

cobas[®] HIV-1/HIV-2 Qualitative

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

Per uso diagnostico in vitro

cobas[®] HIV-1/HIV-2 Qualitative	P/N: 07862113190
cobas[®] HIV-1/HIV-2 Qualitative Control Kit	P/N: 07862091190
cobas[®] NHP Negative Control Kit	P/N: 07002220190
cobas[®] Specimen Pre-Extraction Reagent	P/N: 08064695190

Indice generale

Uso previsto	4
Riassunto e spiegazione del test	4
Reagenti e materiali	7
Reagenti e controlli del test cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative.....	7
Reagenti cobas omni per la preparazione dei campioni.....	9
cobas® Specimen Pre-Extraction Reagent	10
Requisiti per la conservazione e la manipolazione dei reagenti.....	11
Materiali aggiuntivi necessari	13
Strumentazione e software necessari	14
Precauzioni e requisiti per l'uso.....	14
Avvertimenti e precauzioni.....	14
Manipolazione dei reagenti.....	15
Buone pratiche di laboratorio.....	16
Prelievo, trasporto e conservazione dei campioni	16
Campioni.....	16
Campioni di plasma EDTA e siero.....	16
Campioni DBS	17
Istruzioni per l'uso.....	18
Note sulla procedura.....	18
Preparazione dei campioni DBS.....	18
Esecuzione del test cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative	19
Risultati	20
Controllo di qualità e validità dei risultati	20
Interpretazione dei risultati	21
Limiti della procedura	22

Valutazione delle prestazioni non cliniche..... 23

Caratteristiche delle prestazioni	23
Limite di sensibilità (LoD).....	23
Precisione intra-laboratorio	27
Verifica del gruppo/sottotipo e inclusività.....	29
Specificità.....	32
Pannelli di sieroconversione	32
Specificità analitica	34
Specificità analitica e sostanze interferenti.....	35
Correlazione	36
Tasso globale d'errore del sistema	37
Contaminazione crociata.....	38

Informazioni supplementari..... 38

Caratteristiche del test	38
Simboli.....	39
Produttore e distributori	41
Marchi e brevetti.....	41
Copyright.....	41
Bibliografia	42
Revisione del documento	43

Uso previsto

Il test degli acidi nucleici **cobas**® HIV-1/HIV-2 Qualitative per l'uso sui **cobas**® 6800/8800 Systems è un test *in vitro* di amplificazione degli acidi nucleici, impiegato per la rilevazione qualitativa e la differenziazione del virus dell'immunodeficienza umana (HIV) di tipo 1 (HIV-1) e tipo 2 (HIV-2) in campioni di siero, plasma o gocce di sangue secco (DBS) umani.

Il test è destinato all'uso come ausilio nella diagnosi dell'infezione da HIV-1/HIV-2. L'identificazione degli acidi nucleici dell'HIV-1 o dell'HIV-2 rivela la presenza di un'infezione causata rispettivamente dall'HIV-1 o dall'HIV-2. La presenza degli acidi nucleici dell'HIV-1 o dell'HIV-2 nel plasma o nel siero di soggetti privi di anticorpi anti-HIV-1 o anti-HIV-2 rivela un'infezione acuta o primaria. Nei neonati di madri infette dall'HIV, che ereditano gli anticorpi materni anti-HIV-1 o anti-HIV-2, la presenza degli acidi nucleici dell'HIV rivela un'infezione attiva. Il test **cobas**® HIV-1/HIV-2 Qualitative può essere utilizzato anche per confermare un'infezione da HIV-1 o HIV-2 in un soggetto i cui campioni siano risultati reattivi per gli antigeni o gli anticorpi anti-HIV-1 o anti-HIV-2.

Riassunto e spiegazione del test

Premessa

Il virus dell'immunodeficienza umana (HIV) è l'agente eziologico della sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS).¹ L'HIV-1 è la causa prevalente dell'AIDS, con oltre 35 milioni di persone infette nel mondo.² Dopo aver contratto l'infezione, i soggetti infetti entrano generalmente in una fase clinicamente stabile e relativamente asintomatica che può protrarsi per anni. Senza una terapia antiretrovirale, di solito l'infezione evolve progressivamente in AIDS, una condizione caratterizzata da depauperamento dei linfociti CD4+ nel sistema immunitario, suscettibilità alle infezioni opportunistiche e, in ultimo, morte.³ Anche l'HIV-2, la cui presenza è riscontrata principalmente in Africa occidentale, può causare l'AIDS. Si stima che nel mondo vi siano tra 1 e 2 milioni di persone infette dall'HIV-2.

La distinzione tra HIV-1 e HIV-2 è importante per molteplici ragioni: (1) l'HIV-2 sembra essere meno virulento dell'HIV-1, con cariche virali più basse, perdita più lenta dei linfociti CD4+ e progressione più lenta in infezioni opportunistiche; (2) le cariche virali dell'HIV-2 potrebbero essere quantificate in modo inesatto dai test specifici per l'HIV-1; e (3) alcuni farmaci per l'HIV-1, in particolare gli inibitori non nucleosidici della trascrittasi inversa, sono inefficaci contro l'HIV-2.⁴ È inoltre possibile contrarre un'infezione concomitante da HIV-1 e HIV-2. Questa co-infezione non ha effetti evidenti sulla velocità di progressione in AIDS, tuttavia complica il monitoraggio della carica virale e la terapia antiretrovirale.⁴ Alla luce dell'importanza di distinguere tra infezione da HIV-1 e infezione da HIV-2, nelle linee guida nazionali e internazionali sono previste la diagnosi e la differenziazione tra HIV-1 e HIV-2 come requisito per la diagnosi di infezione da HIV.^{5,6}

Perché utilizzare i test PCR

Storicamente i test dell'HIV si basavano sulla risposta anticorpale dei pazienti quando entrano in contatto con il virus. Sebbene questi anticorpi siano inefficaci nella lotta contro il virus, essi sono presenti in quasi tutti i pazienti cronicamente infetti. Il più grande limite dei test degli anticorpi è il “periodo finestra” nella fase di infezione acuta, che dura svariate settimane prima della comparsa di una risposta anticorpale rilevabile. È stato possibile abbreviare questo periodo finestra grazie ai test di dosaggio immunologico dell'HIV di “IV generazione”, che sono in grado di rilevare anche l'antigene p24 oltre agli anticorpi anti-HIV.⁷ Tuttavia i test di amplificazione degli acidi nucleici hanno la potenzialità di abbreviare ulteriormente il periodo finestra dei test di immunodosaggio di IV generazione, perché la sensibilità delle metodiche PCR è maggiore rispetto alle metodiche basate sulle proteine.⁷

A seconda del rischio di infezione da HIV esistente tra la popolazione esaminata, abbreviare il periodo finestra dei test degli acidi nucleici potrebbe essere importante sia per il paziente che per la comunità.⁸ Dal punto di vista del paziente, ricevere una diagnosi di infezione da HIV nella fase di infezione acuta significa poter iniziare subito una terapia e potenzialmente ritardare la progressione della malattia, prevenendo danni al sistema immunitario e preservando le risposte immunitarie cellulari anti-HIV. Un inizio tempestivo della cura può inoltre limitare le dimensioni e la diversità genetica del serbatoio virale che si costituisce, facilitando l'individuazione di una terapia efficace nei pazienti trattati nella fase di infezione acuta. Dal punto di vista della comunità, i pazienti con infezione acuta svolgono un ruolo importante nella trasmissione dell'HIV, in quanto questi soggetti hanno generalmente cariche virali molto elevate e non sono consapevoli di essere infetti. Identificare e curare questi pazienti è importante per poter contrastare la diffusione dell'epidemia da HIV.^{9,10} La PCR è già lo standard di cura nella diagnosi dell'HIV nei neonati e l'elevata sensibilità e specificità della PCR permetterebbe non solo di applicare questa metodica all'identificazione dell'infezione acuta in soggetti di tutte le età, ma anche di confermare un'eventuale diagnosi di HIV in soggetti con risultati di sieropositività o di incertezza in base ai test sierologici.^{11,12}

Spiegazione del test

cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative è un test qualitativo da eseguire sul **cobas® 6800 System** e sul **cobas® 8800 System**. Il test **cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative** permette di rilevare e discriminare simultaneamente gli acidi nucleici dell'HIV-1 e dell'HIV-2 nei campioni di plasma EDTA, siero e DBS ottenuti da pazienti infetti. Vengono utilizzate due sonde che rilevano l'HIV-1, ma non discriminano tra i sottotipi del gruppo M dell'HIV-1 e tra il gruppo O e il gruppo N dell'HIV-1. Una terza sonda rileva l'HIV-2, ma non discrimina tra il gruppo A e il gruppo B dell'HIV-2.

Principi della procedura

Il test **cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative** si basa su una procedura completamente automatizzata per la preparazione dei campioni (estrazione e purificazione degli acidi nucleici) e la successiva amplificazione e rilevazione mediante PCR. I **cobas® 6800/8800 Systems** sono costituiti dal modulo di inserimento dei campioni, dal modulo di trasferimento, dal modulo di preparazione e dal modulo analitico. La gestione automatizzata dei dati è affidata al software **cobas® 6800/8800**, che classifica i risultati di tutti i test come non reattivi, reattivi o non validi. I risultati possono essere visualizzati direttamente sullo schermo del sistema, esportati o stampati in un report.

L'acido nucleico viene estratto simultaneamente dai campioni dei pazienti e dalle molecole di Armored RNA del controllo interno (IC) aggiunto (che controlla il processo di preparazione e amplificazione/rilevazione del campione). Inoltre il test utilizza tre controlli esterni: due positivi e uno negativo. In sintesi, l'acido nucleico virale viene liberato aggiungendo nel campione la proteinasi e il reagente di lisi. L'acido nucleico liberato si lega quindi alla superficie di silice delle biglie di vetro magnetiche aggiunte. Le sostanze che non formano legami e le impurità (ad esempio le proteine denaturate, i detriti cellulari e i potenziali inibitori della PCR) vengono rimosse con il reagente di lavaggio nei passaggi successivi e l'acido nucleico purificato viene eluito dalle biglie di vetro magnetiche con il tampone di eluizione a temperature elevate.

L'amplificazione selettiva dell'acido nucleico target estratto dal campione è ottenuta utilizzando dei primer forward e reverse virus-specifici, che vengono selezionati da regioni altamente conservate dei genomi dell'HIV-1 e dell'HIV-2. Il gene gag dell'HIV-1, la regione LTR dell'HIV-1 (doppio target per HIV-1) e la regione LTR dell'HIV-2 vengono amplificati dal test **cobas**® HIV-1/HIV-2. L'amplificazione selettiva del controllo interno (IC) è ottenuta utilizzando dei primer forward e reverse sequenza-specifici, che vengono selezionati in modo tale da non presentare nessuna omologia con i genomi dell'HIV-1 e dell'HIV-2. Un enzima DNA polimerasi termostabile viene utilizzato sia per la trascrizione inversa che per l'amplificazione PCR. Le sequenze del target e del controllo interno (IC) vengono amplificate simultaneamente mediante un profilo di amplificazione PCR universale, che prevede valori predefiniti per la temperatura e per il numero di cicli. La soluzione Master Mix contiene trifosfato di deossiuridina (dUTP) anziché trifosfato di deossitimidina (dTTP), che è incorporato nel DNA appena sintetizzato (amplicone).¹³⁻¹⁵ Tutti gli ampliconi contaminanti che sono stati prodotti nelle sessioni di PCR precedenti vengono eliminati dall'enzima AmpErase [uracil-N-glicosilasi], contenuto nella Master Mix per PCR, durante il primo passaggio del ciclo termico. Gli ampliconi che si sono appena formati non vengono invece eliminati perché l'enzima AmpErase si inattiva dopo l'esposizione a temperature superiori a 55°C.

La soluzione Master Mix del test **cobas**® HIV-1/HIV-2 Qualitative contiene due sonde di rilevazione specifiche per le sequenze target dell'HIV-1, una specifica per le sequenze target dell'HIV-2 e una specifica per l'IC. Le sonde sono marcate con fluorocromi reporter specifici per i target, in modo da consentire la rilevazione simultanea dei target HIV-1, HIV-2 e IC in tre diversi canali.^{16,17} Quando il segnale fluorescente delle sonde intatte non è legato alla sequenza target, viene 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 esonucleasica 5'→3' della DNA polimerasi, con la conseguente separazione dei fluorocromi reporter e quencher e la produzione di un segnale fluorescente. Ad ogni ciclo di PCR vengono generate quantità crescenti di sonde scisse e, in concomitanza, il segnale cumulativo del fluorocromo reporter aumenta. La rilevazione real-time e la discriminazione dei prodotti della PCR sono ottenute misurando la fluorescenza dei fluorocromi reporter liberati, che rappresentano rispettivamente i target virali e l'IC.

Reagenti e materiali

Reagenti e controlli del test cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative

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

Tabella 1 cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative

cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative		
Conservare a 2-8°C		
Cassetta per 96 test (P/N 07862113190)		
Componenti del kit	Ingredienti del reagente	Quantità per kit 96 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.	13 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	13 ml
Tampone di eluizione (EB)	Tampone Tris, 0,2% metil-4 idrossibenzoato	13 ml
Master Mix Reagente 1 (MMX-R1)	Acetato di manganese, idrossido di potassio, < 0,1% sodio azide	5,5 ml
Master Mix HIV-1/HIV-2 Reagente 2 (HIV-1/HIV-2 MMX-R2)	Tampone tricina, acetato di potassio, 18% dimetil sulfoxide, glicerolo, Tween 20, EDTA, < 0,06% dATP, dCTP, dGTP, < 0,14% dUTP, < 0,01% primer upstream e downstream per HIV-1, HIV-2 e controllo interno, < 0,01% sonde HIV-1 e HIV-2 marcate con fluorocromi, < 0,01% sonda IC marcata con fluorocromo, < 0,01% aptamero oligonucleotidico, < 0,01% DNA polimerasi Z05D, < 0,01% enzima AmpErase (uracil-N-glicosilasi) (microbico), < 0,1% sodio azide	6 ml

Tabella 2 cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative Control Kit

cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative Control Kit

Conservare a 2-8°C

(P/N 07862091190)

Componenti del kit	Ingredienti dei reagenti	Quantità per kit	Simbolo di sicurezza e avvertimento*
Controllo positivo HIV-1M/HIV-2 (HIV-1M/HIV-2 (+)C)	< 0,001% RNA sintetico (armored) di HIV-1 gruppo M incapsulato in proteina di rivestimento batteriofagica MS2, < 0,001% RNA sintetico (armored) di HIV-2 incapsulato in proteina di rivestimento batteriofagica MS2, plasma umano normale, non reattivo ai test brevettati per gli anticorpi anti-HIV-1/2; RNA di HIV-1 e RNA di HIV-2 non rilevabili con le metodiche PCR 0,1% conservante ProClin® 300**	5,2 ml (8 × 0,65 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 Massa di reazione di: 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-one [N. CE 247-500-7] e 2-metil-2H-isotiazol-3-one [N. CE 220-239-6] (3:1).
Controllo positivo HIV-1O (HIV-1O (+)C)	< 0,001% RNA sintetico (armored) di HIV-1 gruppo O incapsulato in proteina di rivestimento batteriofagica MS2, plasma umano normale, non reattivo ai test brevettati per gli anticorpi anti-HIV-1/2; RNA di HIV-1 e RNA di HIV-2 non rilevabili con le metodiche PCR 0,1% conservante ProClin® 300**	5,2 ml (8 × 0,65 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 Massa di reazione di: 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-one [N. CE 247-500-7] e 2-metil-2H-isotiazol-3-one [N. CE 220-239-6] (3:1).

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

** Sostanza pericolosa.

Tabella 3 cobas® NHP Negative Control Kit

cobas® NHP Negative Control Kit

Conservare a 2-8°C

(P/N 07002220190)

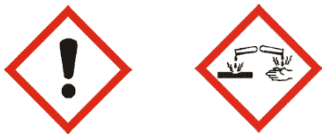
Componenti del kit	Ingredienti dei reagenti	Quantità per kit	Simbolo di sicurezza e avvertimento*
Controllo negativo di plasma umano normale (NHP-NC)	Plasma umano normale, non reattivo ai test brevettati per gli anticorpi anti-HIV-1/2; RNA di HIV-1 e RNA di HIV-2 non rilevabili con i metodi PCR < 0,1% 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 dei reagenti	Quantità per kit	Simbolo di sicurezza e avvertimento**
cobas omni MGP Reagent (MGP) Conservare a 2-8°C (P/N 06997546190)	Biglie di vetro magnetiche, tampone Tris, 0,1% metil-4 idrossibenzoato, < 0,1% sodio azide	480 test	Non applicabile
cobas omni Specimen Diluent (SPEC DIL) Conservare a 2-8°C (P/N 06997511190)	Tampone Tris, 0,1% metil-4 idrossibenzoato, < 0,1% sodio azide	4 × 875 ml	Non applicabile
cobas omni Lysis Reagent (LYS) Conservare a 2-8°C (P/N 06997538190)	43% (p/p) 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. H314: Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari. H412: Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata. EUH032: A contatto con acidi libera gas molto tossici. P261: Evitare di respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/ gli aerosol. P273: Non disperdere nell'ambiente. P280: Indossare guanti/indumenti protettivi/proteggere gli occhi/ il viso. P303 + P361 + P353: IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE (o con i capelli): togliere immediatamente tutti gli indumenti contaminati. Sciacquare la pelle. P304 + P340 + P310: IN CASO DI INALAZIONE: trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione. Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI/un medico. P305 + P351 + P338 + P310: IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI/un medico. 593-84-0 Tiocianato di guanidinio 9002-92-0 Polidocanolo 3483-12-3 (R*,R*)-1,4-dimercapto-2,3-butandiolo
cobas omni Wash Reagent (WASH) Conservare a 15-30°C (P/N 06997503190)	Citrato di sodio diidrato, 0,1% metil-4 idrossibenzoato	4,2 l	Non applicabile

* Questi reagenti non sono inclusi nel kit del test **cobas**® HIV-1/HIV-2 Qualitative. Consultare l'elenco dei materiali aggiuntivi necessari (Tabella 10 e Tabella 11).

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

*** Sostanza pericolosa.

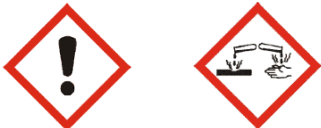
cobas® Specimen Pre-Extraction Reagent

Tabella 5 cobas® Specimen Pre-Extraction Reagent*

cobas® Specimen Pre-Extraction Reagent

Conservare a 2-8°C

(P/N 08064695190)

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

* Questo reagente non è incluso nel kit del test **cobas®** HIV-1/HIV-2 Qualitative. Consultare l'elenco dei materiali aggiuntivi necessari (Tabella 10 e Tabella 11).

** 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 6 alla Tabella 7. Il reagente **cobas® Specimen Pre-Extraction Reagent (SPER)**, utilizzato con il flusso di lavoro DBS, deve essere conservato e manipolato in base alle istruzioni fornite nella Tabella 8 e nella Tabella 9.

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

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

Reagente	Temperatura di conservazione
cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative	2-8°C
cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative 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 loro data di scadenza viene monitorata dal sistema. I **cobas® 6800/8800 Systems** consentono l'uso dei reagenti solo se sono rispettate tutte le condizioni descritte nella Tabella 7. Il sistema impedisce automaticamente l'uso dei reagenti scaduti. La Tabella 7 fornisce all'utente informazioni utili sulle condizioni di manipolazione dei reagenti previste per i **cobas® 6800/8800 Systems**.

Tabella 7 Scadenza dei reagenti sui **cobas® 6800/8800 Systems**

Reagente	Data di scadenza del kit	Stabilità del kit aperto	Numero di sedute per cui il kit può essere usato	Stabilità a bordo (tempo cumulativo a bordo fuori dal frigorifero)
cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative	Data non superata	30 giorni dal primo utilizzo	Max 10 sedute	Max 8 ore
cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative Control Kit	Data non superata	Non applicabile	Non applicabile	Max 8 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**.

Conservare il reagente **cobas®** Specimen Pre-Extraction Reagent (utilizzato nel flusso di lavoro DBS) alla temperatura specificata nella Tabella 8.

Tabella 8 Conservazione del **cobas®** Specimen Pre-Extraction Reagent

Reagente	Temperatura di conservazione
cobas® Specimen Pre-Extraction Reagent	2-8°C

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

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

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

Materiali aggiuntivi necessari

Tabella 10 Materiali e consumabili da utilizzare sui **cobas®** 6800/8800 Systems

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

Tabella 11 Altri materiali e consumabili necessari soltanto per la metodica DBS

Materiali
Carta filtro Whatman 903®, carta di raccolta campioni Munktell TFN o equivalente (diametro spot 12-13 mm)
Provette da 5 ml, filettatura interna, diametro 12,5 mm, polipropilene (Cryo.s™) con tappi
Eppendorf Thermomixer (ad esempio, modello R 5355 o equivalente) con termoblocco da 24 provette per criogenia
Pinze o pinzette sterili o monouso
Buste richiudibili e sacchetti disidratanti (per la conservazione dei campioni DBS)

Strumentazione e software necessari

Sugli strumenti è necessario installare il software **cobas®** 6800/8800 e i pacchetti di analisi **cobas®** HIV-1/HIV-2 Qualitative, **cobas®** HIV-1/2 Qual-Serum/Plasma ASAP e/o **cobas®** HIV-1/2 Qual-DBS ASAP. Il server IG (Instrument Gateway) verrà fornito con il sistema.

Tabella 12 Strumentazione

Apparecchiatura	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

Per ulteriori informazioni sui tubi primari e secondari compatibili con gli strumenti, consultare il Manuale Operatore dei **cobas®** 6800/8800 Systems.

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

Precauzioni e requisiti per l'uso

Avvertimenti e precauzioni

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

- Solo per uso diagnostico *in vitro*.
- Il test **cobas®** HIV-1/HIV-2 Qualitative non è stato valutato per l'uso come test di screening per la presenza dell'HIV-1/HIV-2 nel sangue o negli emoderivati.
- Tutti i campioni dei pazienti devono essere manipolati come materiale a rischio biologico, seguendo le buone procedure di laboratorio descritte nel documento Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories e nel documento M29-A4 del CLSI.^{18,19} Questa procedura deve essere eseguita esclusivamente da personale esperto nella manipolazione di materiale a rischio biologico e nell'uso del test **cobas®** HIV-1/HIV-2 Qualitative e dei **cobas®** 6800/8800 Systems.
- Tutti i materiali di origine umana devono essere considerati a rischio biologico e quindi manipolati adottando precauzioni universalmente valide. In caso di fuoriuscita accidentale, disinfettare immediatamente seguendo le procedure previste dall'organizzazione.
 - In caso di fuoriuscita dei campioni DBS in **cobas®** Specimen Pre-Extraction Reagent (che contiene guanidina tiocianato), impedire che il liquido entri in contatto con disinfettanti contenenti ipoclorito di sodio, come la candeggina. L'eventuale miscela potrebbe produrre gas altamente tossici.

- **cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative Control Kit** e **cobas® NHP Negative Control Kit** contengono plasma derivato da sangue umano. Il materiale di provenienza è stato analizzato con test degli anticorpi brevettati ed è risultato non reattivo agli anticorpi anti-HIV-1/2. I test basati sui metodi PCR eseguiti sul plasma umano normale hanno inoltre confermato l'assenza di RNA dei virus HIV-1 (gruppi M e O) e HIV-2. 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 o i campioni conservati in tubi primari.**
- **cobas® Specimen Pre-Extraction Reagent** è fotosensibile e viene spedito in flaconi protetti dalla luce.
- Per garantire prestazioni ottimali del test, utilizzare soltanto i consumabili forniti o consigliati.
- Le schede di sicurezza (Safety Data Sheets, SDS) possono essere richieste al rappresentante Roche locale.
- Per un corretto svolgimento del test, attenersi scrupolosamente alle procedure e alle linee guida approvate. Qualunque deviazione dalle procedure e dalle linee guida approvate potrebbe compromettere le prestazioni del test.
- Potrebbero essere generati risultati falsi positivi senza un'adeguata prevenzione dell'effetto carryover durante la manipolazione e la preparazione dei campioni.

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 le cassette dei reagenti, il diluente, il reagente di lisi, il reagente di lavaggio e **cobas® Specimen Pre-Extraction Reagent** (reagente utilizzato soltanto con la metodica DBS per la pre-estrazione dei campioni) per confermare l'assenza di perdite. In caso di perdite accertate, non utilizzare il materiale per il test.
- **cobas omni** Lysis Reagent e **cobas® Specimen Pre-Extraction Reagent** contengono 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.
- **cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative Kit**, **cobas omni** MGP Reagent e **cobas omni** Specimen Diluent contengono sodio azide come conservante. Evitare che i reagenti entrino in contatto con la pelle, gli occhi o le mucose. In caso di contatto, lavare immediatamente con abbondante acqua per prevenire possibili ustioni. In caso di fuoriuscita dei reagenti, diluire il liquido con acqua prima di asciugare.
- Evitare che **cobas omni** Lysis Reagent o **cobas® Specimen Pre-Extraction Reagent**, che contengono guanidina tiocianato, entrino in contatto con la soluzione di ipoclorito di sodio (candeggina). L'eventuale miscela potrebbe produrre gas altamente tossici.
- Smaltire tutti i materiali entrati in contatto con i campioni e i reagenti nel rispetto dei regolamenti previsti a livello locale, nazionale e internazionale.

Buone pratiche di laboratorio

- Non pipettare con la bocca.
- Non mangiare, bere o fumare nelle aree di lavoro designate.
- Indossare guanti, camici da laboratorio e protezioni per gli occhi durante la manipolazione dei campioni e dei reagenti del kit. Per evitare contaminazioni, è necessario sostituire i guanti durante la manipolazione dei kit **cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative** e dei reagenti **cobas omni**. Evitare di contaminare i guanti durante la manipolazione dei campioni e dei controlli.
- Lavare accuratamente le mani dopo avere manipolato i reagenti dei kit e dopo aver rimosso i guanti.
- Pulire e disinfettare accuratamente tutte le superfici di lavoro del laboratorio con una soluzione fresca a base di ipoclorito di sodio allo 0,5% in acqua deionizzata o distillata (diluire la candeggina domestica 1:10). Successivamente pulire la superficie con etanolo al 70%.
- In caso di fuoriuscita di liquidi sul **cobas® 6800/8800 instrument**, seguire le istruzioni contenute nel Manuale Operatore dei **cobas® 6800/8800 Systems** per pulire accuratamente e decontaminare la superficie dello strumento.

Prelievo, trasporto e conservazione dei campioni

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

Conservare tutti i campioni alle temperature indicate.

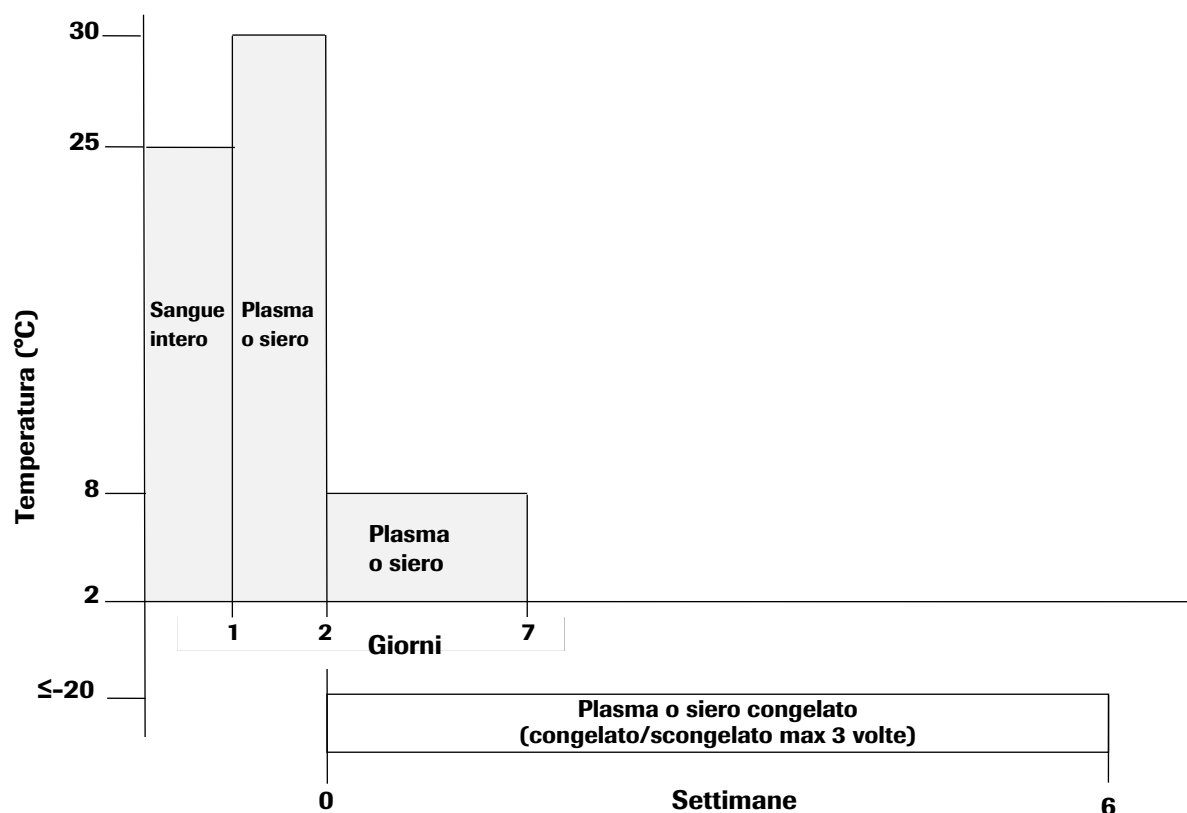
La stabilità dei campioni risente delle temperature elevate.

Se si utilizzano campioni congelati in tubi secondari, mantenere i campioni a temperatura ambiente (15-30°C) finché non si saranno scongelati completamente, quindi miscelare brevemente (ad esempio, in vortex per 3-5 secondi) e centrifugare in modo da raccogliere tutto il volume del campione sul fondo della provetta.

Campioni

Campioni di plasma EDTA e siero

- Raccogliere il sangue intero nelle provette SST™ per la separazione del siero, o nelle provette BD Vacutainer® PPT™ per la preparazione del plasma per i metodi di analisi di diagnostica molecolare, o in provette sterili con EDTA come anticoagulante. Attenersi alle istruzioni fornite dal produttore delle provette.
- Il sangue intero raccolto nelle provette SST™ destinate alla separazione del siero, nelle provette BD Vacutainer® PPT™ destinate alla preparazione del plasma per le metodiche di analisi di diagnostica molecolare o nelle provette sterili con anticoagulante EDTA può essere conservato e/o trasportato per un massimo di 24 ore a una temperatura compresa tra 2°C e 25°C, prima della preparazione del plasma o del siero. Per la centrifugazione, seguire le istruzioni fornite dal produttore.
- Dopo la separazione, i campioni di plasma EDTA o siero possono essere conservati nei tubi secondari per un massimo di 24 ore a 30°C e, successivamente, per un massimo di 5 giorni a una temperatura compresa tra 2°C e 8°C o per un massimo di 6 settimane a $\leq -20^{\circ}\text{C}$. Per la conservazione a lungo termine si consigliano temperature $\leq -60^{\circ}\text{C}$.
- I campioni di plasma sono stabili per un massimo di tre cicli di congelamento/scongelamento se congelati a una temperatura $\leq -20^{\circ}\text{C}$.
- Per le condizioni di conservazione, fare riferimento alla Figura 1.

Figura 1 Condizioni di conservazione per i campioni di sangue intero, plasma e siero

- 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.

Campioni DBS

- Raccogliere i campioni DBS (gocce di sangue secco) seguendo le procedure cliniche opportune.
- È consigliata l'applicazione di almeno 70 µl di sangue capillare all'interno del cerchio tratteggiato sulla carta DBS.
- Verificare che ENTRAMBI i lati del foglio siano saturi e che il cerchio sia riempito per intero.
- Lasciare asciugare i campioni DBS a temperatura ambiente (18-25°C) per almeno 3 ore, proteggendo la carta DBS dalla luce diretta del sole.
- Per maggiori dettagli, consultare il foglio illustrativo delle carte filtro utilizzate.
- Si consiglia di preparare almeno 3 dischi di carta per ogni campione del paziente.
- Conservare i campioni DBS in singole buste richiudibili, ognuna contenente un sacchetto disidratante.
- I campioni DBS possono essere trasportati o conservati a 15-30°C per un massimo di tre mesi.
- 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

Note sulla procedura

- Non utilizzare i reagenti **cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative**, **cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative Control Kit**, **cobas® NHP Negative Control Kit**, i reagenti **cobas omni** e **cobas® Specimen Pre-Extraction Reagent** oltre la data di scadenza indicata.
- Non riutilizzare i consumabili. Sono esclusivamente monouso.
- Per informazioni sulla corretta manutenzione degli strumenti, consultare il Manuale Operatore dei **cobas® 6800/8800 Systems**.

Preparazione dei campioni DBS

- Prima dell'uso, lasciare equilibrare a temperatura ambiente il reagente **cobas® Specimen Pre-Extraction Reagent** (SPER).
- Asportare un campione DBS dalla carta DBS.
- Trasferire lo spot in una provetta (5 ml, filettatura interna, diametro 12,5 mm, polipropilene [Cryo.s™]) utilizzando delle pinze o pinzette sterili o monouso.
- Assicurarsi che il campione DBS si posizioni sul fondo della provetta, come illustrato nella Figura 2.
- Pipettare 1150 µl di reagente SPER nella provetta contenente il campione DBS e chiudere con il tappo.
- Assicurarsi che il campione DBS sia ricoperto completamente dal reagente SPER.
- Inserire le provette nelle posizioni 1-24 di un Eppendorf Thermomixer preriscaldato (ad esempio, modello R 5355 o equivalente) con termoblocco da 24 provette per criogenia, quindi incubare per 10 minuti a 56°C e 1000 rpm, così da estrarre il virus dalle gocce di sangue intero secco.
- Stappare le provette e assicurarsi che il campione DBS abbia aderito alla parete della provetta (Figura 3) per prevenire la formazione di coaguli.
- Con un puntale di pipettamento sterile rimuovere la pellicola eventualmente presente sopra il livello del liquido (Figura 4) per prevenire errori di rilevamento del livello del liquido.
- Trasferire le provette sui **cobas® 6800/8800 Systems**.

Figura 2 Campione DBS nella provetta



Valido

Figura 3 Posizione del campione DBS



Valido

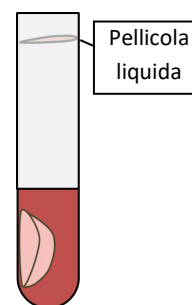


Valido



Potenziale rischio di coaguli

Figura 4 Pellicola liquida



Potenziale rischio di rilevamento errato del livello

Esecuzione del test cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative

Il volume minimo di campione per eseguire il test cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative è di 650 µl (flusso di lavoro basato su 500 µl di campione di plasma o siero) oppure di 1150 µl in cobas® Specimen Pre-Extraction Reagent (flusso di lavoro basato su 850 µl di campione DBS). Tenere presente che non è possibile analizzare i campioni DBS in batch misti con campioni di plasma o siero. La procedura del test è descritta dettagliatamente nel Manuale Operatore dei cobas® 6800/8800 Systems. Nella Figura 5 è illustrata una sintesi della procedura.

Figura 5 Procedura del test cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative

1	Ricaricare i reagenti e i consumabili segnalati dal sistema: • Caricare il reagente di lavaggio, il reagente di lisi e il diluente • Caricare le piastre di estrazione e le piastre di amplificazione • Caricare le biglie di vetro magnetiche • Caricare i reagenti specifici per il test • Caricare le cassette dei controlli • Ricaricare i rack portapuntali • Sostituire il rack per puntali otturati
2	Caricare i rack con i campioni
3	Rivedere ed esportare i risultati
4	Scaricamento dei consumabili: • Rimuovere le piastre di amplificazione dal modulo analitico • Scaricare le cassette dei controlli vuote • Svuotare i rifiuti solidi • Svuotare i rifiuti liquidi

Risultati

I **cobas**® 6800/8800 Systems rilevano e discriminano automaticamente e simultaneamente l'HIV-1 e l'HIV-2 nei campioni e nei controlli, segnalando la validità o meno del test, i risultati totali e i risultati per i singoli target.

Controllo di qualità e validità dei risultati

- Ogni batch deve includere un controllo negativo di plasma umano normale [(-) C] e due controlli positivi [HIV-1M/HIV-2 (+)C e HIV-1 O (+)C].
- Nel software **cobas**® 6800/8800 e/o nel report verificare se sono presenti flag e risultati ad essi associati per confermare la validità del batch.
- Il batch è valido se non sono presenti flag per nessuno dei tre controlli.

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

Flag dei controlli

Tabella 13 Flag per i controlli positivi e negativi

Controllo negativo	Flag	Risultato	Interpretazione
(-) C	Q02 (Batch di controllo non riuscito)	Invalid	L'intero batch è considerato non valido se il risultato del controllo (-) C non è valido.
Controllo positivo	Flag	Risultato	Interpretazione
HIV-1M/HIV-2 (+)C	Q02 (Batch di controllo non riuscito)	Invalid	L'intero batch è considerato non valido se il risultato del controllo HIV-1M/HIV-2 (+)C non è valido.
HIV-1 O (+)C	Q02 (Batch di controllo non riuscito)	Invalid	L'intero batch è considerato non valido se il risultato del controllo HIV-1 O (+)C non è valido.

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

Nel software **cobas**® 6800/8800, HIV-1M/HIV-2 (+) C significa controllo positivo **cobas**® HIV-1M/HIV-2 e HIV-1 O (+) C significa controllo positivo **cobas**® HIV-1 O.

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 dei campioni validi e non validi.
- I campioni sono contrassegnati con “Sì” nella colonna “Valido” se tutti i target richiesti hanno generato risultati validi. I campioni contrassegnati con “No” nella colonna “Valido” potrebbero necessitare di ulteriore interpretazione e altri interventi.
- I valori nella colonna “Risultato totale” relativi ai singoli campioni devono essere interpretati nel modo seguente:
 - Reactive: tutti i risultati richiesti sono reattivi oppure uno dei risultati richiesti è reattivo e l'altro è non reattivo
 - Non-Reactive: tutti i risultati richiesti sono non reattivi
 - Invalid: almeno un risultato richiesto non è valido
- I risultati dei target riportati per i singoli campioni sono validi salvo diversamente specificato.

Nella Tabella 14 sono riportati i risultati con l'interpretazione corrispondente ai fini della rilevazione dell'HIV-1 e dell'HIV-2.

Tabella 14 Risultati per i singoli target e relativa interpretazione

Valido	Risultato totale	Target 1	Target 2	Interpretazione
Yes	Reactive	HIV-1 Reactive	HIV-2 Reactive	Tutti i risultati richiesti erano validi. Rilevato segnale target per HIV-1 e HIV-2.
Yes	Reactive	HIV-1 Reactive	HIV-2 Non-Reactive	Tutti i risultati richiesti erano validi. Rilevato segnale target per HIV-1. Nessun segnale target rilevato per HIV-2.
Yes	Reactive	HIV-1 Non-Reactive	HIV-2 Reactive	Tutti i risultati richiesti erano validi. Nessun segnale target rilevato per HIV-1. Rilevato segnale target per HIV-2.
Yes	Non-Reactive	HIV-1 Non-Reactive	HIV-2 Non-Reactive	Tutti i risultati richiesti erano validi. Nessun segnale target rilevato per HIV-1 o HIV-2.
No	Invalid	Invalid	Invalid	Risultati non validi sia per HIV-1 sia per HIV-2. Ripetere il test sul campione originale per ottenere risultati validi sia per HIV-1 che per HIV-2. Se i risultati continuano a non essere validi, reperire un nuovo campione.

Limiti della procedura

- Il test **cobas**® HIV-1/HIV-2 Qualitative è stato valutato soltanto per l'uso in associazione con **cobas**® HIV-1/HIV-2 Qualitative Control Kit, **cobas**® NHP Negative Control Kit, **cobas** **omni** MGP Reagent, **cobas** **omni** Lysis Reagent, **cobas** **omni** Specimen Diluent, **cobas** **omni** Wash Reagent e **cobas**® Specimen Pre-Extraction Reagent (utilizzato nel flusso di lavoro per i campioni DBS) per l'uso sui **cobas**® 6800/8800 Systems.
- L'affidabilità dei risultati è influenzata dal metodo di raccolta, conservazione e manipolazione dei campioni.
- L'identificazione degli acidi nucleici di HIV-1 e HIV-2 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 di sintomi) e/o dallo stadio dell'infezione.
- Anche se rare, le mutazioni nelle regioni altamente conservate di un genoma virale coperte dal test **cobas**® HIV-1/HIV-2 Qualitative possono influenzare 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 alla scopo di qualificare tali differenze. Si consiglia agli utenti di elaborare norme/procedure specifiche.
- Il test **cobas**® HIV-1/HIV-2 Qualitative non è destinato all'uso come test di screening per la presenza dell'HIV-1/HIV-2 nel sangue o negli emoderivati.

Valutazione delle prestazioni non cliniche

Caratteristiche delle prestazioni

Limite di sensibilità (LoD)

Standard internazionali OMS/Standard primari Roche

Per determinare il limite di sensibilità del test **cobas**® HIV-1/HIV-2 Qualitative sono stati applicati i seguenti standard:

- 3° standard internazionale dell'OMS per l'RNA di HIV-1 gruppo M (codice NIBSC 10/152) per campioni di plasma EDTA, siero e DBS
- Standard internazionale dell'OMS per l'RNA di HIV-2 (codice NIBSC 08/150) per campioni di plasma e siero
- Standard primari Roche per l'RNA di HIV-2 per campioni DBS
- Standard primari Roche per l'RNA di HIV-1 gruppo O per campioni di plasma EDTA e siero

Al momento non è disponibile uno standard internazionale per l'RNA di HIV-1 gruppo O. Lo standard Roche per l'RNA di HIV-1 gruppo O è tracciabile al lotto 01 del pannello di riferimento n. 1 dell'RNA del sottotipo HIV-1 CBER. Gli standard primari Roche per l'RNA di HIV-1 gruppo O derivano da stock virali di colture disponibili in commercio, P/N 2420 (n. cat. 500493, SeraCare Life Sciences). Lo standard Roche per l'RNA di HIV-2 è tracciabile allo standard internazionale dell'OMS per l'RNA di HIV-2 (codice NIBSC 08/150). Gli standard primari Roche per l'RNA di HIV-2 derivano da stock virali di colture disponibili in commercio, P/N HIV-2 NIH-Z (n. cat. 10-27-000, Applied Biotechnologies, Inc.). Una copia di RNA di HIV-1 equivale a 1,7 unità internazionali (UI) e una copia di RNA di HIV-2 equivale a 0,2 UI.

Sono state preparate diluizioni seriali degli standard in plasma EDTA umano, siero o sangue intero (per i campioni DBS) HIV-negativi. I pannelli, costituiti da cinque o sei livelli di concentrazione più un campione negativo, sono stati analizzati con tre lotti di reagenti **cobas**® HIV-1/HIV-2 Qualitative in più sedute, giornate, operatori e strumenti.

Per ogni virus è stata applicata l'analisi PROBIT al 95% sui dati combinati tra le serie di diluizioni e i lotti di reagenti, in modo da stimare il limite di sensibilità (LoD) e calcolare il limite minimo e massimo dell'intervallo di confidenza al 95% (Tabella 15). Le percentuali di reattività osservate negli studi sul limite di sensibilità dedicati ad ogni virus sono sintetizzate dalla Tabella 16 alla Tabella 18.

Tabella 15 Risultati dell'analisi PROBIT al 95% sui dati LoD raccolti con gli standard virali in campioni di plasma EDTA, siero e DBS

Matrici	Analita	Unità di misura	LoD	Limite inferiore di confidenza al 95%	Limite superiore di confidenza al 95%
Plasma EDTA	HIV-1 gruppo M	copie/ml	12,6	10,9	15,2
	HIV-1 gruppo O	copie/ml	14,8	12,8	17,7
	HIV-2	copie/ml	27,9	22,9	36,6
Siero	HIV-1 gruppo M	copie/ml	12,1	10,5	14,5
	HIV-1 gruppo O	copie/ml	12,6	10,9	15,2
	HIV-2	copie/ml	23,4	19,6	29,7
DBS	HIV-1 gruppo M	copie/ml	255	224	299
	HIV-2	copie/ml	984	856	1169

Tabella 16 Riepilogo delle percentuali di reattività per l'HIV-1 gruppo M in campioni di plasma EDTA, siero e DBS

Matrici	Concentrazione dell'RNA di HIV-1 gruppo M (cp/ml)	N. reattivi	N. ripetizioni valide	% reattivi
Plasma EDTA	40	189	189	100%
	30	189	189	100%
	20	187	189	99%
	10	174	189	92%
	5	124	189	66%
	2,5	91	189	48%
	0	0	189	0%
Siero	40	189	189	100%
	30	189	189	100%
	20	187	189	99%
	10	176	189	93%
	5	126	189	67%
	2,5	86	189	46%
	0	0	189	0%
DBS	750	252	252	100%
	600	252	252	100%
	360	246	250	98%
	180	220	249	88%
	90	163	252	65%
	45	109	250	44%
	0	0	107	0%

Tabella 17 Riepilogo delle percentuali di reattività per l'HIV-1 gruppo O in plasma EDTA e siero

Matrici	Concentrazione dell'RNA di HIV-1 gruppo O (cp/ml)	N. reattivi	N. ripetizioni valide	% reattivi
Plasma EDTA	40	189	189	100%
	30	189	189	100%
	20	185	188	98%
	10	163	189	86%
	5	117	189	62%
	2,5	78	189	41%
	0	0	189	0%
Siero	40	189	189	100%
	30	189	189	100%
	20	186	189	98%
	10	173	189	92%
	5	132	189	70%
	2,5	91	189	48%
	0	0	189	0%

Tabella 18 Riepilogo delle percentuali di reattività per l'HIV-2 in campioni di plasma EDTA, siero e DBS

Matrici	Concentrazione dell'RNA di HIV-2 (cp/ml)	N. reattivi	N. ripetizioni valide	% reattivi
Plasma EDTA	80	126	126	100%
	40	124	126	98%
	20	115	126	91%
	10	81	126	64%
	5	61	126	48%
	0	0	189	0%
Siero	80	126	126	100%
	40	125	126	99%
	20	114	126	90%
	10	96	126	76%
	5	49	126	39%
	0	0	189	0%
DBS	3000	252	252	100%
	1450	241	247	98%
	725	226	246	92%
	362	167	248	67%
	181	103	250	41%
	0	0	108	0%

Precisione intra-laboratorio

Per determinare la precisione del test **cobas**® HIV-1/HIV-2 Qualitative sono stati applicati i seguenti standard:

- Standard Secondario Roche per HIV-1 gruppo M
- Standard Primario Roche per HIV-2

In questo studio sono stati analizzati due pannelli formulati individualmente con target HIV-1 gruppo M e HIV-2, ognuno costituito da 3 campioni con concentrazioni pari a circa 0,6 x, 1 x e 3 x LoD, ovvero il limite di sensibilità del test **cobas**® HIV-1/HIV-2 Qualitative. Sono stati eseguiti i test per le seguenti componenti di variabilità:

- variabilità tra giorni (su 4 giorni)
- variabilità tra lotti (con 3 diversi lotti di reagenti del test **cobas**® HIV-1/HIV-2 Qualitative)
- variabilità tra strumenti (con 3 diversi **cobas**® 6800/8800 Systems)

Sono state eseguite circa 84 ripetizioni con ognuno dei 3 campioni del pannello per ogni lotto di reagenti, per complessive 252 ripetizioni per tutti i lotti dei reagenti per ogni target. I risultati relativi alla precisione sono stati valutati calcolando la percentuale di risultati del test reattivi a ogni livello di concentrazione per ognuno dei componenti di variabilità analizzati.

I limiti degli intervalli di confidenza al 95% bilaterali per ogni percentuale di reattività sono stati calcolati per ognuno dei tre livelli di concentrazione relativi ai target HIV-1 gruppo M e HIV-2, che sono stati analizzati per 4 giorni, con 3 lotti di reagenti e 3 **cobas**® 6800/8800 Systems. Il test **cobas**® HIV-1/HIV-2 Qualitative è riproducibile su più giorni e con più lotti di reagenti e strumenti. I risultati riguardanti la variabilità tra i lotti dei reagenti sono sintetizzati nella Tabella 19 e nella Tabella 20.

Tabella 19 Precisione tra i lotti di reagenti del test **cobas®** HIV-1/HIV-2 Qualitative (plasma EDTA)

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%
HIV-1 gruppo M	~3 x LoD	1	100% (84/84)	95,7%	100%
		2	100% (84/84)	95,7%	100%
		3	100% (84/84)	95,7%	100%
	~1 x LoD	1	98,8% (83/84)	93,5%	100%
		2	98,8% (83/84)	93,5%	100%
		3	100% (84/84)	95,7%	100%
	~0,6 x LoD	1	77,4% (65/84)	67,0%	85,8%
		2	76,2% (64/84)	65,7%	84,8%
		3	82,1% (69/84)	72,3%	89,6%
HIV-2	~3 x LoD	1	98,8% (83/84)	93,5%	100%
		2	96,4% (81/84)	89,9%	99,3%
		3	100% (84/84)	95,7%	100%
	~1 x LoD	1	98,8% (83/84)	93,5%	100%
		2	98,8% (83/84)	93,5%	100%
		3	97,6% (82/84)	91,7%	99,7%
	~0,6 x LoD	1	66,7% (56/84)	55,5%	76,6%
		2	69,0% (58/84)	58,0%	78,7%
		3	69,0% (58/84)	58,0%	78,7%

Tabella 20 Precisione tra i lotti di reagenti del test **cobas®** HIV-1/HIV-2 Qualitative (campioni DBS)

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%
HIV-1 gruppo M	~ 3 x LoD	1	100% (84/84)	95,7%	100%
		2	100% (83/83)	95,7%	100%
		3	97,6% (82/84)	91,7%	99,7%
	~ 1 x LoD	1	96,4% (81/84)	89,9%	99,3%
		2	96,4% (81/84)	89,9%	99,3%
		3	95,2% (80/84)	88,3%	98,7%
	~ 0,6 x LoD	1	88,0% (73/83)	79,0%	94,1%
		2	83,3% (70/84)	73,6%	90,6%
		3	88,1% (74/84)	79,2%	94,1%
HIV-2	~ 3 x LoD	1	100% (83/83)	95,7%	100%
		2	100% (84/84)	95,7%	100%
		3	100% (83/83)	95,7%	100%
	~ 1 x LoD	1	97,6% (82/84)	91,7%	99,7%
		2	97,6% (82/84)	91,7%	99,7%
		3	98,8% (83/84)	93,5%	100%
	~ 0,6 x LoD	1	88,1% (74/84)	79,2%	94,1%
		2	91,7% (77/84)	83,6%	96,6%
		3	85,7% (72/84)	76,4%	92,4%

Verifica del gruppo/sottotipo e inclusività

Le prestazioni del test **cobas®** HIV-1/HIV-2 Qualitative sono state valutate con riferimento all'HIV-1 gruppo M e relativi sottotipi, gruppo O, gruppo N e all'HIV-2 gruppo B:

- Verifica del limite di sensibilità per l'HIV-1 gruppo M e relativi sottotipi, gruppo O (verifica tramite diluizione in sangue intero per i campioni DBS) e gruppo N e per l'HIV-2 gruppo B
- Verifica dell'inclusività per l'HIV-1 gruppo M e relativi sottotipi, gruppo O, gruppo N e per l'HIV-2 gruppo A e gruppo B

Verifica del limite di rilevazione per l'HIV-1 gruppo M e relativi sottotipi, gruppo O e gruppo N e per l'HIV-2 gruppo B

I campioni clinici o coltivati di HIV per quanto riguarda l'HIV-1 gruppo M (sottotipi A, C, D, F, G, H) e forme ricombinanti circolanti (CRF01_AE, CRF02_AG), l'HIV-1 gruppo N e l'HIV-2 gruppo B sono stati diluiti in plasma EDTA, in siero o in sangue intero (flusso di lavoro DBS); inoltre i campioni di HIV-1 gruppo O sono stati diluiti in sangue intero (flusso di lavoro DBS) fino alla concentrazione corrispondente al limite di sensibilità (LoD) del gruppo/sottotipo predominante (HIV-1 gruppo M sottotipo B o HIV-2 gruppo A), sulla base del valore LoD definito mediante analisi PROBIT al 95% per

tutti i lotti combinati. Il calcolo del tasso di reattività è stato effettuato con 42 ripetizioni. I test sono stati eseguiti con 1 lotto di reagenti **cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative**. I risultati relativi all'HIV-1 sono illustrati nella Tabella 21 e i risultati relativi all'HIV-2 nella Tabella 22. I risultati ottenuti dimostrano che, nel caso dell'HIV-1 gruppo M (A, C, D, F, G, H, CRF01_AE, CRF02_AG), dell'HIV-1 gruppo O, dell'HIV-1 gruppo N e dell'HIV-2 gruppo B, il test **cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative** ha rilevato l'HIV alla concentrazione dichiarata per ogni matrice o al di sotto di questa, con un intervallo di confidenza al 95% uguale o maggiore al tasso di reattività atteso del 95%.

Tabella 21 Verifica del limite di sensibilità per l'HIV-1 gruppo M e relativi sottotipi, gruppo O e gruppo N in plasma EDTA, siero o sangue intero (campioni DBS)

Gruppo Sottotipo		Plasma: 12,6 cp/ml			Siero: 12,1 cp/ml			DBS: 255 cp/ml		
		N. ripetizioni valide	N. reattivi	% reattivi (IC 95%*)	N. ripetizioni valide	N. reattivi	% reattivi (IC 95%*)	N. ripetizioni valide	N. reattivi	% reattivi (IC 95%*)
M	A	42	40	95% (99%)	42	40	95% (99%)	41	37	90% (97%)
	C	42	41	98% (100%)	42	42	100% (99,4%)	42	42	100% (100%)
	D	42	37	88% (96%)	42	37	88% (96%)	42	39	93% (99%)
	F	42	38	90% (97%)	42	38	90% (97%)	42	40	95% (99%)
	G	42	40	95% (99%)	42	39	93% (99%)	42	42	100% (100%)
	H	42	38	90% (97%)	42	41	98% (100%)	42	41	98% (100%)
	CRF01_AE	42	38	90% (97%)	42	38	90% (97%)	42	41	98% (100%)
	CRF02_AG	42	36	86% (95%)	42	39	93% (99%)	42	42	100% (100%)
O		N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	41	39	95% (99%)
N		42	39	93% (99%)	42	37	88% (96%)	41	40	98% (100%)

* Intervallo superiore di confidenza al 95%

Tabella 22 Verifica del limite di sensibilità per l'HIV-2 gruppo B in plasma EDTA, siero o sangue intero (campioni DBS)

Gruppo	Plasma: 27,9 cp/ml			Siero: 23,4 cp/ml			DBS: 984 cp/ml		
	N. ripetizioni valide	Numero di positivi	% reattivi (IC 95%*)	N. ripetizioni valide	Numero di positivi	% reattivi (IC 95%*)	N. ripetizioni valide	Numero di positivi	% reattivi (IC 95%*)
B	42	42	100% (100%)	42	42	100% (100%)	42	42	100% (100%)

* Intervallo superiore di confidenza al 95%

Verifica dell'inclusività per l'HIV-1 gruppo M e relativi sottotipi, gruppo O, gruppo N e per l'HIV-2 gruppo B

Per determinare le prestazioni del test cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative per quanto riguarda l'identificazione dei sottotipi dell'HIV-1 gruppo M (A, C, D, F, G, H, J, K) e forme ricombinanti circolanti (CRF01_AE, CRF02_AG, CRF12_BF, CRF14_BG), dell'HIV-1 gruppo O, dell'HIV-1 gruppo N, dell'HIV-2 gruppo A e dell'HIV-2 gruppo B, sono stati analizzati campioni clinici univoci e/o isolati da coltura per ogni gruppo o sottotipo in plasma EDTA o siero.

HIV-1 gruppo M

Complessivamente sono stati analizzati 105 campioni clinici univoci di HIV-1 gruppo M con sottotipo di HIV-1 noto, sia non diluiti che diluiti a circa 5 x LoD del test cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative. Tutti i 105 campioni clinici con sottotipo noto sono stati identificati sia in forma non diluita che in forma diluita a circa 5 x LoD (Tabella 23).

Inoltre quattro campioni clinici di HIV-1 gruppo M sottotipo CRF12_BF e un campione clinico di HIV-1 gruppo M sottotipo CRF14_BG sono stati analizzati dopo la preparazione di una serie di diluizioni. Il test è stato ripetuto una volta su ogni campione non diluito e una volta sulle singole diluizioni, che per l'HIV-1 gruppo M sottotipo CRF12_BF erano comprese tra 1:1,0E+01 e 1:5,0E+02 (2-4 diluizioni per campione), mentre per l'HIV-1 gruppo M sottotipo CRF14_BG erano comprese tra 1:2,0E+01 e 1:1,2E+02 (4 diluizioni). Tutti i campioni sono risultati reattivi. Tutti i campioni clinici analizzati sono stati identificati a concentrazioni ≤ 5 x LoD.

Tabella 23 Campioni clinici di HIV-1 gruppo M

Sottotipo / forme ricombinanti circolanti	% reattivi (n. reattivi/n. campioni analizzati) non diluiti	% reattivi (n. reattivi/n. campioni analizzati) diluiti a 5 x LoD
A	100% (10/10)	100% (10/10)
C	100% (10/10)	100% (10/10)
D	100% (10/10)	100% (10/10)
F	100% (10/10)	100% (10/10)
G	100% (10/10)	100% (10/10)
H	100% (10/10)	100% (10/10)
J	100% (5/5)	100% (5/5)
K	100% (9/9)	100% (9/9)
CRF01_AE	100% (10/10)	100% (10/10)
CRF02_AG	100% (10/10)	100% (10/10)
CRF12_BF	100% (2/2)	100% (2/2)
CRF14_BG	100% (9/9)	100% (9/9)

HIV-1 gruppo O e HIV-1 gruppo N

Complessivamente sono stati analizzati 10 campioni clinici o isolati da coltura di HIV-1 gruppo O e uno di HIV-1 gruppo N dopo la preparazione di una serie di diluizioni. Il test è stato ripetuto due volte su ogni campione non diluito e quattro volte sulle singole diluizioni, che per l'HIV-1 gruppo O erano comprese tra 1:1,0E+01 e 1:4,8E+05 (3-5 diluizioni per campione). Tutti i campioni sono risultati reattivi. Il test è stato ripetuto due volte sul campione non diluito e quattro volte sulle singole diluizioni, che per l'HIV-1 gruppo N erano comprese tra 1:1,0E+04 e 1:1,4E+05 (5 diluizioni). Il

campione non diluito e le diluizioni comprese tra 1:1,0E+04 e 1:4,5E+04 hanno generato il 100% di risultati reattivi, mentre la diluizione 1:1,4E+05 ha generato il 50% di risultati reattivi. Tutti i campioni analizzati sono stati identificati a concentrazioni $\leq 3 \times \text{LoD}$.

HIV-2

Complessivamente sono stati analizzati 16 campioni clinici univoci o isolati da coltura di HIV-2 gruppo A e gruppo B, sia non diluiti che diluiti a circa $5 \times \text{LoD}$ del test **cobas**® HIV-1/HIV-2 Qualitative. Tutti i 16 campioni di HIV-2 sono stati identificati sia in forma non diluita che in forma diluita a circa $5 \times \text{LoD}$ (Tabella 24).

Inoltre sei campioni clinici di HIV-2 gruppo A e quattro di HIV-2 gruppo B sono stati analizzati dopo aver preparato una serie di diluizioni. Il test è stato ripetuto una volta su ogni campione non diluito e una volta sulle singole diluizioni, che per l'HIV-2 gruppo A erano comprese tra 1:1,0E+01 e 1:9,0E+02 (2-5 diluizioni per campione) e per l'HIV-2 gruppo B erano comprese tra 1:2,0E+01 e 1:6,0E+01 (2-4 diluizioni). Tutti i campioni sono risultati reattivi. Tutti i campioni clinici analizzati sono stati identificati a concentrazioni $\leq 3 \times \text{LoD}$.

Tabella 24 Campioni clinici o isolati da coltura di HIV-2

Sottotipo	% reattivi (n. reattivi/n. campioni analizzati) non diluiti	% reattivi (n. reattivi/n. campioni analizzati) diluiti a $\sim 5 \times \text{LoD}$
A	100% (4/4)	100% (4/4)
B	100% (6/6)	100% (6/6)

Specificità

La specificità del test **cobas**® HIV-1/HIV-2 Qualitative è stata determinata analizzando plasma EDTA, siero e campioni DBS HIV-negativi da singoli donatori di sangue. In totale sono stati analizzati 613 campioni individuali di plasma EDTA e 607 campioni individuali di siero con due lotti di reagenti **cobas**® HIV-1/HIV-2 Qualitative. Inoltre sono stati analizzati 604 campioni DBS individuali con tre lotti di reagenti **cobas**® HIV-1/HIV-2 Qualitative. Tutti i campioni analizzati sono risultati non reattivi per l'HIV-1 e per l'HIV-2. In ognuno dei campioni di plasma EDTA, siero e DBS, la specificità del test **cobas**® HIV-1/HIV-2 Qualitative è stata del 100% (limite di confidenza al 95%: $\geq 99,5\%$).

Pannelli di sieroconversione

Le prestazioni del test **cobas**® HIV-1/HIV-2 Qualitative sono state valutate utilizzando dei pannelli di sieroconversione disponibili in commercio per l'HIV-1 gruppo M.

Pannelli di sieroconversione per l'HIV-1 gruppo M

Sono stati utilizzati 25 pannelli di sieroconversione disponibili in commercio. Ogni componente del pannello è stato analizzato in forma non diluita con il test **cobas**® HIV-1/HIV-2 Qualitative: i risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti con un test sierologico HIV Ag/Ab di IV generazione approvato dalla FDA e con un test comparativo degli acidi nucleici approvato dalla FDA. I risultati complessivi delle prestazioni sono sintetizzati nella Tabella 25.

Tabella 25 Prestazioni del test cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative con i pannelli di sieroconversione dell'HIV

Pannello di sieroconversione dell'HIV	N. di componenti del pannello analizzati	N. di componenti del pannello con risultato reattivo			Giorni prima del primo risultato reattivo			Giorni di anticipo per la rilevazione con il test cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative	
		cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative	Test NAT comparativo	Test sierologico HIV Ag/Ab	cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative	Test NAT comparativo	Test sierologico HIV Ag/Ab	Test NAT comparativo	Test sierologico HIV Ag/Ab
HIV6243	10	6	6	4	18	18	25	0	7
HIV9011	11	3	3	2	30	30	38	0	8
HIV9012	8	5	5	3	9	7	16	-2	7
HIV9013	7	3	2	2	18	23	23	5	5
HIV9018	10	5	5	3	21	21	28	0	7
HIV9020	21	5	5	3	83	83	90	0	7
HIV9022	9	3	4	2	23	17	25	-6	2
HIV9030	16	6	5	3	40	40	47	0	7
HIV9031	19	8	6	4	120	131	146	11	26
HIV9034	13	4	4	3	41	41	46	0	5
HIV9076	9	3	3	3	66	66	66	0	0
HIV9089	6	5	5	3	7	7	16	0	9
HIV12008	13	7	7	5	21	21	28	0	7
PRB954	7	5	5	2	7	7	17	0	10
PRB956	5	4	4	2	40	40	47	0	7
PRB958	6	6	6	4	0	0	7	0	7
PRB961	9	4	4	2	19	19	27	0	8
PRB962	6	4	4	2	7	7	14	0	7
PRB963	7	4	5	2	9	7	17	-2	8
PRB967	6	5	5	3	3	3	17	0	14
PRB968	10	6	6	4	15	15	26	0	11
PRB969	10	7	6	3	53	53	70	0	17
PRB973	4	4	4	2	0	0	7	0	7
PRB976	4	4	4	2	0	0	7	0	7
PRB977	4	4	2	2	0	-*	13	-*	13
Totale	230	120	115	70					

* Risultato non valido per il test NAT comparativo per il primo componente del pannello PRB977, per il quale era atteso un risultato reattivo al test NAT. Il pannello PRB977 non è stato pertanto incluso nella valutazione dei risultati del test NAT comparativo.

Specificità analitica

La specificità analitica del test **cobas®** HIV-1/HIV-2 Qualitative è stata valutata con riferimento alla reattività crociata utilizzando un pannello di microrganismi a una concentrazione di 10^5 o 10^6 particelle, copie o PFU/ml, rispettivamente per isolati virali e ceppi batterici/isolati di lievito (Tabella 26). Questi microrganismi sono stati aggiunti al plasma EDTA umano HIV-negativo e sono stati analizzati con e senza l'aggiunta dei virus HIV-1 e HIV-2 a una concentrazione pari a circa 3 x LoD del test **cobas®** HIV-1/HIV-2 Qualitative per ogni virus. Il test **cobas®** HIV-1/HIV-2 Qualitative ha generato risultati non reattivi per tutti i campioni che contenevano i microrganismi ma non i target HIV-1 e HIV-2 e risultati reattivi per tutti i campioni che contenevano sia i microrganismi che i target HIV-1 e HIV-2. I microrganismi analizzati non causano reazioni crociate e non interferiscono con il test **cobas®** HIV-1/HIV-2 Qualitative.

Tabella 26 Microrganismi analizzati con riferimento alla reattività crociata

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

Per ognuno degli stati patologici (uno per l'Adenovirus tipo 5 e dieci per ognuno degli altri stati patologici) elencati nella Tabella 27 sono stati analizzati campioni di plasma EDTA con e senza l'aggiunta dei target HIV-1 e HIV-2 a una concentrazione 3 x LoD del test **cobas®** HIV-1/HIV-2 Qualitative per ogni virus. Gli stati patologici analizzati non causano reazioni crociate e non interferiscono con il test **cobas®** HIV-1/HIV-2 Qualitative.

Tabella 27 Campioni degli stati patologici analizzati ai fini della specificità analitica

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

Specificità analitica e sostanze interferenti

Campioni con livelli elevati di trigliceridi (33 g/l), bilirubina coniugata (0,2 g/l), bilirubina non coniugata (0,2 g/l), albumina (60 g/l), emoglobina (2 g/l) e DNA umano (2 mg/l), nonché campioni di soggetti affetti da malattie autoimmuni quali il lupus eritematoso sistemico (LES), l'artrite reumatoide (AR) e gli anticorpi anti nucleo (ANA), sono stati analizzati con e senza l'aggiunta dell'RNA di HIV-1 e di HIV-2.

Sono stati analizzati inoltre i composti farmacologici elencati nella Tabella 28 ad una concentrazione pari a tre volte il valore C_{max} , con e senza l'aggiunta dell'RNA di HIV-1 e di HIV-2.

Fatta eccezione per i trigliceridi e il DNA umano, nessuna delle sostanze potenzialmente interferenti causa interferenze con le prestazioni del test. I trigliceridi e il DNA umano, rispettivamente a concentrazioni superiori a 25 g/l e 1,5 mg/l, possono interferire e generare risultati non validi. Il test cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative ha generato risultati non reattivi per tutti i campioni che non contenevano i target HIV e risultati reattivi per tutti i campioni che contenevano i target HIV-1 e HIV-2.

Tabella 28 Composti farmacologici analizzati con riferimento all'interferenza con il test cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative

Categoria farmacologica	Nome generico del farmaco	
Immunomodulatori	Peginterferone $\pm$ 2a	Ribavirina
	Peginterferone $\pm$ 2b	
Inibitori dell'HCV	Simeprevir	Sofosbuvir
Inibitori della trascrittasi inversa o della DNA polimerasi	Emtricitabina	Tenofovir
	Entecavir	Adefovir dipivoxil
	Foscarnet	Telbivudina
	Cidofovir	Aciclovir
	Lamivudina	Valganciclovir
	Ganciclovir	
Composti per il trattamento delle infezioni opportunistiche	Azitromicina	Pirazinamide
	Claritromicina	Rifabutina
	Etambutolo	Rifampicina
	Fluconazolo	Sulfametossazolo
	Isoniazide	Trimetoprima
Statine	Atorvastatina	
Inibitori selettivi della ricaptazione della serotonina	Fluoxetina	Paroxetina
	Sertralina	
Antistaminici	Loratadina	
Betabloccanti	Nadololo	
Decongestionanti	Fenilefrina HCl	
Farmaci antinfiammatori non steroidei	Naprossene	Ibuprofene
Antidolorifici	Acetaminofene (paracetamolo)	Acido acetilsalicilico (aspirina)
Vitamine	Acido ascorbico (vitamina C)	

Correlazione

Plasma EDTA e siero

Le prestazioni del test **cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative** sono state confrontate con quelle di altri due test: COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Qualitative Test, v2.0 (campioni di plasma EDTA HIV-1) e un test per la differenziazione anticorpale HIV-1/HIV-2 con marchio CE (campioni di plasma EDTA e di siero HIV-1 e HIV-2).

Per definire la correlazione con COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Qualitative Test, v2.0, sono stati analizzati dei campioni clinici di plasma EDTA presso un laboratorio esterno. Nel caso dei campioni clinici in plasma EDTA HIV-1-positivi e HIV-1-negativi, la concordanza percentuale totale tra i due test è stata del 100%: ciò dimostra che le prestazioni dei due test **cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative** e COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Qualitative Test, v2.0 si equivalgono (Tabella 29).

Tabella 29 Risultati relativi alla correlazione tra i metodi con campioni di HIV-1 in plasma EDTA

Correlazione tra i metodi campioni di HIV-1 in plasma EDTA		COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Qualitative Test, v2.0	
		Reattivi	Non reattivi
cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative	Reattivi	68	0
	Non reattivi	0	80

Ai fini del confronto con il test per la differenziazione anticorpale HIV-1/HIV-2 con marchio CE, i campioni di plasma EDTA e di siero sono stati analizzati presso un laboratorio esterno. Nel caso dei campioni di plasma EDTA o siero HIV-1-positivi e HIV-1-negativi, è stata rilevata una concordanza percentuale totale del 100% tra i due test. Nel caso dei campioni di plasma EDTA o siero HIV-2-positivi e HIV-2-negativi, è stata rilevata una concordanza percentuale totale del 99,7% tra i due test. Ciò dimostra che le prestazioni del test **cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative** e del test per la differenziazione anticorpale HIV-1/HIV-2 con marchio CE si equivalgono (Tabella 30 e Tabella 31).

Tabella 30 Risultati relativi alla correlazione tra i metodi con campioni di HIV-1 in plasma EDTA e siero

Correlazione tra i metodi campioni di HIV-1 in plasma EDTA e siero		Test per la differenziazione anticorpale HIV-1/HIV-2 con marchio CE		
		Reattivi	Non reattivi	Indeterminate
cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative	Reattivi	138	0	0
	Non reattivi	0	164	1*

* Il campione che aveva generato un risultato non reattivo con il test **cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative** e un risultato indeterminato con il test per la differenziazione anticorpale HIV-1/HIV-2 con marchio CE è stato successivamente analizzato con un test sierologico HIV Ag/Ab di IV generazione con marchio CE ed è risultato negativo.

Tabella 31 Risultati relativi alla correlazione tra i metodi con campioni di HIV-2 in plasma EDTA e siero

Correlazione tra i metodi campioni di HIV-2 in plasma EDTA e siero		Test per la differenziazione anticorpale HIV-1/HIV-2 con marchio CE		
		Reattivi	Non reattivi	Indeterminate
cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative	Reattivi	14	0	0
	Non reattivi	1	287	1*

* Il campione che aveva generato un risultato non reattivo con il test **cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative** e un risultato indeterminato con il test per la differenziazione anticorpale HIV-1/HIV-2 con marchio CE è stato successivamente analizzato con un test sierologico HIV Ag/Ab di IV generazione con marchio CE ed è risultato negativo.

Campioni DBS

Le prestazioni dei test **cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative** sono state confrontate con le prestazioni del **COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Qualitative Test, v2.0** analizzando presso un laboratorio esterno dei campioni clinici DBS di neonati. Nel caso dei campioni clinici DBS HIV-1-positivi e HIV-1-negativi, la concordanza percentuale totale tra i due test è stata del 99,6%: ciò dimostra che le prestazioni dei due test **cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative** e **COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Qualitative Test, v2.0** si equivalgono (Tabella 32).

Tabella 32 Risultati relativi alla correlazione tra i metodi con campioni DBS di HIV-1

Correlazione tra i metodi Campioni di HIV-1 di tipo DBS		COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Qualitative Test, v2.0	
		Reattivi	Non reattivi
cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative	Reattivi	127	1*
	Non reattivi	0	151

* Il campione che aveva generato un risultato reattivo con il test **cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative** e un risultato non reattivo con **COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Qualitative Test, v2.0** è stato successivamente analizzato con la metodica della nested-PCR ed è stato confermato HIV-1-positivo.

Tasso globale d'errore del sistema

Il tasso globale d'errore del sistema per il test **cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative** è stato calcolato ripetendo il test 100 volte su plasma EDTA e 100 volte su sangue intero (per i campioni DBS) arricchito sia con HIV-1 gruppo M sottotipo B, sia con HIV-2. I campioni sono stati analizzati a una concentrazione del target pari a circa 3 x LoD.

I risultati dello studio dimostrano che tutte le ripetizioni dei test hanno prodotto risultati validi e positivi per i target HIV-1 e HIV-2, generando un tasso globale d'errore del sistema dello 0% per il plasma EDTA e i campioni DBS. L'intervallo di confidenza esatto al 95% bilaterale è stato dello 0% per il limite inferiore e del 3,6% per il limite superiore per ogni target e matrice.

Contaminazione crociata

Il tasso di contaminazione crociata del test cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative è stato calcolato analizzando 240 ripetizioni di un campione DBS HIV-negativo e 225 ripetizioni di un campione DBS con titolo di HIV-1 alto a una concentrazione di $2,0 \times 10^7$ cp/ml. Lo studio è stato eseguito in base al flusso di lavoro per la preparazione dei campioni DBS.

Complessivamente sono state eseguite cinque sedute con campioni positivi e negativi in una configurazione a scacchiera.

Tutte le 240 ripetizioni eseguite sul campione negativo hanno prodotto risultati non reattivi, pertanto il tasso di contaminazione crociata è stato dello 0%. L'intervallo di confidenza al 95% bilaterale è stato dello 0% per il limite inferiore e dell'1,5% per il limite superiore.

Informazioni supplementari

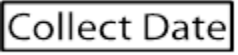
Caratteristiche del test

Tipo di campione	Plasma EDTA, siero e DBS		
Quantità minima di campione richiesta	650 µl per i campioni di plasma EDTA e siero o un campione DBS (70 µl di sangue secco per spot) in 1150 µl di cobas® Specimen Pre-Extraction Reagent (SPER)		
Volume di analisi del campione	500 µl per i campioni di plasma EDTA e siero o 850 µl per i campioni DBS		
Sensibilità analitica		<u>HIV-1M</u>	<u>HIV-2</u>
	Plasma EDTA	12,6 cp/ml	27,9 cp/ml
	Siero	12,1 cp/ml	23,4 cp/ml
	DBS	255 cp/ml	984 cp/ml
Specificità	100% (intervallo di confidenza al 95% unilaterale: 99,5%) (plasma EDTA/siero)		
	100% (intervallo di confidenza al 95% unilaterale: 99,5%) (DBS)		
Gruppi/sottotipi: inclusività	HIV-1M (A-D, F-H, J, K, CRF01_AE, CRF02_AG, CRF12_BF, CRF14_BG), HIV-1 O, HIV-1N, HIV-2 (A e B)		

Simboli

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

Tabella 33 Simboli utilizzati sulle etichette dei prodotti diagnostici PCR di Roche

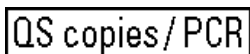
	Età o data di nascita		Data di produzione
	Software ausiliario		Distribuito da
	Intervallo assegnato (copie/ml)		Non riutilizzare
	Intervallo assegnato (UI/ml)		Femmina
	Mandatario nella Comunità Europea		Solo per valutazione delle prestazioni IVD
	Foglio di dati del barcode		Global Trade Item Number
	Codice del batch		Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i>
	Rischio biologico		Limite inferiore dell'intervallo assegnato
	Numero di catalogo		Maschio
	Data di raccolta		Fabbricante
	Consultare le istruzioni per l'uso		Controllo negativo
	Contenuto sufficiente per <n> test		Non sterile
	Contenuto del kit		Numero del paziente
	Controllo		Nome del paziente



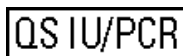
Staccare qui



Controllo positivo



Copie QS per reazione PCR;
usare le copie QS per reazione
PCR nel calcolo dei risultati.



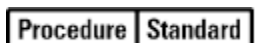
UI QS per reazione PCR;
utilizzare le unità internazionali
(UI) QS per la reazione PCR
nel calcolo dei risultati.



Numero di serie



Sito



Procedura standard



Sterilizzazione con ossido di
etilene



Conservare al buio



Limiti di temperatura



File di definizione del test



Contrassegno di
conformità CE: questo
dispositivo è conforme ai
requisiti pertinenti del
marchio CE relativamente ai
dispositivi medico-diagnostici
in vitro



Alto



Identificazione univoca del
dispositivo



Procedura ultrasensibile



Limite superiore dell'intervallo
assegnato



Riga di riempimento urina

Rx Only

Solo USA: la legge federale
statunitense limita la vendita
di questo dispositivo ai
medici o su presentazione di
prescrizione medica.



Utilizzare entro la data



Dispositivo idoneo ai test
POC



Dispositivo non idoneo ai test
POC



Dispositivo idoneo
all'autodiagnosi



Dispositivo non idoneo
all'autodiagnosi

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

Produttore e distributori

Tabella 34 Produttore e distributori



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

Made in USA

Distributed by Roche Diagnostics
9115 Hague Road
Indianapolis, IN 46250-0457 USA
(For Technical Assistance call the
Roche Response Center
toll-free: 1-800-526-1247)

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, Germany

Marchi e brevetti

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

COBAS, COBAS OMNI e AMPERASE sono marchi di Roche.

Il marchio “Armored RNA” è di proprietà di Asuragen, Inc. e Cenetron Diagnostics, Ltd.

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

Vacutainer® è un marchio registrato di Becton Dickinson & Company.

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

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

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

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

Copyright

©2021 Roche Molecular Systems, Inc.



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116
68305 Mannheim
Germany



Bibliografia

1. AAHVM. Fundamentals of HIV Medicine. Washington, DC;2007.
2. UNAIDS. Global AIDS Update. Geneva;2016.
3. Hoover DR, Saah AJ, Bacellar H, et al. Clinical manifestations of AIDS in the era of pneumocystis prophylaxis. *N Engl J Med*. 1993;329(69):1922-6.
4. Campbell-Yesufu OT, Gandhi RT. Update on human immunodeficiency virus (HIV)-2 infection. *Clin Infect Dis*. 2011;52(6):780-7.
5. CDC. Laboratory Testing for the Diagnosis of HIV Infection. Atlanta, GA;2014.
6. Gökengin D, Geretti AM, Begovac J, et al. 2014 European Guideline on HIV testing. *Int J STD AIDS*. 2014;25(10):695-704.
7. Masciotra S, McDougal JS, Feldman J, Sprinkle P, Wesolowski L, Owen SM. Evaluation of an alternative HIV diagnostic algorithm using specimens from seroconversion panels and persons with established HIV infections. *J Clin Virol*. 2011;52 Suppl 1:S17-22.
8. O'Brien M, Markowitz M. Should we treat acute HIV infection? *Current HIV/AIDS Reports*. 2012;9(2):101-10.
9. Branson BM, Mermin J. Establishing the diagnosis of HIV infection: new tests and a new algorithm for the United States. *J Clin Virol*. 2011;52 Suppl 1:S3-4.
10. Cohen MS, Shaw GM, McMichael AJ, Haynes BF. Acute HIV-1 Infection. *N Engl J Med*. 2011;364(20):1943-54.
11. World Health Organization. Diagnosis of HIV infection in infants and children. Geneva, 2010.
12. Wittek M, Stürmer M, Doerr HW, Berger A. Molecular assays for monitoring HIV infection and antiretroviral therapy. *Expert Rev Mol Diagn*. 2007;7(3):237-46.
13. Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene*. 1990;93:125-8.
14. Savva R, McAuley-Hecht K, Brown T, Pearl L. The structural basis of specific base-excision repair by uracil-DNA glycosylase. *Nature*. 1995;373:487-93.
15. Mol CD, Arvai AS, Slupphaug G, et al. Crystal structure and mutational analysis of human uracil-DNA glycosylase: structural basis for specificity and catalysis. *Cell*. 1995;80:869-78.
16. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (NY)*. 1992;10:413-7.
17. Heid CA, Stevens J, Livak JK, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res*. 1996;6:986-94.
18. Center for Disease Control and Prevention. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, 5th ed. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health HHS Publication No. (CDC) 21-1112, revised December 2009.
19. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections. Approved Guideline-Fourth Edition. CLSI Document M29-A4:Wayne, PA;CLSI, 2014.

Revisione del documento

Informazioni sulla revisione del documento	
Doc Rev. 6.0 03/2021	Aggiornamento degli avvertimenti sui pericoli. Aggiornamento della sezione Marchi e brevetti . Inserimento del simbolo Rx Only nella prima pagina. Aggiunta della dichiarazione "Made in". Aggiornata la pagina dei simboli armonizzati. Per ulteriori domande e chiarimenti, è possibile rivolgersi al rappresentante Roche locale.