbene non furono riscontrate infezioni da CHIKV trasmesse per via trasfusionale durante l'epidemia del 2005-2007 sull'isola della Riunione, furono comunque adottate misure aggressive per ridurre al minimo il rischio di trasfusioni infette, che secondo le stime avrebbero potuto interessare anche 1.500 donazioni ogni 100.000 (1,5%).^{2,16}

In Europa sono stati segnalati casi sporadici di CHIKV. La prima epidemia locale europea (197 casi), avvenuta nel 2007 in Italia nord-orientale, fu una conferma che anche in Europa possono diffondersi epidemie associate alla zanzara *Ae. albopictus*.¹⁵ Nel 2014 furono segnalati almeno 11 casi autoctoni di CHIKV a Montpellier, in Francia, causati dalla presenza di zanzare tigre infestanti (*Ae. albopictus*) nelle vicinanze di un caso importato.²⁰

Prima del 2013, altre epidemie di CHIKV erano state segnalate in Africa, Asia, Europa e nelle isole degli oceani Indiano e Pacifico, ma la trasmissione del virus CHIKV non era mai stata documentata nel continente americano.^{2,21} Nondimeno il rischio di un'epidemia di CHIKV veniva studiato da tempo, data la prevalenza dei vettori e la loro efficienza nella trasmissione dei virus della Dengue.²¹ La prima infezione da CHIKV acquisita localmente nel continente americano fu documentata a Saint Martin a dicembre del 2013.²¹

Il virus CHIKV resta una fonte di preoccupazione per il continente americano e per i Caraibi. Al 14 luglio 2017, i casi sospetti di CHIKV a trasmissione autoctona segnalati dall'Organizzazione Panamericana della Sanità (OPS) erano 58.806 (di cui 28.654 confermati) tra America Latina, Caraibi e Nord America, con 13 decessi registrati in Brasile.²² La maggioranza dei casi (52.724) si concentrava in Brasile, mentre i restanti casi venivano segnalati in Bolivia, Colombia, Costa Rica, El Salvador, Guyana francese, Guadalupa, Guatemala, Martinica, Nicaragua, Panama, Paraguay, Perù, Porto Rico, Saint-Barthélemy, Saint Martin e Venezuela.²²

Cresce la preoccupazione per la diffusione del virus CHIKV negli USA. Prima del 2006, l'infezione da CHIKV aveva interessato solo raramente i viaggiatori in arrivo negli USA e non c'erano stati casi documentati di infezione acquisita nel paese.²³ Tra il 2006 e il 2013, in media 28 persone (tra 5 e 65) all'anno risultarono positive ai test per una infezione recente da CHIKV; tutti erano viaggiatori arrivati da o di ritorno dalle regioni interessate dell'Asia, dell'Africa o dell'Oceano Indiano.²³ Nel 2014 sono stati segnalati ad ArboNET 2.811 casi di infezione da CHIKV da 47 stati USA (esclusi Alaska, Nebraska e Wyoming), tra cui 12 casi di trasmissione locale in Florida.²³ Tutti gli altri casi riguardavano viaggiatori di ritorno dalle regioni interessate.²³ In totale, nel 2014 sono stati segnalati ad ArboNET 4.710 casi di infezione da CHIKV dalle dipendenze territoriali USA (Porto Rico, Isole Vergini Americane e Isole Samoa Americane).²³

Dal 2015 esiste l'obbligo di segnalazione nazionale negli USA per l'infezione da CHIKV. Nel 2015 sono stati segnalati ad ArboNET 679 casi di infezione da CHIKV da 44 stati (esclusi Delaware, Louisiana, Nuovo Messico, Dakota del Sud, Virginia Occidentale e Wyoming); tutti erano viaggiatori di ritorno dalle regioni interessate.²⁴ Nel 2015 sono stati segnalati ad ArboNET 202 casi di infezione da CHIKV dalle dipendenze territoriali USA (Porto Rico e Isole Vergini Americane), di cui 202 infezioni trasmesse localmente.²⁴ Nel 2016 sono stati segnalati ad ArboNET 175 casi di infezione da CHIKV da 37 stati USA (tutti esclusi Alaska, Colorado, Idaho, Maine, Mississippi, Nevada, Dakota del Nord, Oklahoma, Oregon, Dakota del Sud, Vermont, Virginia Occidentale e Wyoming).²⁵ Tutti i 175 casi erano viaggiatori di ritorno dalle regioni interessate; non ci sono stati casi di infezione trasmessa localmente.²⁵ In totale sono stati segnalati 171 casi di chikungunya dalle dipendenze territoriali USA (tutti da Porto Rico), di cui 170 acquisiti localmente e un solo caso associato a un viaggio.²⁵ La preoccupazione che il virus CHIKV si diffonda oltre la Florida è aumentata dopo la scoperta della presenza di zanzare *Ae. aegypti* nella contea di Los Angeles (zone di Commerce e Pico Rivera).²⁶

Perché utilizzare i test degli acidi nucleici

L'infezione da DENV può essere trasmessa per via trasfusionale.^{2,6,7} Benché la trasmissione dell'infezione da CHIKV per via trasfusionale non sia stata mai documentata, la possibilità che l'infezione da CHIKV possa essere trasmessa con una trasfusione si basa sulla trasmissibilità per via trasfusionale di altri arbovirus come il virus DENV.² La maggior parte delle infezioni da DENV (tra il 53% e l'87%) e molte infezioni da CHIKV (il 25% circa) sono asintomatiche, per questo è possibile che dei soggetti infetti donino sangue.^{2,6,7} Dal momento che i soggetti infetti potrebbero non sviluppare una forma clinicamente significativa della malattia e restare asintomatici, per identificare i donatori infetti non è sufficiente chiedere ai donatori di sangue se hanno notato sintomi recenti compatibili con un'infezione da CHIKV o da DENV.

Spiegazione del test

Il test **cobas**® CHIKV/DENV è un esame PCR qualitativo per la rilevazione dell'RNA di CHIKV e di DENV sul **cobas**® 6800 System e sul **cobas**® 8800 System. Il test **cobas**® CHIKV/DENV consente la rilevazione simultanea, o a singolo target, dell'RNA di CHIKV e di DENV eseguendo un unico test su una singola donazione di plasma o su un pool di plasma costituito da più donazioni singole.

Principi della procedura

Il test **cobas**® CHIKV/DENV si basa su una procedura di preparazione dei campioni completamente automatizzata (estrazione e purificazione degli acidi nucleici), seguita da 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 risultati non reattivi, reattivi o non validi a tutti i test. I risultati possono essere visualizzati direttamente sullo schermo del sistema o stampati in un report.

È possibile analizzare i campioni uno ad uno oppure 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.

Gli acidi nucleici del campione e delle molecole di Armored RNA del controllo interno (IC) aggiunto, che funge da controllo del processo di preparazione e amplificazione/rilevazione del campione, vengono estratti simultaneamente. Inoltre il test utilizza due controlli esterni, uno positivo e uno negativo. Gli acidi nucleici virali vengono rilasciati grazie all'aggiunta della proteinasi e del reagente di lisi nel campione. Dopo il loro rilascio, gli acidi nucleici si legano alla superficie di silice delle biglie di vetro magnetiche aggiunte. Le sostanze che non formano legami e le impurità (ad esempio proteine denaturate, detriti cellulari e potenziali inibitori della PCR, come l'emoglobina) vengono rimosse nei passaggi successivi con il reagente di lavaggio, mentre gli acidi nucleici purificati vengono eluiti 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).²⁷⁻²⁹ Tutti gli ampliconi contaminanti che sono stati prodotti da sessioni precedenti di PCR verranno eliminati dall'enzima AmpErase [uracil-N-glicosilasi] presente nella miscela 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**® CHIKV/DENV contiene sonde di rilevazione specifiche per gli acidi nucleici di CHIKV, DENV e controllo interno (IC). Ognuna delle sonde di rilevazione specifiche per CHIKV, DENV e IC è marcata con uno dei tre fluorocromi univoci che agiscono da rivelatori (reporter). Ogni sonda contiene anche un quarto fluorocromo che agisce da soppressore (quencher). Le misurazioni dei tre fluorocromi reporter vengono effettuate a lunghezze d'onda fisse, consentendo così l'identificazione e la discriminazione dei target amplificati di CHIKV e DENV e del controllo interno (IC).^{30,31} Quando non è legato alla sequenza target, il segnale fluorescente delle sonde intatte è soppresso dal fluorocromo quencher. Nella fase di amplificazione PCR, l'ibridizzazione delle sonde con lo stampo specifico di DNA a filamento unico determina la scissione della sonda ad opera dell'attività nucleasica 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 tre fluorocromi reporter avvengono a lunghezze d'onda fisse, possono avere luogo la rilevazione e la discriminazione simultanee dei target amplificati di CHIKV e DENV e del controllo interno (IC).

Reagenti e materiali

Reagenti e controlli cobas® CHIKV/DENV

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

Tabella 1 cobas® CHIKV/DENV

cobas® CHIKV/DENV		
Conservare a 2-8°C		
Cassetta per 480 test (P/N 08042276190)		
Componenti del kit	Ingredienti del reagente	Quantità per kit 480 test
Soluzione proteinasi (PASE)	Tampone Tris, < 0,05% EDTA, cloruro di calcio, acetato di calcio, 8% proteinasi (p/v) EUH210: Scheda dati di sicurezza disponibile su richiesta. EUH208: Contiene subtilisina. Può provocare una reazione allergica.	38 ml
Controllo Interno (IC)	Tampone Tris, < 0,05% EDTA, < 0,001% costruito di Armored RNA del controllo interno (RNA non infettivo, incapsulato in MS2 batteriofaga), < 0,002% Poly rA RNA (sintetico), < 0,1% sodio azide	38 ml
Tampone di eluizione (EB)	Tampone Tris, 0,2% metil-4 idrossibenzoato	38 ml
Master Mix Reagente 1 (MMX-R1)	Acetato di manganese, idrossido di potassio, < 0,1% sodio azide	14,5 ml
CHIKV/DENV Master Mix Reagente 2 (CHIKV/DENV MMX-R2)	Tampone tricina, acetato di potassio, glicerolo, 18% dimetil-solfossido, < 0,1% Tween 20, EDTA, < 0,14% dATP, dGTP, dCTP, dUTP, < 0,01% primer upstream e downstream di CHIKV e DENV, < 0,01% primer forward e reverse di IC, < 0,01% sonda fluorescente CHIKV, DENV e IC, < 0,01% aptamero oligonucleotidico, < 0,01% DNA polimerasi Z05D, < 0,01% enzima AmpErase (uracil-N-glicosilasi) (batterico), < 0,1% sodio azide	17,5 ml

Tabella 2 cobas® CHIKV/DENV Control Kit**cobas® CHIKV/DENV Control Kit**

Conservare a 2–8°C

(P/N: 08042136190)

Componenti del kit	Ingredienti del reagente	Quantità per kit	Simbolo di sicurezza e avvertimento*
Controllo positivo CHIKV/DENV (CHIKV-DENV (+) C)	< 0,001% RNA sintetico (armored) di CHIKV e DENV incapsulato in proteina di rivestimento batteriofaga MS2, plasma umano normale, RNA di CHIKV e RNA di DENV non rilevabili con i metodi PCR. 0,1% Conservante ProClin® 300**	16 ml (16 × 1 ml)	 AVVERTIMENTO 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-3(2H)-isotiazolone [N. CE 220-239-6] (3:1)

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

** Sostanza pericolosa

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

Conservare a 2–8°C

(P/N: 07002220190)

Componenti del kit	Ingredienti del reagente	Quantità per kit	Simbolo di sicurezza e avvertimento*
Controllo negativo di plasma umano normale (NHP-NC)	Plasma umano normale, RNA di CHIKV e RNA di DENV non rilevabili con i metodi PCR. < 0,1% Conservante ProClin® 300**	16 ml (16 × 1 ml)	  AVVERTIMENTO 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

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) tiocianato di guanidinio***, 5% (p/v) polidocanolo***, 2% (p/v) ditiotreitolo, citrato di sodio diidrato	4 × 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 guanidinio 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**® CHIKV/DENV. 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.

*** Sostanza pericolosa

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® CHIKV/DENV - 480	2-8°C
cobas® CHIKV/DENV Control Kit	2-8°C
cobas® NHP Negative Control Kit	2-8°C
cobas omni Lysis Reagent	2-8°C
cobas omni MGP Reagent	2-8°C
cobas omni Specimen Diluent	2-8°C
cobas omni Wash Reagent	15-30°C

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® CHIKV/DENV - 480	Data non superata	60 giorni dal primo utilizzo	Max 20 sedute	Max 20 ore
cobas® CHIKV/DENV Control Kit	Data non superata	Non applicabile	Non applicabile	Max 10 ore
cobas® NHP 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 per l'uso sui **cobas®** 6800/8800 Systems

Materiale	P/N
cobas omni Processing Plate	05534917001
cobas omni Amplification Plate	05534941001
cobas omni Pipette Tips	05534925001
cobas omni Liquid Waste Container	07094388001
cobas omni Lysis Reagent	06997538190
cobas omni MGP Reagent	06997546190
cobas omni Specimen Diluent	06997511190
cobas omni Wash Reagent	06997503190
Sacchetto per rifiuti solidi	07435967001
Contenitore per rifiuti solidi	07094361001

Strumentazione e software necessari

Il software **cobas®** 6800/8800 e il pacchetto di analisi **cobas®** CHIKV/DENV 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
Chiave di protezione software cobas® Synergy	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).^{32,33} Questa procedura deve essere eseguita esclusivamente da personale esperto nella manipolazione di materiale a rischio biologico e nell'uso del test **cobas®** CHIKV/DENV, 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.
- I kit **cobas®** CHIKV/DENV Control Kit e **cobas®** NHP Negative Control Kit contengono plasma derivato da sangue umano. Inoltre i test del plasma umano normale eseguiti con metodi PCR non hanno rilevato la presenza di RNA di CHIKV e RNA di DENV. 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 **cobas omni** Lysis Reagent contiene guanidina tiocianato, una sostanza chimica potenzialmente pericolosa. Evitare che i reagenti entrino in contatto con la pelle, gli occhi o le mucose. In caso di contatto, lavare immediatamente con abbondante acqua per prevenire possibili ustioni.
- I kit **cobas®** CHIKV/DENV, **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 **cobas omni** Lysis Reagent, 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 evitare contaminazioni è necessario sostituire i guanti durante la manipolazione dei campioni e dei reagenti dei kit **cobas®** CHIKV/DENV e **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 (diluire la candeggina domestica 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.

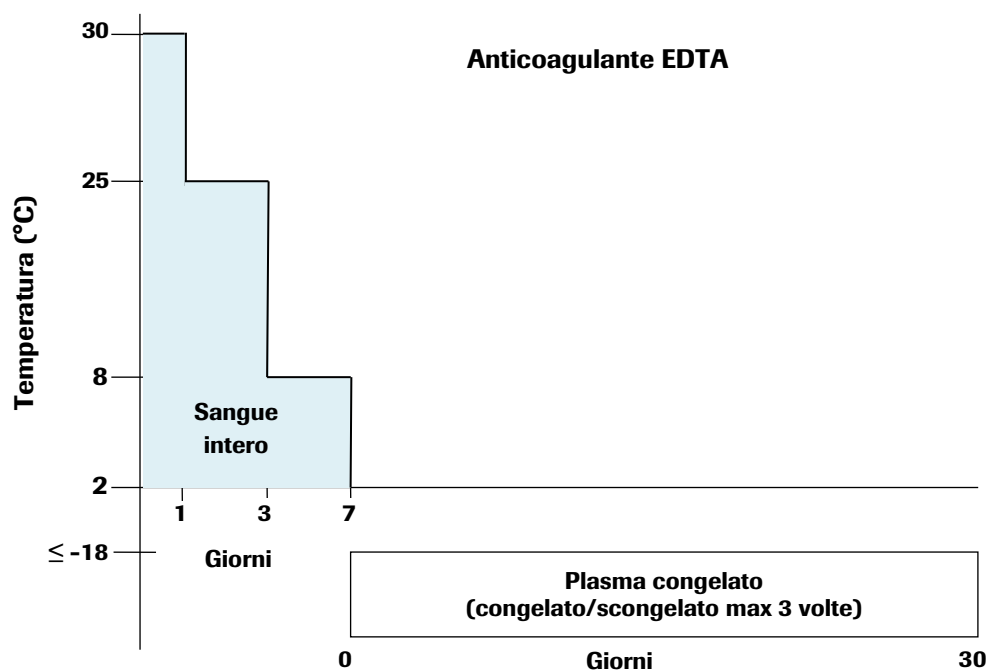
Conservare tutti i campioni dei donatori alle temperature indicate.

La stabilità dei campioni risente delle temperature elevate.

Campioni di donatori viventi

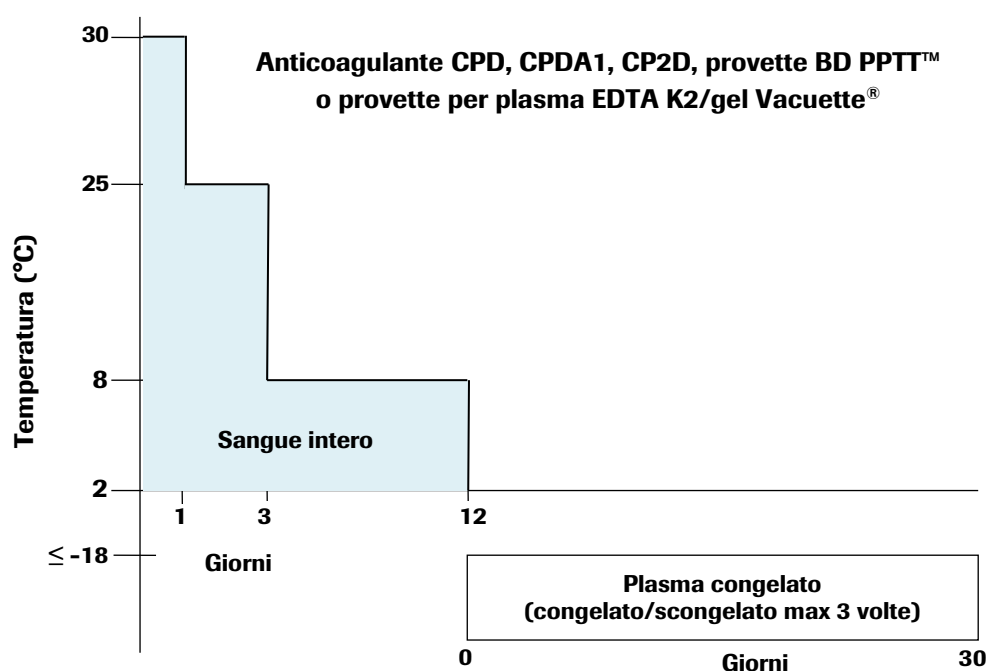
- Con il test **cobas® CHIKV/DENV** è possibile utilizzare plasma raccolto con EDTA, CPD, CPDA1, CP2D. Per la manipolazione e la centrifugazione, attenersi alle istruzioni fornite dal produttore della provetta/sacca di raccolta del campione.
- Il sangue raccolto con EDTA può essere conservato per un massimo di 7 giorni alle condizioni descritte di seguito:
 - I campioni devono essere centrifugati entro e non oltre 72 ore dal prelievo.
 - Oltre gli 8°C, i campioni possono essere conservati per 72 ore a una temperatura massima di 25°C e per 24 ore a 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 30 giorni a $\leq -18^{\circ}\text{C}$ con tre cicli di congelamento/scongelamento. Vedere la Figura 1.

Figura 1 Condizioni per la conservazione dei campioni di donatori viventi con EDTA



- Il sangue raccolto con CPD, CPDA1 o CP2D, nelle provette BD PPT™ (Becton-Dickinson EDTA Plasma Preparation Tubes) o con le provette per plasma EDTA K2/gel Vacuette® 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.
 - Oltre gli 8°C, i campioni possono essere conservati per 72 ore a una temperatura massima di 25°C e per 24 ore a 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 30 giorni a $\leq -18^{\circ}\text{C}$ con tre cicli di congelamento/scongelo. Vedere la Figura 2.

Figura 2 Condizioni per la conservazione dei campioni di donatori viventi raccolti con CPD, CPDA1, CP2D, BD PPT™ e con le provette per plasma EDTA K2/gel Vacuette®



- 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 unico 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**.

Note sulla procedura

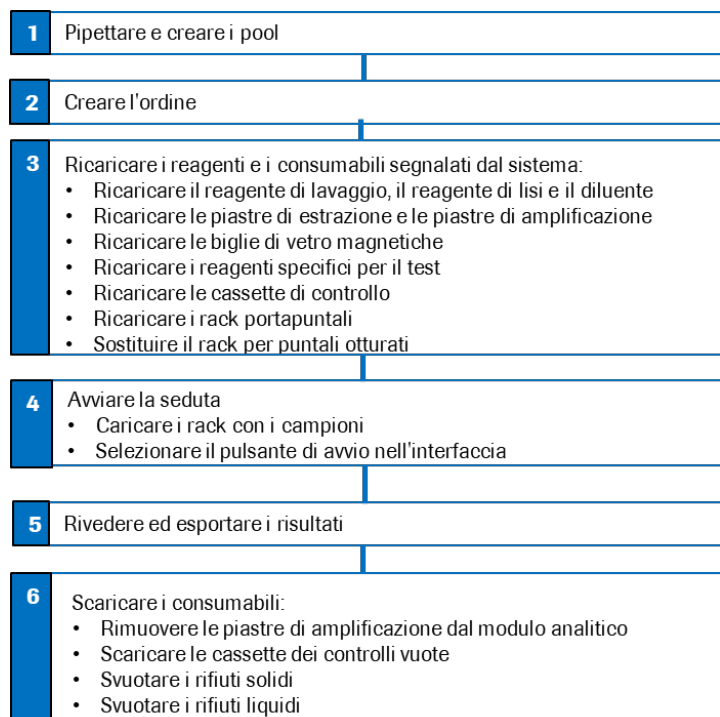
- Non utilizzare i reagenti **cobas® CHIKV/DENV Test**, **cobas® CHIKV/DENV Control Kit**, **cobas® NHP Negative Control Kit** o **cobas omni** oltre la data di scadenza.
- Non riutilizzare i consumabili. Sono esclusivamente monouso.
- Per informazioni sulla corretta manutenzione degli strumenti, consultare il Manuale Operatore dei **cobas® 6800/8800 Systems**.

Esecuzione del test cobas® CHIKV/DENV

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® CHIKV/DENV**



Risultati

I cobas® 6800/8800 Systems rilevano e discriminano automaticamente l'RNA di CHIKV e l'RNA di DENV nei campioni e nei controlli.

Controllo di qualità e validità dei risultati

- In ogni batch sono inclusi un controllo negativo [(-) C] e un controllo positivo [CHIKV-DENV (+) 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 due 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
CHIKV-DENV (+) C	Q02	Invalid	L'intero batch è considerato non valido se il risultato del controllo CHIKV-DENV (+) C non è valido.

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 il controllo positivo e il controllo negativo del batch corrispondente.

Per ogni campione vengono misurati simultaneamente tre parametri: CHIKV, DENV e controllo interno (IC). I risultati finali del test **cobas**® CHIKV/DENV per i campioni sono visualizzati nel software. Oltre ai risultati generali, nel software **cobas**® 6800/8800 vengono visualizzati anche i risultati dei singoli target, da interpretare secondo i seguenti criteri:

Tabella 10 Risultati per i singoli target e relativa interpretazione

Risultati dei target	Interpretazione
CHIKV Non-Reactive	Nessun segnale rilevato per il target CHIKV; rilevato il segnale IC.
CHIKV Reactive	Rilevato il segnale per il target CHIKV; il segnale IC potrebbe essere stato rilevato o non rilevato.
DENV Non-Reactive	Nessun segnale rilevato per il target DENV; rilevato il segnale IC.
DENV Reactive	Rilevato il segnale per il target DENV; il segnale IC potrebbe essere stato rilevato o non rilevato.
Invalid	Segnali del target e IC non rilevati.

Test di ripetizione su singolo campione

Le provette campione con un risultato finale non valido per un target devono essere analizzate di nuovo, anche se hanno generato risultati validi per gli altri target.

Limiti della procedura

- Il test **cobas**® CHIKV/DENV è stato valutato soltanto per l'uso in associazione con **cobas**® CHIKV/DENV Control Kit, **cobas**® NHP Negative Control Kit, **cobas** **omni** MGP Reagent, **cobas** **omni** Lysis Reagent, **cobas** **omni** Specimen Diluent e **cobas** **omni** Wash Reagent per l'uso sui **cobas**® 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.
- L'identificazione dell'RNA di CHIKV e dell'RNA di DENV dipende dal numero di particelle virali presenti nel campione e può essere influenzata dalle modalità di raccolta, conservazione e manipolazione del campione, da fattori legati al paziente (ad esempio, età e presenza o meno di sintomi), oltre che dallo stadio dell'infezione e dalle dimensioni del pool.
- Anche se rare, le mutazioni nelle regioni altamente conservate di un genoma virale coperte dal test **cobas**® CHIKV/DENV possono alterare i legami dei primer e/o delle sonde e 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 allo 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 secondario Roche

Per determinare il limite di sensibilità del test **cobas**® CHIKV/DENV sono stati applicati i seguenti standard:

- Standard secondario Roche per DENV sierotipo 1 (DENV-1)
- Standard secondario Roche per DENV sierotipo 2 (DENV-2)
- Standard secondario Roche per DENV sierotipo 3 (DENV-3)
- Standard secondario Roche per DENV sierotipo 4 (DENV-4)
- Standard secondario Roche per CHIKV genotipo asiatico (CHIKV-Asian)
- Standard secondario Roche per CHIKV genotipo dell'Africa centrale, orientale e meridionale (CHIKV-ECSA)
- Armored RNA per CHIKV genotipo Africa occidentale (CHIKV-WA)

Gli standard secondari Roche per DENV sono sopranatanti da coltura virale inattivati dal calore, i cui titoli sono tracciabili al 1° pannello di riferimento internazionale per il virus Dengue tipo 1-4 (DENV-1 BB, DENV-2 AA, DENV-3 CC e DENV-4 BB) per le tecniche di amplificazione dell'acido nucleico (NAAT).

Non sono attualmente disponibili standard internazionali per CHIKV. Gli standard Roche per CHIKV (CHIKV-Asian, CHIKV-ECSA), i sopranatanti da coltura virale inattivati dal calore e l'Armored RNA (CHIKV-WA) sono tracciabili al reagente di riferimento dell'RNA di CHIKV CBER (CHIKV-RR).³⁴

Per gli standard secondari Roche per DENV-1 e CHIKV-Asian sono state preparate 3 serie di diluizioni indipendenti co-formulate per entrambi gli standard virali, utilizzando plasma EDTA umano normale, negativo ai virus CHIKV e DENV. Ogni serie di diluizioni è stata analizzata con 3 lotti diversi del kit del test **cobas**® CHIKV/DENV, per 63 repliche per lotto, producendo in totale circa 189 repliche per ogni livello di concentrazione.

Per gli standard secondari Roche per DENV-2, DENV-3, DENV-4, CHIKV-ECSA e Armored RNA per CHIKV-WA sono state preparate 3 serie di diluizioni indipendenti co-formulate per ciascuno standard virale per i membri DENV-2 e CHIKV-ECSA e formulate singolarmente per i membri DENV-3, DENV-4 e CHIKV-WA, utilizzando plasma EDTA umano normale, negativo ai virus (CHIKV e DENV). Ogni serie di diluizioni è stata analizzata con 3 lotti diversi del kit del test **cobas**® CHIKV/DENV per 42 repliche per lotto, producendo in totale circa 126 repliche per ogni livello di concentrazione.

Per ogni virus è stata eseguita l'analisi PROBIT dei dati combinati di tutte le serie di diluizioni e i lotti di reagenti, in modo tale da trovare il limite di sensibilità (LoD) stimato, insieme al limite inferiore e superiore dell'intervallo di confidenza al 95% (Tabella 11). Le percentuali di reattività osservate negli studi sul limite di sensibilità per ogni virus sono sintetizzate dalla Tabella 12 alla Tabella 18.

Tabella 11 Risultati dell'analisi PROBIT sui dati LoD 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%
DENV-1	UI/ml	0,6	0,5	0,8
DENV-2	UI/ml	1,0	0,8	1,3
DENV-3	UI/ml	1,0	0,9	1,3
DENV-4	UI/ml	0,4	0,3	0,5
CHIKV Asian	UR*/ml	6,8	5,9	8,1
CHIKV ECSA	UR*/ml	9,3	7,9	11,5
CHIKV WA	UR*/ml	7,1	6,1	8,7

* Unità Rilevabili

Tabella 12 Riepilogo delle percentuali di reattività per DENV-1 in plasma EDTA

Concentrazione dell'RNA di DENV (UI/ml)	N. reattivi	N. ripetizioni valide	% reattivi	Limite inferiore di confidenza al 95% (monolaterale)
1,69	189	189	100,0%	98,4%
0,85	187	189	98,9%	96,7%
0,42	163	189	86,2%	81,4%
0,21	119	189	63,0%	56,7%
0,11	81	189	42,9%	36,7%

Tabella 13 Riepilogo delle percentuali di reattività per DENV-2 in plasma EDTA

Concentrazione dell'RNA di DENV (UI/ml)	N. reattivi	N. ripetizioni valide	% reattivi	Limite inferiore di confidenza al 95% (monolaterale)
3,49	126	126	100,0%	97,7%
1,75	125	126	99,2%	96,3%
0,87	116	126	92,8%	87,8%
0,44	92	126	73,0%	65,7%
0,22	60	126	47,6%	40,0%

Tabella 14 Riepilogo delle percentuali di reattività per DENV-3 in plasma EDTA

Concentrazione dell'RNA di DENV (UI/ml)	N. reattivi	N. ripetizioni valide	% reattivi	Limite inferiore di confidenza al 95% (monolaterale)
1,40	126	126	100,00%	97,7%
0,70	106	126	84,1%	77,8%
0,35	85	124	68,5%	61,0%
0,17	48	125	38,4%	31,1%
0,09	21	125	16,8%	11,5%

Tabella 15 Riepilogo delle percentuali di reattività per DENV-4 in plasma EDTA

Concentrazione dell'RNA di DENV (UI/ml)	N. reattivi	N. ripetizioni valide	% reattivi	Limite inferiore di confidenza al 95% (monolaterale)
2,40	126	126	100,0%	97,7%
1,20	126	126	100,0%	97,7%
0,60	124	126	98,4%	95,1%
0,30	116	126	92,1%	86,9%
0,15	90	126	71,4%	64,1%

Tabella 16 Riepilogo delle percentuali di reattività per CHIKV-Asian in plasma EDTA

Concentrazione dell'RNA di CHIKV (UR/ml)	N. reattivi	N. ripetizioni valide	% reattivi	Limite inferiore di confidenza al 95% (monolaterale)
16,0	189	189	100,0%	98,4%
8,0	188	189	99,5%	97,5%
4,0	150	189	79,4%	73,9%
2,0	94	189	49,7%	43,5%
1,0	50	189	26,5%	21,2%

Tabella 17 Riepilogo delle percentuali di reattività per CHIKV-ECSA in plasma EDTA

Concentrazione dell'RNA di CHIKV (UR/ml)	N. reattivi	N. ripetizioni valide	% reattivi	Limite inferiore di confidenza al 95% (monolaterale)
16,0	126	126	100,0%	97,7%
8,0	119	126	94,4%	89,8%
4,0	80	125	64,0%	56,3%
2,0	45	126	35,7%	28,6%
1,0	16	126	12,7%	8,1%

Tabella 18 Riepilogo delle percentuali di reattività per CHIKV-WA in plasma EDTA

Concentrazione dell'RNA di CHIKV (UR/ml)	N. reattivi	N. ripetizioni valide	% reattivi	Limite inferiore di confidenza al 95% (monolaterale)
16,0	126	126	100,0%	97,7%
8,0	122	126	96,8%	92,9%
4,0	100	126	79,4%	72,5%
2,0	54	126	42,9%	35,4%
1,0	19	126	15,1%	10,1%

Riproducibilità

La riproducibilità del test **cobas**® CHIKV/DENV sui **cobas**® 6800/8800 Systems è stata calcolata utilizzando i seguenti standard:

- Standard secondario Roche per DENV sierotipo 1 (DENV-1)
- Standard secondario Roche per CHIKV genotipo asiatico (CHIKV-Asian)

Lo studio prevedeva l'analisi di 3 pannelli di membri CHIKV e DENV co-formulati in concentrazioni pari a 0,5 x, 1 x e 2 x il limite di sensibilità (LoD) del test **cobas**® CHIKV/DENV per ogni virus. Sono stati eseguiti i test per le seguenti componenti di variabilità:

- variabilità tra giorni (su 3 giorni)
- variabilità tra lotti (con 3 diversi lotti di reagenti del test **cobas**® CHIKV/DENV)
- variabilità tra strumenti (con 3 diversi **cobas**® 8800 Systems)

Con ognuno dei 3 pannelli sono stati effettuati circa 21 test, per un totale di 63 test con ogni lotto di reagenti. Tutti i dati validi sulla riproducibilità sono stati valutati calcolando la percentuale di risultati reattivi ai test per ogni livello di concentrazione e tenendo conto di tutte le componenti variabili.

I limiti degli intervalli di confidenza al 95% bilaterali per ogni percentuale di reattività sono stati calcolati per ognuno dei tre livelli di CHIKV e DENV analizzati nell'arco di 3 giorni, con 3 lotti di reagenti e 3 diversi cobas® 8800 Systems. Il test cobas® CHIKV/DENV è riproducibile su più giorni e con più lotti di reagenti e strumenti. I risultati riguardanti la variabilità tra lotti di reagenti sono sintetizzati nella Tabella 19.

Tabella 19 Riepilogo della riproducibilità tra lotti di reagenti per il test cobas® CHIKV/DENV

Analita	Concentrazione	Lotto di reagenti	% reattivi (test reattivi/validi)	Limite inferiore dell'intervallo di confidenza al 95%	Limite superiore dell'intervallo di confidenza al 95%
DENV-1	2 x LoD	1	100% (63/63)	94,3%	100,0%
		2	100% (63/63)	94,3%	100,0%
		3	100% (63/63)	94,3%	100,0%
	1 x LoD	1	100% (63/63)	94,3%	100,0%
		2	100% (63/63)	94,3%	100,0%
		3	96,8% (61/63)	89,0%	99,6%
	0,5 x LoD	1	92,1% (58/63)	82,4%	97,4%
		2	84,1% (53/63)	72,7%	92,1%
		3	82,5% (52/63)	70,9%	90,9%
CHIKV-Asian	2 x LoD	1	100% (63/63)	94,3%	100,0%
		2	100% (63/63)	94,3%	100,0%
		3	100% (63/63)	94,3%	100,0%
	1 x LoD	1	100% (63/63)	94,3%	100,0%
		2	100% (63/63)	94,3%	100,0%
		3	98,4% (62/63)	91,5%	100,0%
	0,5 x LoD	1	77,8% (49/63)	65,5%	87,3%
		2	87,3% (55/63)	76,5%	94,4%
		3	73,0% (46/63)	60,3%	83,4%

Verifica del genotipo

Per determinare le prestazioni del test **cobas**® CHIKV/DENV con riferimento alla rilevazione dei 4 sierotipi DENV e dei 3 genotipi CHIKV sono stati analizzati complessivamente 43 campioni clinici univoci, 2 isolati da coltura e 1 Armored RNA (aRNA) con sierotipi/genotipi noti. Tutti i 43 campioni clinici sono stati analizzati sia non diluiti, sia diluiti con plasma EDTA umano normale negativo ai virus (CHIKV e DENV), fino a 4 x LoD del test **cobas**® CHIKV/DENV.

Tutti i campioni clinici e gli isolati da coltura sono stati identificati in forma non diluita e a 4 x LoD (Tabella 20).

Tabella 20 Campioni clinici, isolati da coltura e Armored RNA di CHIKV/DENV

Target	Genotipo/ Sierotipo	Campioni	% reattivi (reattivi/campioni analizzati) non diluiti	% reattivi (reattivi/campioni analizzati) diluiti a 4 x LoD
CHIKV	Asiatico	10 campioni clinici	100% (10/10)	100% (10/10)
	ECSA	1 isolato da coltura	100% (1/1)	100% (1/1)
	Africa occidentale	1 aRNA	100% (1/1)	100% (1/1)
DENV	1	10 campioni clinici	100% (10/10)	100% (10/10)
	2	10 campioni clinici	100% (10/10)	100% (10/10)
	3	3 campioni clinici, 1 isolato da coltura	100% (4/4)	100% (4/4)
	4	10 campioni clinici	100% (10/10)	100% (10/10)

Specificità analitica

Per determinare la specificità analitica del test **cobas**® CHIKV/DENV è stata analizzata la reattività crociata con 31 microrganismi presenti a concentrazioni di 10^5 - 10^6 copie, equivalenti genomici, UI o CFU/ml, che includevano 24 isolati virali, sei ceppi batterici e un isolato di lievito (Tabella 21). I microrganismi sono stati utilizzati per arricchire il plasma EDTA umano normale, negativo ai virus (CHIKV e DENV). I campioni sono stati analizzati con e senza CHIKV e DENV (co-formulati) a una concentrazione approssimativa di 3 x LoD del test **cobas**® CHIKV/DENV. I microrganismi analizzati non hanno causato reazioni crociate o interferenze con il test **cobas**® CHIKV/DENV.

Tabella 21 Microrganismi analizzati ai fini della specificità analitica

Virus	Flavivirus	Batteri	Lieviti
Adenovirus tipo 5	Virus dell'encefalite giapponese	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i>
Citomegalovirus	Virus dell'encefalite della Murray Valley	<i>Propionibacterium acnes</i>	
Virus di Epstein Barr	Virus dell'encefalite di St. Louis	<i>Staphylococcus aureus</i>	
Virus dell'epatite A	Virus Usutu	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
Virus dell'epatite B	Virus del Nilo Occidentale	<i>Streptococcus viridans</i>	
Virus dell'epatite C	Virus della febbre gialla	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	
Virus dell'epatite E	Virus Zika		
Virus dell'epatite G			
Virus dell'Herpes simplex tipo 1			
Virus dell'Herpes simplex tipo 2			
Virus dell'immunodeficienza umana (HIV-1, Gruppo M)			
Virus dell'immunodeficienza umana (HIV-2)			
Virus linfotropico delle cellule T umane tipo I			
Virus linfotropico delle cellule T umane tipo II			
Herpesvirus umano 6 A			
Virus dell'influenza A			
Virus varicella-zoster			

Campioni di plasma rappresentativi di vari stati patologici (Tabella 22) sono stati analizzati con e senza i virus CHIKV e DENV (co-formulati) a una concentrazione approssimativa di 3 x LoD del test **cobas**® CHIKV/DENV per ogni virus. Questi stati patologici non hanno causato reazioni crociate o interferenze con il test **cobas**® CHIKV/DENV.

Tabella 22 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 di Epstein Barr	Virus dell'Herpes simplex tipo 1	Parvovirus B19
Virus dell'epatite A	Virus dell'Herpes simplex tipo 2	Virus del Nilo Occidentale
Virus dell'epatite B	Virus dell'immunodeficienza umana (HIV-1), Gruppo M	

Specificità analitica e sostanze interferenti

Sostanze interferenti di tipo endogeno

Campioni di plasma contenenti livelli patologicamente elevati di trigliceridi (fino a 33,0 g/l), emoglobina (fino a 2,0 g/l), bilirubina non coniugata (fino a 0,20 g/l), albumina (fino a 60,0 g/l) e DNA umano (fino a 0,002 g/l) sono stati analizzati con e senza i virus CHIKV e DENV (co-formulati) a una concentrazione pari a circa 3 x LoD del test **cobas®** CHIKV/DENV. I campioni contenenti queste sostanze endogene non hanno interferito con la sensibilità e la specificità del test **cobas®** CHIKV/DENV.

Sostanze interferenti di tipo esogeno

Campioni di plasma EDTA umano normale e negativo ai virus (CHIKV e DENV), contenenti concentrazioni eccezionalmente elevate di farmaci (Tabella 23), sono stati analizzati con e senza CHIKV e DENV (co-formulati) a una concentrazione pari a circa 3 x LoD del test **cobas®** CHIKV/DENV per ogni virus. Queste sostanze esogene non hanno interferito con la sensibilità e la specificità del test **cobas®** CHIKV/DENV.

Tabella 23 Concentrazioni dei farmaci aggiunti al plasma EDTA

Nome del principio attivo	Concentrazione
Acetaminofene (paracetamolo)	1337 µmol/l
Acido acetilsalicilico (aspirina)	3657 µmol/l
Acido ascorbico (vitamina C)	346 µmol/l
Atorvastatina	606 µg Eq/l
Fluoxetina	11,3 µmol/l
Ibuprofene	2450 µmol/l
Loratadina	0,8 µmol/l
Nadololo	3,9 µmol/l
Naprossene	2192 µmol/l
Paroxetina	3,1 µmol/l
Fenilefrina Cloridrato	496 µmol/l
Sertralina	2,0 µmol/l

Correlazione

Valutazione delle prestazioni del test cobas® CHIKV/DENV rispetto ai test RealStar® Chikungunya RT-PCR Kit 2.0 e RealStar® Dengue RT-PCR Kit 2.0

Le prestazioni del test cobas® CHIKV/DENV sono state confrontate con quelle dei test RealStar® Chikungunya RT-PCR Kit 2.0 e RealStar® Dengue RT-PCR Kit 2.0 (Altona Diagnostics) su 100 campioni singoli CHIKV NAT-positivi, 100 campioni singoli DENV NAT-positivi e 100 campioni di plasma negativi ai virus CHIKV e DENV.

I campioni negativi sono stati analizzati non diluiti con i test cobas® CHIKV/DENV, RealStar® Chikungunya RT-PCR Kit 2.0 e RealStar® Dengue RT-PCR Kit 2.0, mentre i campioni positivi sono stati analizzati non diluiti con il test cobas® CHIKV/DENV e con il test equivalente RealStar®.

I campioni sieronegativi hanno generato 100 risultati non reattivi su 100 totali con tutti e tre i metodi, dimostrando una specificità del 100%.

Per quanto riguarda i campioni positivi, il test cobas® CHIKV/DENV è risultato più sensibile ai virus CHIKV e DENV rispetto ai test RealStar® Chikungunya RT-PCR Kit 2.0 e RealStar® Dengue RT-PCR Kit 2.0. I metodi non hanno prodotto risultati concordanti in base al test McNemars (Tabella 24).

Tabella 24 Correlazione dei campioni positivi (non diluiti)

Metodi		Risultati dei singoli target virali	
RealStar® CHIKV RT-PCR Kit 2.0 RealStar® DENV RT-PCR Kit 2.0	cobas® CHIKV/DENV	CHIKV	DENV
Non reattivi	Non reattivi	1	0
Reattivi	Non reattivi	0	0
Non reattivi	Reattivi	14	19
Reattivi	Reattivi	85	81
Totale		100	100
Test di McNemar, valore p (bilaterale, $\alpha = 0,05$)		0,0001	0,0000

Tasso globale d'errore del sistema

Il tasso globale d'errore del sistema per il test cobas® CHIKV/DENV è stato calcolato analizzando 100 repliche di campioni di plasma EDTA arricchiti con CHIKV e DENV (co-formulati). I campioni sono stati analizzati a una concentrazione del target pari a circa 3 x LoD e in pool costituiti da 1 campione (non diluito). Per questo studio sono stati utilizzati il cobas® 6800 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 a ciascun target, pertanto il tasso globale d'errore del sistema è pari allo 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%].

Informazioni supplementari

Caratteristiche del test

Tipo di campione	Plasma
Quantità minima di campione richiesta	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 dei prodotti diagnostici PCR di Roche.

Tabella 25 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 barcode



Fabbricante



Codice del lotto



Conservare al buio



Rischio biologico



Contenuto sufficiente per $\langle n \rangle$ 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



Questo prodotto è conforme ai requisiti della Direttiva Europea 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici *in vitro*.

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.

US Customer Technical Support 1-800-526-1247

Produttore e distributori

Tabella 26 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
Jaguapé, 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

©2018 Roche Molecular Systems, Inc.



Bibliografia

1. Kuno G, Chang GJ, Tsuchiya KR, Karabatsos N, Cropp CB. Phylogeny of the genus *Flavivirus*. J Virol 1998;72:73-83.
2. Stramer SL. Current perspectives on transfusion-transmitted infectious disease: emerging and re-emerging infections. ISBT Sci Ser 2014;9:30-36.
3. Petersen LR, Busch MP. Transfusion-transmitted arboviruses. Vox Sang 2010;98:495-503.
4. Petersen LR, Tomashek KM, Biggerstaff BJ. Estimated prevalence of dengue viremia in Puerto Rican blood donors, 1995 through 2010. Transfusion 2012;52:1647-1651.
5. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, et al. The global distribution and burden of dengue. Nature 2013;496:504-507.
6. Stramer SL, Linnen CM, Carrick JM, et al. Dengue viremia in blood donors identified by RNA and detection of dengue transfusion transmission during the 2007 dengue outbreak in Puerto Rico. Transfusion 2012;52:1657-1666.
7. Gan VC, Leo YS. Current epidemiology and clinical practice in arboviral infections - implications on blood supply in South-East Asia. ISBT Sci Ser 2014 Jul;9:262-267.
8. ProMed. Dengue virus transmission—China (HK), Archive number 20221011.5526. October 10, 2002. <http://www.promedmail.org> (accessed July 14, 2017).
9. AABB. Dengue viruses. www.aabb.org/tm/eid/Documents/dengue-viruses.pdf (updated February 2014; accessed July 14, 2017).
10. Tambyah PA, Koay ESC, Poon ML, Lin RV, Ong BK; Transfusion-Transmitted Dengue Infection Study Group. Dengue hemorrhagic fever transmitted by blood transfusion. N Engl J Med 2008;359:1526-1527.
11. Sabino EC, Loureiro P, Lopes ME, et al. Transfusion-transmitted dengue and associated clinical symptoms during the 2012 epidemic in Brazil. J Infect Dis 2016;213:694-702.
12. Levi JE. Dengue virus and blood transfusion. J Infect Dis 2016;213:689-690.
13. Stramer SL, Hollinger FB, Katz LM, et al. Emerging infectious disease agents and their potential threat to transfusion safety. Transfusion 2009;49:1S-29S.
14. Burt FJ, Chen W, Miner JJ, et al. Chikungunya virus: an update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen. Lancet Infect Dis 2017;17:e107-e117.
15. World Health Organization (WHO). Chikungunya fact sheet. www.who.int/mediacentre/factsheets/fs327/en/ (updated April 2017; accessed July 14, 2017).
16. Brouard C, Bernillon P, Quatresous I, et al. Estimated risk of Chikungunya viremic blood donation during an epidemic on Reunion Island in the Indian Ocean, 2005 to 2007. Transfusion 2008;48:1333-1341.
17. Schuffenecker I, Iteman I, Michault A, et al. Genome microevolution of chikungunya virus causing Indian Ocean outbreak. PloS Med 2006;3:e263.
18. Liunbruno GM, Calteri D, Petropulacos K, et al. The chikungunya epidemic in Italy and its repercussions on the blood system. Blood Transfus 2008;6:199-210.
19. Zeller H, Bortel Van W, Sudre B. Chikungunya: its history in Africa and Asia and its spread to new regions in 2013-2014. J Infect Dis 2016;214(suppl 5):S436-S440.

20. Roiz D, Boussès P, Simard F, Paupy C, Fontenille D. Autochthonous chikungunya transmission and extreme climate events in Southern France. *PLoS Negl Trop Dis* 2015;9:e0003854.
21. Johansson MA, Powers AM, Pesik N, Cohen NJ, Staples JE. Nowcasting the spread of chikungunya virus in the Americas. *PLoS One* 2014;9:e104915.
22. Pan American Health Organization (PAHO). Number of reported cases of chikungunya fever in the America, by country or territory, 2017 (as of June 2, 2017). www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=rdmore&cid=8975&itemid=40931&lang=en (accessed June 5, 2017).
23. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Chikungunya virus in the United States, 2014 final data for the United States. <http://www.cdc.gov/chikungunya/geo/united-states-2014.html> (last updated October 30, 2015; last accessed July 20, 2017)
24. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Chikungunya virus in the United States, 2015 final data for the United States. <http://www.cdc.gov/chikungunya/geo/united-states-2015.html> (last updated June 23, 2016; last accessed July 20, 2017)
25. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Chikungunya virus, 2016 provisional data for the United States. www.cdc.gov/chikungunya/geo/united-states-2016.html (last updated January 18, 2017; accessed June 5, 2017)
26. Rocha V. Virus-transmitting yellow fever mosquitoes discovered in L.A. County. *Los Angeles Times*, October 15, 2014. <http://www.latimes.com/local/lanow/la-me-ln-yellow-fever-mosquito-los-angeles-20141015-story.html>.
27. 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.
28. 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.
29. 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.
30. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (NY)* 1992;10:413-417.
31. Heid CA, Stevens J, Livak JK, Williams PM. Real-time quantitative PCR. *Genome Res* 1996;9:86-994.
32. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th ed. US 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.
33. 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.
34. Añez G, Jiang Z, Heisey DA, Kerby S, Rios M, Chikungunya virus Collaborative Study Group. Collaborative study for the characterization of a chikungunya virus RNA reference reagent for use in nucleic acid testing. *Vox Sang* 2015;109: 312-318.

Revisione del documento

Revisione del documento	
Doc Rev. 2.0 10/2018	Aggiornamento della descrizione dei test di screening usati per lo screening NHP nella Tabella 2, Tabella 3 e nella sezione Avvertimenti e precauzioni. Aggiornamento degli avvertimenti sui pericoli. Aggiornamento delle descrizioni e aggiunta del simbolo Rx Only e della relativa descrizione nella pagina dei simboli armonizzati. Per ulteriori domande e chiarimenti, è possibile rivolgersi al rappresentante Roche locale.