

cobas[®] WNV

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

Per uso diagnostico in vitro

cobas[®] WNV – 96	P/N: 07001061190
cobas[®] WNV – 480	P/N: 07001070190
cobas[®] WNV Control Kit	P/N: 07001118190
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® WNV	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 sangue di donatori viventi	16
Campioni di sangue da donatori non viventi	18
Istruzioni per l'uso	19
Pipettamento automatico dei campioni e creazione di pool (opzionale)	19
Note sulla procedura	19
Esecuzione del test cobas® WNV	19
Risultati	20
Controllo di qualità e validità dei risultati	20
Interpretazione dei risultati	21
Limiti della procedura	21

Valutazione delle prestazioni non cliniche..... 22

Caratteristiche delle prestazioni (campioni di donatori viventi)	22
Limite di sensibilità (LoD).....	22
Riproducibilità	24
Inclusività.....	25
Specificità analitica	26
Specificità analitica e sostanze interferenti.....	27
Correlazione	28
Tasso globale d'errore del sistema	28
Caratteristiche delle prestazioni (campioni cadaverici)	29
Sensibilità.....	29
Specificità.....	29
Riproducibilità	30

Valutazione delle prestazioni cliniche..... 32

Sensibilità clinica: analisi dei campioni con positività accertata per il virus del Nilo occidentale	32
Specificità clinica	32
Risultati dei test in pool	33
Risultati dei test individuali.....	33
Riproducibilità	34

Informazioni supplementari..... 35

Caratteristiche del test	35
Simboli.....	36
Produttore e distributori	37
Marchi e brevetti.....	37
Copyright	37
Bibliografia.....	38
Revisione del documento	41

Uso previsto

Il test cobas® WNV per l'uso sui cobas® 6800 e cobas® 8800 Systems è un test *in vitro* qualitativo che consente di rilevare la presenza dell'RNA del virus del Nilo Occidentale (WNV) nel plasma umano.

Il test è destinato all'uso nello screening dell'RNA di WNV in campioni di plasma di singoli donatori umani, inclusi donatori di sangue intero ed emocomponenti e altri donatori viventi. Questo test è inoltre impiegato per lo screening delle donazioni di organi e tessuti, con prelievo dei campioni in presenza di battito cardiaco del donatore, oltre che per lo screening dei campioni di donatori non viventi, ovvero in assenza di battito cardiaco.

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

Per lo screening del plasma di tutti i donatori, è possibile analizzare i campioni individualmente. Per lo screening delle donazioni di sangue intero e di emocomponenti, è possibile analizzare i campioni di plasma individualmente o in pool costituiti da aliquote di singoli campioni. Per lo screening delle donazioni di organi e tessuti (in assenza di battito cardiaco), è possibile analizzare i campioni soltanto individualmente.

Questo test non è destinato all'uso per la diagnosi di infezione da WNV.

Riassunto e spiegazione del test

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

Il virus del Nilo Occidentale (West Nile virus, WNV) è un arbovirus (virus trasmesso agli uomini da artropodi) con RNA a singolo filamento a senso positivo. Appartiene alla famiglia dei *Flaviviridae*, genere *Flavivirus*, e al complesso antigenico dell'Encefalite Giapponese (Japanese Encephalitis, JE).^{1,2} Fanno parte del complesso antigenico JE anche il virus dell'encefalite giapponese, il virus dell'encefalite di Saint Louis, il virus dell'encefalite della Murray Valley e il virus Kunjin (ora riconosciuto come una variante del virus WNV).³⁻⁵ Studi filogenetici hanno identificato 2 linee evolutive principali del virus WNV: Lineage 1 e Lineage 2. I ceppi appartenenti al Lineage 1 sono presenti in Africa, India, Australia e nell'emisfero occidentale e sono ritenuti responsabili delle recenti epidemie in Europa, nel bacino del Mediterraneo e nelle Americhe. I ceppi appartenenti al Lineage 2 sono stati individuati nell'Africa subsahariana⁶ e, recentemente, anche in Europa meridionale.^{7,8}

Come gli altri arbovirus, il virus WNV si mantiene in un ciclo enzootico tra insetti ematofagi (zanzare) e ospiti vertebrati suscettibili (uccelli).⁹ Gli uccelli sono gli ospiti vertebrati che svolgono il ruolo di fonte naturale, mentre le zanzare del genere *Culex* sono i principali vettori enzootici del virus WNV. Gli uomini e gli altri mammiferi (ad esempio, i cavalli) sono ospiti casuali e, normalmente, rappresentano un vicolo cieco per il virus perché raramente sviluppano una viremia con titolo sufficientemente elevato da contagiare i vettori artropodi con efficacia.^{2,9,10}

Il virus WNV si è diffuso ampiamente in Africa, Medio Oriente, Europa meridionale, Russia occidentale, Asia sudoccidentale e Australia (sottotipo Kunjin di WNV) perché capace di contagiare numerose specie di zanzare e uccelli.¹ Fino alla metà degli anni '90, in Israele e in Africa venivano raramente segnalate epidemie tra gli uomini, perlopiù associate a fenomeni febbrili di lieve entità.¹ Dalla metà degli anni '90 in poi, nuovi ceppi virali di probabile origine africana hanno provocato un aumento del numero delle infezioni in alcune regioni della Russia e dell'Europa meridionale e orientale, con importanti epidemie, clinicamente sempre più rilevanti, in Romania, Russia, Israele e Grecia.^{1,8,11} Il virus WNV circola ora in molti Paesi dell'emisfero occidentale, ma solo negli Stati Uniti e in Canada è stata riscontrata un'incidenza significativa della patologia negli uomini.^{1,12}

Negli Stati Uniti, il virus WNV è stato identificato per la prima volta nel 1999 nella città di New York. Negli anni successivi si è però diffuso su tutto il territorio nazionale.¹³ Attualmente il virus WNV è endemico in tutti i 48 stati continentali degli USA, oltre che nelle province canadesi.¹ Il virus WNV ha causato 3 delle più gravi epidemie di malattie neuroinvasive arbovirali (encefalite, meningite o paralisi flaccida acuta) mai verificatesi negli Stati Uniti, con circa 3.000 casi di malattie neuroinvasive all'anno nel 2002, nel 2003 e nel 2012.¹ In genere si registra un aumento dell'attività virale nei mesi più caldi dell'anno.¹ Nel 94% dei pazienti con infezione da WNV, infatti, i primi sintomi della malattia si manifestano nei mesi estivi.¹

Secondo alcune stime, tra il 1999 e il 2012 più di 4 milioni di individui sono stati contagiati dal virus WNV negli Stati Uniti.¹ Tra questi, 16.196 individui hanno sviluppato una malattia neuroinvasiva da WNV, 1.549 sono deceduti per cause correlate.¹

Perché utilizzare i test degli acidi nucleici

La possibilità che il virus WNV venga trasmesso mediante trasfusione o trapianto d'organo è emersa per la prima volta nel corso di alcune indagini riguardanti un'epidemia verificatasi negli Stati Uniti nel 2002.^{14,15} Il virus WNV può essere trasmesso per via trasfusionale attraverso i globuli rossi, le piastrine e il plasma fresco congelato, o in seguito ad un trapianto di cuore, rene, fegato o polmone. Le punture delle zanzare restano comunque la principale causa di infezione da WNV.^{1,2,14,16} Potenzialmente il virus WNV potrebbe essere trasmesso anche in seguito al trapianto di cellule progenitrici ematopoietiche. Vi sono stati casi di trasmissione transplacentare e perinatale del virus WNV.¹ Altri rari canali di trasmissione del virus WNV possono essere l'allattamento al seno, la dialisi renale e l'esposizione sul luogo di lavoro, ad esempio sono categorie a rischio gli operatori di laboratorio (esposizione percutanea o congiuntivale) e i lavoratori di aziende avicole.^{1,12} In genere l'infezione assicura immunità per il resto della vita.⁹

La trasmissione del virus WNV mediante trasfusione avviene normalmente nella fase di infezione acuta, quando cioè il donatore infetto è viremico e asintomatico ma non è ancora avvenuta la sieroconversione.¹⁷ Dal momento che solo pochi donatori infetti sviluppano una patologia clinicamente rilevante, l'idea di domandare ai donatori di sangue se di recente abbiano o meno notato sintomi simili a quelli dell'infezione da WNV non è efficace e non consente di identificare i donatori infetti/sieropositivi.^{18,19} I dati raccolti dagli screening dei donatori di sangue indicano che l'infezione da WNV viene trasmessa in modo efficiente anche da donatori con infezione molto recente, che presentano una viremia a basso titolo per WNV e che non hanno ancora sviluppato gli anticorpi anti-WNV.^{9,20} Addirittura donazioni con cariche virali bassissime sono state implicate in casi di trasmissione del virus WNV per via trasfusionale,²¹ pertanto è molto forte la preoccupazione per i pazienti immunocompromessi, i quali sono i beneficiari della maggior parte delle trasfusioni di sangue.²²

Nel 2003 vennero adottati i test degli acidi nucleici (nucleic acid testing, NAT) dell'RNA di WNV su tutto il territorio nazionale.⁹ Nei primi 2 anni di screening del virus WNV con i test NAT delle donazioni di sangue negli Stati Uniti, vennero individuati 1.039 donatori positivi su 27,2 milioni di donazioni totali (0,4 per 10.000 donazioni), con picchi di 1 donatore positivo su 150 in alcune zone interessate da un'epidemia.¹⁸ Lo screening delle donazioni di sangue con i test NAT negli Stati Uniti e in Canada ha praticamente eliminato il rischio di contrarre un'infezione da WNV attraverso una trasfusione.¹ Si ritiene che, tra il 2003 e il 2013, sia stato possibile evitare circa 3.000 infezioni da WNV.²³

Tra i soggetti che contraggono un'infezione da WNV, circa l'80% è asintomatico, il 20-25% sviluppa la febbre del Nilo occidentale^{1,24} e 1 su 150-250 sviluppa una malattia neuroinvasiva.^{1,25} La febbre del Nilo occidentale è caratterizzata dalla comparsa improvvisa di cefalea, malessere, febbre (normalmente bassa), mialgia, brividi, vomito e altri sintomi gastrointestinali, eruzione cutanea, spossatezza e dolore agli occhi. I sintomi possono durare solo qualche giorno o anche settimane o mesi.^{1,24} Le malattie neuroinvasive del Nilo occidentale possono manifestarsi sotto forma di

meningite, encefalite, meningoencefalite o paralisi flaccida acuta, provocare un danno neurologico irreversibile, il coma e perfino il decesso del paziente.^{1,26-31} Le infezioni da WNV sono inoltre associate a miocardite, pancreatite, epatite fulminante, rabdomiolisi, coroitide multifocale, vitrite oculare e instabilità autonoma.¹

Le sequele delle malattie neuroinvasive possono persistere per mesi, o anche per anni, dopo la guarigione dall'infezione acuta. Dopo le dimissioni dall'ospedale, i pazienti con encefalite del Nilo occidentale hanno spesso bisogno di assistenza quotidiana.^{1,31,32} I sintomi neuropsichiatrici, che includono depressione e ansia, oltre a deficit neurocognitivi, possono persistere per mesi, fino a un anno o anche più.^{1,20,33} Nel 10% circa dei casi di malattia neuroinvasiva causata dal virus del Nilo occidentale, l'esito è fatale. Il fattore di rischio principale è l'età avanzata.² Il rischio di mortalità è del 17% dopo i 70 anni, contro lo 0,8% prima dei 40 anni.^{1,33} Altri fattori di rischio di mortalità sono: encefalite con grave debolezza muscolare, stato alterato di coscienza, diabete, malattia cardiovascolare, infezione da virus dell'epatite C e immunosoppressione.^{1,12,33}

Spiegazione del test

Il test **cobas® WNV** è un esame qualitativo che viene eseguito sul **cobas® 6800 System** e sul **cobas® 8800 System**. Il test **cobas® WNV** consente la rilevazione simultanea dell'RNA di WNV e del controllo interno in un unico test, da eseguire su una donazione di plasma individuale infetto, o su un pool di plasma costituito da più donazioni individuali.

Principi della procedura

Il test **cobas® WNV** si basa sulla tecnologia real-time PCR su un sistema totalmente automatizzato 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, stampati in un report oppure inviati a un sistema LIMS (Laboratory Information Management System) o a un altro tipo di sistema per la gestione dei risultati.

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

L'acido nucleico viene estratto simultaneamente dal campione e dall'Armored RNA del controllo interno (IC) aggiunto (che agisce da controllo del processo di preparazione e amplificazione/rilevazione del campione). Inoltre il test utilizza due controlli del kit: un controllo positivo ed un controllo negativo. 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, come l'emoglobina) vengono rimosse con il reagente di lavaggio nei passaggi successivi e l'acido nucleico purificato viene eluito dalle biglie di vetro magnetiche con il tampone di eluizione a temperature elevate.

Per ottenere l'amplificazione selettiva dell'acido nucleico target dal campione del donatore vengono utilizzati dei primer forward e reverse che sono specifici del virus e sono selezionati da regioni altamente conservate dell'acido nucleico virale. Un enzima DNA polimerasi termostabile viene utilizzato sia per la trascrizione inversa che per l'amplificazione. La soluzione Master Mix contiene trifosfato di deossiridina (dUTP) anziché trifosfato di deossitimidina (dTTP), che è incorporato nel DNA appena sintetizzato (amplicone).³⁴⁻³⁶ Tutti gli ampliconi contaminanti che sono stati prodotti da

sessioni di PCR precedenti vengono eliminati dall'enzima AmpErase [uracil-N-glicosilasi], che è contenuto nella Master Mix per PCR, durante il 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 **cobas® WNV** contiene sonde di rivelazione specifiche per gli acidi nucleici del virus WNV e del controllo interno (IC). Ognuna delle sonde di rivelazione specifiche per WNV e IC è marcata con uno dei due fluorocromi univoci, che agiscono da rivelatori (reporter). Ogni sonda include anche un secondo fluorocromo, che agisce da soppressore (quencher). Le misurazioni dei due fluorocromi reporter vengono effettuate a lunghezze d'onda fisse, consentendo così l'identificazione e la discriminazione dei target di WNV amplificato e del controllo interno (IC).^{37,38} Quando non è legato alla sequenza target, il segnale fluorescente delle sonde intatte viene soppresso dal fluorocromo quencher. Nella fase di amplificazione mediante PCR, le sonde ibridizzano con lo stampo specifico di DNA a filamento unico e vengono scisse dall'attività nucleasica in direzione 5'→3' della DNA polimerasi, con la conseguente separazione dei fluorocromi reporter e quencher e la produzione di un segnale fluorescente. Con ogni ciclo di PCR viene generata una quantità crescente di sonde scisse e, parallelamente, si assiste all'aumento del segnale cumulativo del fluorocromo reporter. Poiché le misurazioni dei due fluorocromi reporter avvengono a lunghezze d'onda fisse, è possibile consentire la rilevazione e la discriminazione simultanea dei target amplificati di WNV e controllo interno (IC).

Reagenti e materiali

Reagenti e controlli cobas® WNV

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

Tabella 1 Test cobas® WNV

cobas® WNV			
Conservare a 2-8°C			
Cassetta da 96 test (P/N 07001061190)			
Cassetta da 480 test (P/N 07001070190)			
Componenti del kit	Ingredienti del reagente	Quantità per kit	
		96 test	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.	13 ml	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	13 ml	38 ml
Tampone di eluizione (EB)	Tampone Tris, 0,2% metil-4 idrossibenzoato	13 ml	38 ml
Master Mix Reagente 1 (MMX-R1)	Acetato di manganese, idrossido di potassio, < 0,1% sodio azide	5,5 ml	14,5 ml
WNV Master Mix Reagente 2 (WNV MMX-R2)	Tampone tricina, acetato di potassio, glicerolo, 18% dimetil sulfoxide, Tween 20, EDTA, < 0,06% dATP, dGTP, dCTP, < 0,14% dUTP, < 0,01% primer upstream e downstream di WNV e IC, < 0,01% sonde fluorescenti di WNV, < 0,01% sonda fluorescente IC, < 0,01% aptamero oligonucleotidico, < 0,01% DNA polimerasi Z05D, < 0,01% enzima AmpErase (uracil-N-glicosilasi) (batterico), < 0,1% sodio azide	6 ml	17,5 ml

Tabella 2 cobas® WNV Control Kit

cobas® WNV Control Kit

Conservare a 2-8°C
(P/N 07001118190)

Componenti del kit	Ingredienti del reagente	Quantità per kit	Simbolo di sicurezza e avvertimento*
Controllo positivo WNV (WNV (+) C)	< 0,001% RNA sintetico (armored) di WNV incapsulato in proteina di rivestimento batteriofago MS2, plasma umano normale, RNA di WNV non rilevabile con le metodiche PCR. 0,1% Conservante ProClin® 300**	16 ml (16 × 1 ml)	  ATTENZIONE H317: Può provocare una reazione allergica cutanea. P261: Evitare di respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol. P272: Gli indumenti da lavoro contaminati non devono essere portati fuori dal luogo di lavoro. P280: Indossare guanti protettivi. P333 + P313: In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico. P362 + P364: Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente. P501: Smaltire il prodotto/recipiente in un impianto d'eliminazione dei rifiuti autorizzato. 55965-84-9 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)

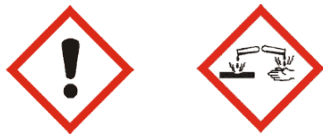
Componenti del kit	Ingredienti del reagente	Quantità per kit	Simbolo di sicurezza e avvertimento*
Controllo negativo di plasma umano normale (NHP-NC)	Plasma umano normale, RNA di WNV non rilevabile con le metodiche PCR. < 0,1% Conservante ProClin® 300**	16 ml (16 × 1 ml)	  ATTENZIONE H317: Può provocare una reazione allergica cutanea. P261: Evitare di respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol. P272: Gli indumenti da lavoro contaminati non devono essere portati fuori dal luogo di lavoro. P280: Indossare guanti protettivi. P333 + P313: In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico. P362 + P364: Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente. P501: Smaltire il prodotto/recipiente in un impianto d'eliminazione dei rifiuti autorizzato. 55965-84-9 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.

Reagenti cobas omni per la preparazione dei campioni

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

Reagenti	Ingredienti del reagente	Quantità per kit	Simbolo di sicurezza e avvertimento**
cobas omni MGP Reagent (MGP) Conservare a 2-8°C (P/N: 06997546190)	Biglie di vetro magnetiche, tampone Tris, 0,1% metil-4 idrossibenzoato, < 0,1% sodio azide	480 test	Non applicabile
cobas omni Specimen Diluent (SPEC DIL) Conservare a 2-8°C (P/N: 06997511190)	Tampone Tris, 0,1% metil-4 idrossibenzoato, < 0,1% sodio azide	4 x 875 ml	Non applicabile
cobas omni Lysis Reagent (LYS) Conservare a 2-8°C (P/N: 06997538190)	42,56% (p/p) guanidina tiocianato***, 5% (p/v) polidocanolo***, 2% (p/v) ditiotreitolo***, citrato di sodio diidrato	4 x 875 ml	 PERICOLO H302 + H332: Nocivo se ingerito o inalato. 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 + P312: IN CASO DI INALAZIONE: trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione. Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI/un medico. P305 + P351 + P338 + P310: IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI/un medico. 593-84-0 Guanidina tiocianato 9002-92-0 Polidocanolo 3483-12-3 (R*,R*)-1,4-dimercapto-2,3-butandiolo
cobas omni Wash Reagent (WASH) Conservare a 15-30°C (P/N: 06997503190)	Citrato di sodio diidrato, 0,1% metil-4 idrossibenzoato	4,2 litri	Non applicabile

* Questi reagenti non sono inclusi nel kit di test **cobas® WNV**. Vedere 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® WNV – 96	2-8°C
cobas® WNV – 480	2-8°C
cobas® WNV 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® WNV – 96	Data non superata	30 giorni dal primo utilizzo	Max 10 sedute	Max 8 ore
cobas® WNV – 480	Data non superata	30 giorni dal primo utilizzo	Max 20 sedute	Max 20 ore
cobas® WNV 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 da utilizzare sui **cobas®** 6800/8800 Systems

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

Strumentazione e software necessari

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

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 (dongle) del 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 software **cobas®** Synergy.

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).^{39,40} Questa procedura deve essere eseguita esclusivamente da personale esperto nella manipolazione di materiale a rischio biologico e nell'uso del test **cobas® WNV**, 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® WNV Control Kit** e **cobas® NHP Negative Control Kit** contengono plasma derivato da sangue umano. L'analisi di plasma umano normale mediante i metodi PCR ha evidenziato l'assenza di RNA di WNV rilevabile. 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.
- Per un corretto svolgimento del test, attenersi scrupolosamente alle procedure e alle linee guida approvate. Qualunque deviazione dalle procedure e dalle linee guida approvate potrebbe compromettere le prestazioni del test.
- Potrebbero essere generati risultati falsi positivi senza un'adeguata prevenzione dell'effetto carryover durante la manipolazione e la preparazione dei campioni.

Manipolazione dei reagenti

- Manipolare tutti i reagenti, i controlli e i campioni seguendo le buone pratiche di laboratorio, al fine di prevenire il carryover dei campioni e dei controlli.
- Prima dell'uso ispezionare visivamente ogni cassetta dei reagenti, del diluente, del reagente di lisi e del reagente di lavaggio per confermare l'assenza di perdite. In caso di perdite accertate, non utilizzare il materiale per il test.
- Il reagente di lisi **cobas omni** contiene guanidina tiocianato, una sostanza chimica potenzialmente pericolosa. Evitare che i reagenti entrino in contatto con la pelle, gli occhi o le mucose. In caso di contatto, lavare immediatamente con abbondante acqua per prevenire possibili ustioni.
- **cobas® WNV** test 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 il reagente di lisi **cobas omni**, contenente guanidina tiocianato, entri in contatto con la soluzione di ipoclorito di sodio (candeggina). L'eventuale miscela potrebbe produrre gas altamente tossici.
- Le schede di sicurezza (Safety Data Sheets, SDS) possono essere richieste al rappresentante Roche locale.
- 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 contenuti nei kit di test **cobas® WNV** e reagenti **cobas omni**. Evitare di contaminare i guanti durante la manipolazione dei campioni e dei controlli.
- Lavare accuratamente le mani dopo avere manipolato i reagenti dei kit e dopo aver rimosso i guanti.
- Pulire e disinfettare accuratamente tutte le superfici di lavoro del laboratorio con una soluzione fresca a base di ipoclorito di sodio allo 0,5% e acqua deionizzata o distillata (candeggina per uso domestico diluita 1:10). Successivamente pulire la superficie con etanolo al 70%.
- In caso di fuoriuscita di liquidi sui **cobas® 6800/8800 Systems**, seguire le istruzioni contenute nel Manuale Operatore dei **cobas® 6800/8800 Systems** per pulire accuratamente e decontaminare la superficie dello strumento (o degli strumenti).

Raccolta, trasporto, conservazione e creazione di pool di campioni

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

Conservare tutti i campioni dei donatori alle temperature indicate.

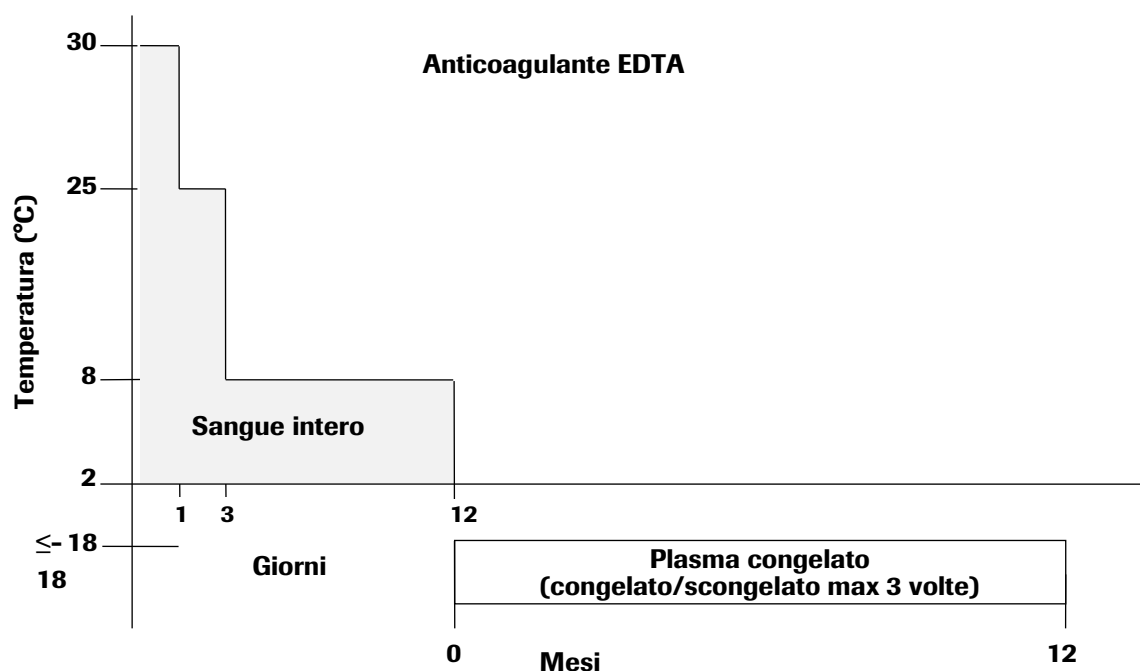
La stabilità dei campioni risente delle temperature elevate.

Campioni di sangue di donatori viventi

- Con il test **cobas® WNV** è possibile utilizzare plasma raccolto in EDTA, CPD, CPDA1, CP2D come anticoagulante. Per la manipolazione e la centrifugazione, attenersi alle istruzioni fornite dal produttore della provetta/sacca di raccolta del campione.
- Il sangue trattato con l'anticoagulante EDTA può essere conservato per un massimo di 12 giorni nelle condizioni descritte di seguito:
 - I campioni devono essere centrifugati entro e non oltre 72 ore dal prelievo.
 - A più di 8°C, i campioni possono essere conservati per 72 ore ad una temperatura massima di 25°C (e per 24 ore ad una temperatura massima di 30°C nell'arco delle 72 ore).

A parte nei casi sopra descritti, i campioni devono essere conservati a 2-8°C. Il plasma separato dalle cellule può inoltre essere conservato per 12 mesi a $\leq -18^{\circ}\text{C}$ con tre cicli di congelamento/scongelo. Vedere la Figura 1.

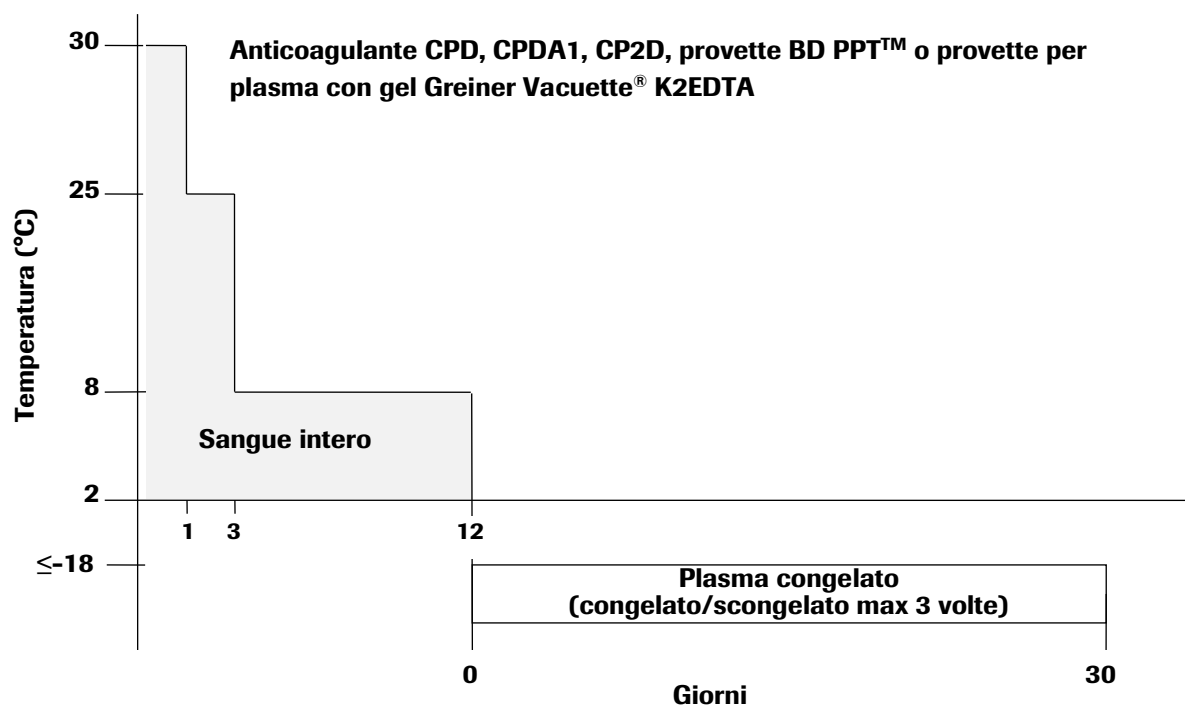
Figura 1 Condizioni di conservazione dei campioni in anticoagulante EDTA



- Il sangue raccolto con gli anticoagulanti CPD, CPDA1 o CP2D, con le provette BD PPT™ (Becton-Dickinson EDTA Plasma Preparation Tubes) o le provette per plasma con gel Greiner Vacuette® K2EDTA 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.
 - A più di 8°C, i campioni possono essere conservati per 72 ore ad una temperatura massima di 25°C (e per 24 ore ad una temperatura massima di 30°C nell'arco delle 72 ore).

A parte nei casi sopra descritti, i campioni devono essere conservati a 2-8°C. Il plasma separato dalle cellule può inoltre essere conservato per 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 da donatori viventi

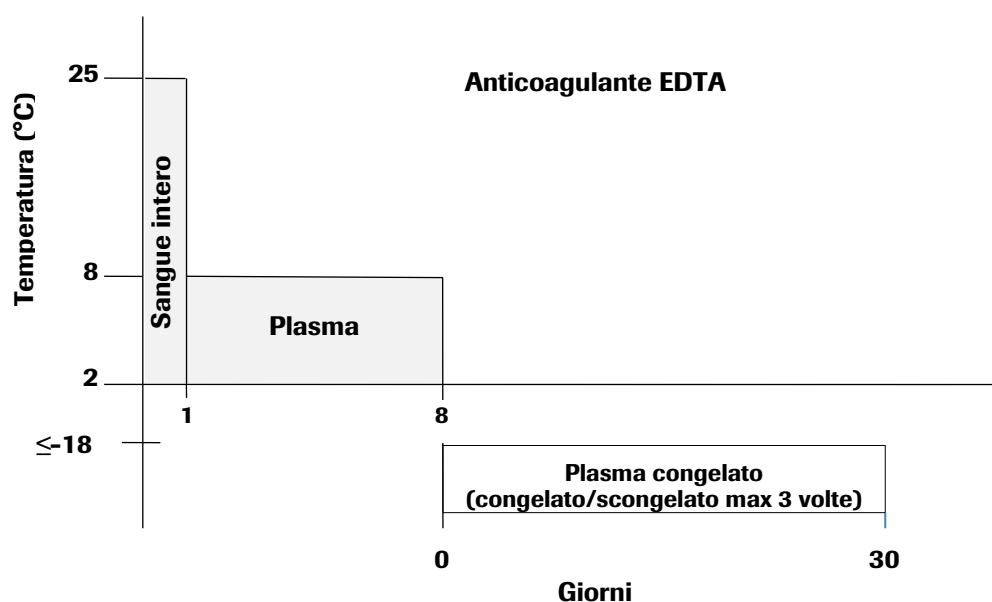


Campioni di sangue da donatori non viventi

- Con il test **cobas® WNV** è possibile utilizzare campioni di sangue cadaverico raccolti in provette con l'anticoagulante EDTA e/o in provette da siero. Per la manipolazione e la centrifugazione, attenersi alle istruzioni fornite dal produttore della provetta/sacca di raccolta del campione.
- Il sangue cadaverico trattato con l'anticoagulante EDTA può essere conservato per un massimo di 8 giorni a 2-8°C, nelle condizioni descritte di seguito:
 - I campioni devono essere centrifugati e il plasma deve essere separato dalle cellule entro 24 ore dal prelievo.
 - Se conservati a più di 8°C, i campioni sono stabili per 24 ore fino a 25°C.

A parte nei casi sopra descritti, i campioni cadaverici di plasma EDTA separato dalle cellule può inoltre essere conservato fino a 30 giorni a $\leq -18^{\circ}\text{C}$, con un massimo di tre cicli di congelamento/scongelo. Vedere la Figura 3.

Figura 3 Condizioni di conservazione dei campioni di sangue cadaverico



- È possibile conservare i campioni di sangue cadaverico raccolto in provette da siero per un massimo di 4 giorni a 2-8°C, nelle condizioni descritte di seguito:
 - I campioni devono essere centrifugati e il siero deve essere separato dalle cellule entro 24 ore dal prelievo.
 - A più di 8°C, i campioni possono essere conservati per 4 ore ad una temperatura massima di 25°C nell'arco di 24 ore.

A parte nei casi sopra descritti, il siero separato dalle cellule può inoltre essere conservato fino a 14 giorni a $\leq -18^{\circ}\text{C}$, con un massimo di tre cicli di congelamento/scongelo.

- Per l'eventuale spedizione, i campioni di donatori viventi e/o non viventi devono essere imballati ed etichettati nel modo previsto dai regolamenti nazionali e/o internazionali per il trasporto di campioni e agenti eziologici.

Istruzioni per l'uso

Pipettamento automatico dei campioni e creazione di pool (opzionale)

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

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

Note sulla procedura

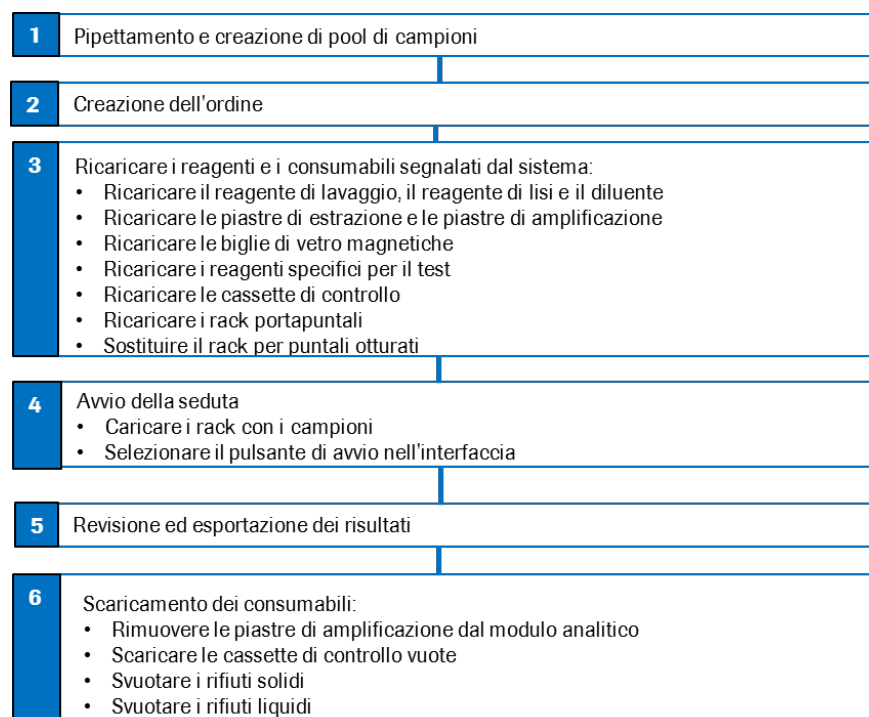
- Non utilizzare i reagenti **cobas® WNV Test**, **cobas® WNV Control Kit**, **cobas® NHP Negative Control Kit** o **cobas omni** oltre la data di scadenza.
- Non riutilizzare i consumabili. Sono esclusivamente monouso.
- Per informazioni sulla corretta manutenzione degli strumenti, consultare il Manuale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

Esecuzione del test cobas® WNV

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 4 è illustrata una sintesi della procedura.

Figura 4 Procedura del test **cobas® WNV**



Risultati

I cobas® 6800/8800 Systems identificano l'RNA di WNV in modo automatico e simultaneo per i campioni e i controlli.

Controllo di qualità e validità dei risultati

- Insieme ad ogni batch vengono analizzati un controllo negativo [(-) C] e un controllo positivo [WNV (+) 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
WNV (+) C	Q02	Invalid	L'intero batch è considerato non valido se il risultato del controllo WNV (+) 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 i controlli positivi e il controllo negativo del batch corrispondente.

Per ogni campione vengono misurati simultaneamente due parametri: WNV e controllo interno. I risultati finali del test **cobas**® WNV per i campioni sono visualizzati nel software. Oltre ai risultati generali, nel software **cobas**® 6800/8800 vengono visualizzati anche i risultati dei singoli target, che dovranno essere interpretati applicando i seguenti criteri:

Tabella 10 Risultati per i singoli target e relativa interpretazione

Risultati dei target	Interpretazione
Non reattivi a WNV	Nessun segnale rilevato per il target WNV; segnale IC rilevato.
Reattivi a WNV	Rilevato il segnale per il target WNV; segnale IC rilevato o non rilevato.
Non validi	Segnali del target e IC non rilevati.

Limiti della procedura

- Il test **cobas**® WNV è stato valutato soltanto in combinazione con i prodotti **cobas**® WNV 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 WNV 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 (come l'età e la presenza di sintomi), nonché 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**® WNV 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 di donatori viventi)

Limite di sensibilità (LoD)

Standard secondario Roche/Isolato virale

I limiti di sensibilità (limits of detection, LoD) del test cobas® WNV per l'RNA del Lineage 1 e del Lineage 2 di WNV sono stati calcolati utilizzando il seguente standard:

- Standard secondario Roche WNV Lineage 1, calibrato in base all'Health Canada WNV Reference Standard (Infectious Diseases, Canadian Blood Services, 1800 Alta Vista, Ottawa, Ontario, K1G 4J5)
- Isolato WNV Lineage 2 ISS0513, fornito dal Centro per la Ricerca e la Valutazione dei prodotti Immunobiologici, Istituto Superiore di Sanità (ISS), Roma, Italia⁴¹

Per lo standard secondario Roche, sono state preparate tre serie di diluizioni indipendenti di WNV Lineage 1 con plasma-EDTA umano normale WNV-negativo. Ogni serie di diluizione è stata analizzata utilizzando tre diversi lotti del kit cobas® WNV con 21 repliche per lotto, per un totale di 189 repliche per concentrazione.

Per l'isolato di WNV Lineage 2, i pannelli sono stati preparati diluendo il materiale stock in plasma-EDTA umano normale WNV-negativo. Ogni serie di diluizione è stata analizzata utilizzando tre diversi lotti del kit cobas® WNV con otto repliche per lotto, per un totale di 72 repliche per concentrazione.

Per i virus WNV Lineage 1 e 2, l'analisi PROBIT 95% (Tabella 11) e l'analisi PROBIT 50% (Tabella 12) eseguite sui dati combinati tra le serie di diluizioni e i lotti di reagenti hanno permesso di effettuare una stima del limite di sensibilità (LoD) e di calcolare il limite inferiore e superiore degli intervalli di confidenza al 95%. Le percentuali di reattività osservate negli studi sul limite di sensibilità dedicati ai Lineage 1 e 2 sono sintetizzate dalla Tabella 13 alla Tabella 14.

Tabella 11 Risultati dell'analisi PROBIT 95% sui dati LoD raccolti con lo standard virale in plasma con EDTA

Analita	Unità di misura	LoD	Limite inferiore di confidenza al 95%	Limite superiore di confidenza al 95%
WNV Lineage 1	copie/ml	12,9	10,8	16,3
WNV Lineage 2	copie/ml	6,2	4,8	8,9

Tabella 12 Risultati dell'analisi PROBIT 50% sui dati LoD raccolti con lo standard virale in plasma con EDTA

Analita	Unità di misura	LoD	Limite inferiore di confidenza al 95%	Limite superiore di confidenza al 95%
WNV Lineage 1	copie/ml	2,1	1,9	2,4
WNV Lineage 2	copie/ml	1,1	0,8	1,3

Tabella 13 Riepilogo delle percentuali di reattività al Lineage 1 di WNV in plasma con EDTA

Concentrazione RNA WNV (copie/ml)	N. reattivi	N. ripetizioni valide	% reattivi	Limite inferiore di confidenza al 95% (monolaterale)
18,0	187	188	99,5%	97,5%
9,0	173	188	92,0%	88,0%
4,5	139	188	73,9%	68,1%
2,7	93	189	49,2%	43,0%
0,9	53	189	28,0%	22,7%

Tabella 14 Riepilogo delle percentuali di reattività al Lineage 2 di WNV in plasma con EDTA

Concentrazione RNA WNV (copie/ml)	N. reattivi	N. ripetizioni valide	% reattivi	Limite inferiore di confidenza al 95% (monolaterale)
22,8	72	72	100,0%	95,9%
15,2	72	72	100,0%	95,9%
7,6	69	72	95,8%	89,6%
3,8	64	72	88,9%	80,8%
2,3	53	72	73,6%	63,7%
0,8	30	72	41,7%	31,8%

Riproducibilità

La riproducibilità del test **cobas**® WNV sui **cobas**® 6800/8800 Systems è stata determinata utilizzando lo standard secondario Roche per WNV Lineage 1. Lo studio prevedeva l'analisi di tre pannelli di WNV a concentrazioni di circa 18, 9 e 4,5 copie/ml. Sono stati eseguiti i test per le seguenti componenti di variabilità:

- variabilità tra giorni (su tre giorni)
- variabilità tra lotti (con tre diversi lotti di reagenti del test **cobas**® WNV)
- variabilità tra strumenti (con tre diversi **cobas**® 8800 Systems)

Con ognuno dei tre pannelli sono stati effettuati 21 test, per un totale di 189 repliche 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 WNV che sono stati analizzati nell'arco di giorni, con tre lotti di reagenti e su tre diversi **cobas**® 8800 Systems. Il test **cobas**® WNV è riproducibile su più giorni, lotti di reagenti e strumenti. I risultati riguardanti la variabilità tra lotti di reagenti sono sintetizzati nella Tabella 15.

Tabella 15 Riepilogo della riproducibilità tra lotti di reagenti per il test **cobas**® WNV

Analita	Concentrazione (copie/ml)	Lotto di reagenti	% reattivi (test reattivi/validi)	Limite inferiore dell'intervallo di confidenza al 95%	Limite superiore dell'intervallo di confidenza al 95%
WNV	18,0	1	98,4% (62/63)	91,5%	100,0%
		2	100% (63/63)	94,3%	100,0%
		3	100% (63/63)	94,2%	100,0%
	9,0	1	92,1% (58/63)	82,4%	97,4%
		2	98,4% (62/63)	91,5%	100,0%
		3	85,5% (53/62)	74,2%	93,1%
	4,5	1	64,5% (40/62)	51,3%	76,3%
		2	77,8% (49/63)	65,5%	87,3%
		3	79,3% (50/63)	67,3%	88,5%

Inclusività

Per quanto riguarda la determinazione delle varianti di flavivirus di WNV, le prestazioni del test **cobas® WNV** sono state valutate utilizzando, per ogni variante, isolati univoci da coltura. In totale sono stati analizzati 10 isolati positivi da coltura di Lineage 1 di WNV, dopo la diluizione con plasma umano normale, negativo al virus (WNV), in EDTA, ad una concentrazione di circa 36 copie/ml. Tutti e 10 i campioni da coltura sono stati identificati (Tabella 16).

Per le varianti di flavivirus di WNV, sono stati analizzati 2 isolati positivi da coltura del virus dell'encefalite giapponese (JEV), con 4 ripetizioni, dopo la diluizione con plasma umano normale, negativo al virus (WNV), in EDTA. In totale è stato analizzato un isolato positivo da coltura per ciascun virus: encefalite di Saint Louis (SLEV), encefalite della Murray Valley (MVEV) e virus Kunjin (KUNV). Sono state eseguite quattro repliche per ogni isolato, dopo la preparazione di diluizioni logaritmiche con plasma-citrato umano normale WNV-negativo. Tutti gli isolati sono stati identificati (Tabella 17).

Tabella 16 Isolati da coltura di Lineage 1 di WNV

Varianti di flavivirus	Concentrazione (copie/ml)	% reattivi (n. reattivi/n. campioni analizzati)
WNV 1	36	100,0% (10/10)

Tabella 17 Isolati da coltura di varianti di flavivirus di WNV

Diluizione del campione	% reattivi (n. reattivi/n. ripetizioni valide analizzate)			
	JEV	SLEV	MVEV	KUNV
1:1.00E+02	100% (8/8)	100% (4/4)	100% (4/4)	100% (4/4)
1:1.00E+03	100% (8/8)	100% (4/4)	100% (4/4)	100% (4/4)
1:1.00E+04	100% (8/8)	100% (4/4)	100% (4/4)	100% (4/4)
1:1.00E+05	100% (8/8)	100% (4/4)	100% (4/4)	100% (4/4)
1:1.00E+06	100% (8/8)	100% (4/4)	100% (4/4)	100% (4/4)
1:1.00E+07	100% (8/8)	100% (4/4)	100% (4/4)	100% (4/4)

Specificità analitica

La specificità analitica del test **cobas®** WNV è stata valutata analizzando la reattività crociata con 27 microrganismi presenti in concentrazioni di 10^6 particelle, copie o PFU/ml, costituiti da 20 isolati virali, sei ceppi batterici e un isolato di lievito (Tabella 18). I microrganismi sono stati aggiunti a plasma umano normale, negativo al virus (WNV), in EDTA. I test sono stati eseguiti sia senza l'aggiunta del virus WNV, sia con l'aggiunta del virus WNV ad una concentrazione approssimativa di 3 x LoD del test **cobas®** WNV. I microrganismi analizzati non hanno causato reazioni crociate o interferenze con il test **cobas®** WNV.

Tabella 18 Microrganismi analizzati ai fini della specificità analitica

Virus	Flavivirus	Batteri	Lieviti
Adenovirus 5	Dengue Virus type 1	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i>
Cytomegalovirus	Usutu Virus*	<i>Propionibacterium acnes</i>	
Epstein-Barr Virus		<i>Staphylococcus aureus</i>	
Herpes Simplex Virus type 1		<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
Herpes Simplex Virus type 2		<i>Streptococcus viridans</i>	
Hepatitis A Virus		<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	
Hepatitis B Virus			
Hepatitis C Virus			
Hepatitis E Virus			
Hepatitis G Virus			
Human Immunodeficiency Virus (HIV-1 Group M)			
Human Immunodeficiency Virus (HIV-2)			
Human T-cell Lymphotropic Virus type I			
Human T-cell Lymphotropic Virus type II			
Human Herpes Virus 6 B			
Influenza Virus A			
Chikungunya Virus			
Varicella Zoster Virus			

* Rilevata reattività crociata senza aggiunta di WNV, dovuta ad omologia con la sequenza nucleotidica di WNV. Il test **cobas®** WNV potrebbe essere interessato da reazioni crociate con virus clinicamente importanti, appartenenti alla famiglia dei *Flaviviridae*.

I campioni di plasma provenienti da ognuno di questi stati patologici (Tabella 19) sono stati analizzati senza l'aggiunta del virus WNV e con l'aggiunta del virus WNV ad una concentrazione approssimativa di 3 x LoD del test **cobas®** WNV. Questi stati patologici non hanno causato reazioni crociate o interferenze con il test **cobas®** WNV.

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

Stato patologico		
Adenovirus type 5	Hepatitis A Virus	Human T-cell Lymphotropic Virus type II
Cytomegalovirus	Hepatitis B Virus	Herpes Simplex Virus type 1
Dengue Virus	Hepatitis C Virus	Herpes Simplex Virus type 2
Epstein-Barr Virus	Human T-cell Lymphotropic Virus type I	Human Immunodeficiency Virus (HIV-1)

Specificità analitica e sostanze interferenti

Sostanze interferenti di tipo endogeno

Campioni di plasma contenenti livelli patologicamente elevati di trigliceridi (fino a 35,3 g/l), emoglobina (fino a 4,7 g/l), bilirubina non coniugata (fino a 0,21 g/l), albumina (fino a 61,3 g/l) e DNA umano (fino a 0,004 g/l) sono stati analizzati senza l'aggiunta del virus WNV e con l'aggiunta del virus WNV ad una concentrazione pari a circa 3 x LoD del test **cobas® WNV**. Queste sostanze endogene non hanno interferito con la sensibilità e la specificità del test **cobas® WNV**.

Sostanze interferenti di tipo esogeno

Campioni di plasma umano normale, negativo al virus WNV, in EDTA, contenenti concentrazioni eccezionalmente elevate di principi attivi (Tabella 20) sono stati analizzati senza l'aggiunta del virus WNV e con l'aggiunta del virus WNV ad una concentrazione 3 x LoD del test **cobas® WNV**. Queste sostanze esogene non hanno interferito con la sensibilità e la specificità del test **cobas® WNV**.

Tabella 20 Campioni clinici analizzati con vari principi attivi

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

Correlazione

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

Le prestazioni del test **cobas® WNV** e del test **cobas® TaqScreen WNV** sono state messe a confronto utilizzando 100 campioni di plasma singoli, in EDTA, positivi ai test NAT, in forma sia non diluita che diluita 1:6. Sono stati inoltre analizzati 100 campioni di plasma in EDTA, negativi al virus WNV, in forma non diluita con entrambi i metodi.

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

Per quanto riguarda i campioni positivi, i due metodi hanno prodotto risultati concordanti in base al test di McNemar, a dimostrazione del fatto che le prestazioni del test **cobas® WNV** e del test **cobas® TaqScreen WNV** sono equivalenti (Tabella 21).

Tabella 21 Correlazione dei campioni positivi

Metodi		Risultati WNV	
Test cobas® TaqScreen WNV	Test cobas® WNV	Non diluito	Diluito 1:6
Non reattivi	Non reattivi	0	0
Reattivi	Non reattivi	0	1*
Non reattivi	Reattivi	0	1*
Reattivi	Reattivi	100	98
Totale		100	100
Test di McNemar, valore p (bilaterale, $\alpha = 0,05$)		1,0	1,0

* Lo stesso campione, analizzato in forma non diluita (< 100 cp/ml dal National Genetic Institute, con il saggio SuperQuant per RNA di WNV), è risultato reattivo con entrambi i test.

Tasso globale d'errore del sistema

Il tasso globale d'errore del sistema per il test **cobas® WNV** è stato calcolato ripetendo 100 test su campioni di plasma in EDTA, arricchiti con WNV. I campioni sono stati analizzati ad una concentrazione del target approssimativamente 3 x LoD e in pool costituiti da 1 solo campione (non diluito). Per questo studio sono stati utilizzati il **cobas® 8800 System** e il **cobas p 680 instrument** (pipettamento e creazione di pool).

Lo studio dimostra che tutte le ripetizioni dei test hanno prodotto risultati reattivi al virus WNV, 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%].

Caratteristiche delle prestazioni (campioni cadaverici)

Sensibilità

La sensibilità clinica del test **cobas**® WNV con riferimento all'RNA di WNV è stata valutata analizzando in totale 60 campioni cadaverici individuali, negativi al virus. Di questi, 35 campioni individuali erano classificati come moderatamente emolizzati (colore dal giallo paglierino al rosa) e 25 campioni individuali erano classificati come fortemente emolizzati (colore dal rosso al marrone). Inoltre sono stati analizzati altri 60 campioni da donatori viventi negativi al virus. Tutti i campioni dei donatori viventi e non viventi sono stati ripartiti equamente tra tre lotti di reagenti, costituendo cinque gruppi di spiking dei campioni clinici (per WNV), con 12 campioni per ogni gruppo. Ogni campione di donatori viventi e non viventi è stato arricchito con un campione clinico univoco (WNV) a circa 5 volte il limite di sensibilità ($5 \times \text{LoD}$) del campione corrispondente. Ogni campione cadaverico è stato diluito a 1:5,6 con **cobas omni** Specimen Diluent sullo strumento, quindi è stato analizzato con la procedura prevista per i test sui campioni cadaverici.

In tutti i campioni di donatori viventi e non viventi è stato riscontrato un tasso di reattività del 100% (intervallo di confidenza al 95%: 94,0-100%). La sensibilità clinica osservata nei campioni cadaverici è risultata equivalente alla sensibilità osservata nei campioni di donatori viventi, calcolata con il metodo esatto di Fisher e sintetizzata nella Tabella 22.

Tabella 22 Sintesi del tasso di reattività nei campioni di plasma in EDTA da donatori viventi e non viventi

Analita	Campioni di donatori non viventi	Campioni di donatori viventi
	% reattivi (numero di campioni reattivi/ numero di campioni analizzati)	% reattivi (numero di campioni reattivi/ numero di campioni analizzati)
WNV	100% (60/60)	100% (60/60)
Metodo esatto di Fisher, valore p ($\alpha = 0,05$)	Nessuna differenza significativa nei tassi di reattività ($p = 1,000$)	

Specificità

Per definire la specificità del test **cobas**® WNV con i campioni cadaverici di plasma-EDTA e di siero, è stato effettuato un confronto rispetto alla specificità con i campioni dei donatori viventi. A tal fine, sono state analizzate singole repliche di 64 campioni cadaverici di plasma-EDTA, di cui 40 campioni individuali classificati come moderatamente emolizzati (colore da paglierino a rosa) e 24 campioni individuali classificati come fortemente emolizzati (colore da rosso a marrone); 62 campioni cadaverici individuali di siero, di cui 42 campioni individuali classificati come moderatamente emolizzati e 20 campioni individuali classificati come fortemente emolizzati; 60 campioni individuali di plasma da donatori viventi siero-negativi; 60 campioni individuali di siero da donatori viventi. Lo studio è stato eseguito con tre lotti di reagenti indipendenti del test **cobas**® WNV. Ogni campione cadaverico è stato diluito a 1:5,6 con **cobas omni** Specimen Diluent sullo strumento, quindi è stato analizzato con la procedura prevista per i test sui campioni cadaverici. Tutti i campioni di plasma-EDTA e di siero da donatori viventi e non viventi sono risultati non reattivi, per una specificità del 100%. La specificità osservata nei campioni cadaverici è risultata equivalente alla specificità osservata nei campioni di donatori viventi, calcolata con il metodo esatto di Fisher ($\alpha = 0,05$) e sintetizzata nella Tabella 23.

Tabella 23 Riepilogo della specificità con campioni di plasma-EDTA e di siero da donatori viventi e non viventi

Matrici	Tipo di campione	N. non reattivi	N. campioni validi	% non reattivi	Intervallo di confidenza al 95% bilaterale
Plasma in EDTA	Donatore non vivente	64	64	100%	94,4% - 100,0%
	Donatore vivente	60	60	100%	94,0% - 100,0%
Siero	Donatore non vivente	62	62	100%	94,2% - 100,0%
	Donatore vivente	60	60	100%	94,0% - 100,0%
Risultati complessivi con il metodo esatto di Fisher ($\alpha = 0,05$)		La specificità per i campioni di donatori viventi e non viventi è la stessa: Metodo esatto di Fisher, $p = 1,000$			

Riproducibilità

La riproducibilità del test **cobas® WNV** sui **cobas® 6800/8800 Systems** è stata determinata utilizzando 20 campioni cadaverici di plasma-EDTA (moderatamente e fortemente emolizzati), arricchiti con lo standard secondario Roche per l'RNA di WNV fino a circa 5 volte il limite di sensibilità (5 x LoD) del test **cobas® WNV**. I risultati sono stati confrontati con i risultati di riproducibilità ottenuti con 20 campioni di plasma-EDTA da donatori viventi, arricchiti con lo standard secondario Roche fino a circa 5 volte il limite di sensibilità (5 x LoD) del test **cobas® WNV**.

Sono stati eseguiti i test per le seguenti componenti variabili:

- variabilità tra giorni (su 6 giorni)
- variabilità tra lotti (con tre diversi lotti di reagenti del test **cobas® WNV**)

È stata eseguita una replica con ciascuno dei 3 lotti di reagenti su un periodo di 6 giorni, per un totale di 18 repliche per ogni campione di donatore vivente e non vivente. Ogni campione cadaverico è stato diluito a 1:5,6 con **cobas omni** Specimen Diluent sullo strumento, quindi è stato analizzato con la procedura prevista per i test sui campioni cadaverici. Tutti i dati validi sulla riproducibilità sono stati valutati confrontando i tassi di reattività dei donatori viventi e dei campioni cadaverici (intervalli di confidenza al 95% bilaterali) tenendo conto di tutte le componenti variabili. È stato calcolato il valore p del metodo di Fisher esatto ai fini del test di significatività statistica della differenza tra le proporzioni dei risultati di reattività osservati con i campioni cadaverici e con i campioni di donatori viventi. Non sono state osservate differenze significative.

Il test **cobas® WNV** è riproducibile su più giorni e lotti di reagenti, con campioni di donatori viventi e non viventi indifferentemente. I risultati riguardanti la variabilità tra lotti di reagenti sono sintetizzati nella Tabella 24.

Tabella 24 Sintesi della riproducibilità tra lotti di reagenti del test **cobas® WNV**, con campioni di donatori viventi e non viventi

Analita	Lotto di reagenti	Tipo di campione	% reattivi (test reattivi/validi)	Limite inferiore dell'intervallo di confidenza al 95%	Limite superiore dell'intervallo di confidenza al 95%	Differenza rilevante con il metodo esatto di Fisher ($\alpha = 0,05$)
WNV	1	Non vivente	100,0% (120/120)	97,0%	100,0%	Valore p = 1,0000
		Donatore vivente	100,0% (120/120)	97,0%	100,0%	
	2	Non vivente	100,0% (120/120)	97,0%	100,0%	Valore p = 1,0000
		Donatore vivente	100,0% (120/120)	97,0%	100,0%	
	3	Non vivente	100,0% (120/120)	97,0%	100,0%	Valore p = 1,0000
		Donatore vivente	100,0% (120/120)	97,0%	100,0%	

Valutazione delle prestazioni cliniche

Sensibilità clinica: analisi dei campioni con positività accertata per il virus del Nilo occidentale

La sensibilità clinica del test **cobas® WNV** è stata valutata utilizzando 530 campioni clinici individuali con positività confermata dai test NAT. Lo studio ha coinvolto quattro laboratori di analisi, in ognuno dei quali sono stati analizzati 135 campioni circa, sia non diluiti che diluiti 1:6, utilizzando tre lotti diversi del kit **cobas® WNV**. È stato necessario escludere dalle analisi statistiche 17 campioni clinici individuali dei 530 iniziali, così come previsto dal protocollo, perché non rispondenti ai criteri di inclusione per la carica virale di WNV. Pertanto i campioni analizzati sono stati 513 ma, poiché per due campioni non diluiti non è stato ottenuto nessun risultato valido, l'analisi ha riguardato in totale 511 campioni non diluiti. Tutti i 513 campioni diluiti hanno prodotto risultati validi.

In questo studio, la sensibilità del test **cobas® WNV** con i campioni non diluiti è stata del 100% (intervallo di confidenza al 95%: tra il 99,3% e il 100%), mentre con i campioni diluiti (1:6) è stata del 98,8% (intervalli di confidenza al 95%: tra il 97,5% e il 99,5%) (Tabella 25). I sei campioni diluiti non reattivi erano stati ottenuti da campioni non diluiti con titoli virali bassi.

Tabella 25 Sensibilità clinica dei campioni con positività accertata per il virus del Nilo occidentale

	N. di campioni analizzati	N. di campioni reattivi	N. di campioni non reattivi	Sensibilità (%)	Sensibilità (intervallo di confidenza al 95%)	
					Limite inferiore	Limite superiore
Non diluiti	511*	511	0	100	99,3	100
1:6	513	507	6	98,8%	97,5	99,5

*Per due dei campioni non diluiti non è stato ottenuto un risultato valido.

Specificità clinica

La specificità clinica del test **cobas® WNV** è stata valutata analizzando donazioni di sangue selezionate in modo random presso quattro laboratori esterni. Sono stati analizzati campioni individuali e pool costituiti da sei campioni. Nello studio sono stati utilizzati tre diversi lotti di reagenti **cobas® WNV**. La specificità clinica del test **cobas® WNV** è stata calcolata come percentuale (intervallo di confidenza al 95% bilaterale) dei donatori con stato di donazione WNV negativo che sono risultati non reattivi per il test **cobas® WNV**. Le donazioni valutabili sono state 63.243 dai test in pool e 10.823 dai test individuali.

Risultati dei test in pool

La Tabella 26 mostra il calcolo della specificità clinica del test **cobas® WNV** per i 63.243 donatori valutabili dai test in pool. In questo studio, la specificità clinica del test **cobas® WNV** con i campioni in pool è stata del 100,000% (63.243 su 63.243; intervallo di confidenza al 95%: tra 99,994% e 100,000%).

Tabella 26 Specificità clinica del test **cobas® WNV**: test in pool

Risultato cobas® WNV	Stato donazione WNV*		Totale
	Positivi	Negativi	
Reattivi per WNV	0	0	0
Non reattivi per WNV	0	63243	63243
Totale	0	63243	63243
Specificità clinica (IC 95%)	-	100,000% (99,994%, 100,000%)	-

* Lo stato della donazione WNV è stato assegnato in base a un algoritmo dei pattern di reattività al test in occasione della prima donazione e, se disponibili, nelle donazioni successive.

La specificità dei test in pool **cobas® WNV** per le prime donazioni è stata del 100,000% (10.573 su 10.573; intervallo di confidenza al 95%: tra 99,964% e 100,000%). Nessuno dei 10.573 pool di sei campioni è risultato reattivo per **cobas® WNV**. Per i risultati dei pool di campioni è stata rilevata una percentuale di non validità pari all'1,6%, imputabile ad errori dello strumento o del controllo interno.

Risultati dei test individuali

La Tabella 27 mostra il calcolo della specificità clinica del test **cobas® WNV** per i 10.823 donatori valutabili dai test individuali. In questo studio, la specificità clinica del test **cobas® WNV** con i campioni individuali è stata del 100,000% (10.823 su 10.823; intervallo di confidenza al 95%: tra 99,965% e 100,000%). Per i risultati dei campioni individuali è stata rilevata una percentuale di non validità pari allo 0,3%, imputabile al controllo interno, ad errori dello strumento, a deviazioni dal protocollo o ad altri inconvenienti.

Tabella 27 Specificità clinica del test **cobas® WNV**: test individuali

Risultato cobas® WNV	Stato donazione WNV*		Totale
	Positivi	Negativi	
Reattivi per WNV	0	0	0
Non reattivi per WNV	0	10823	10823
Totale	0	10823	10823
Specificità clinica (IC 95%)		100,000% (99,965%, 100,000%)	

* Lo stato della donazione WNV è stato assegnato programmaticamente in base agli schemi di reattività al test in occasione della prima donazione e, se disponibili, nelle donazioni successive.

Riproducibilità

La riproducibilità del test **cobas® WNV** per l'uso sui **cobas® 6800/8800 Systems** è stata determinata analizzando un pannello di otto componenti: due campioni di plasma negativi e due campioni positivi per WNV a tre diverse concentrazioni (circa 0,5, 1,0 e 3,0 volte il valore LoD del test **cobas® WNV**).

Presso ciascuno dei tre siti con il **cobas® 8800 System**, gli operatori hanno eseguito cinque giornate di test con ognuno dei tre lotti di reagenti **cobas® WNV**, completando due sedute valide (cioè due batch, batch = un pannello + due controlli) in ogni giornata, totalizzando così 180 test per ogni tipo di virus del componente del pannello a ognuna delle tre concentrazioni.

Tutti i batch e i risultati dei test validi sono stati analizzati calcolando la percentuale dei risultati di reattività al test per ogni componente del pannello (Tabella 28). Lo studio dimostra che il test **cobas® WNV** per l'uso sui **cobas® 6800/8800 Systems** offre prestazioni riproducibili per l'identificazione del virus WNV con tutte le variabili esaminate (lotto, sito/strumento, giornata, batch e nello stesso batch).

Tabella 28 Risultati del test sintetizzati in base a sito, lotto, giornata e batch (componenti del pannello positivi)

Target virale	Concentrazione della carica virale	Sito		Lotto		Giorno		Batch	
		ID	% risultati positivi	ID	% risultati positivi	ID	% risultati positivi	ID	% risultati positivi
WNV	0,5 x LoD	1	86,7% (52/60)	1	85,0% (51/60)	1	94,4% (34/36)	1	81,1% (73/90)
		2	90,0% (54/60)	2	91,7% (55/60)	2	72,2% (26/36)	2	91,1% (82/90)
		3	81,7% (49/60)	3	81,7% (49/60)	3	88,9% (32/36)	-	-
		-	-	-	-	4	86,1% (31/36)	-	-
		-	-	-	-	5	88,9% (32/36)	-	-
	1,0 x LoD	1	95,0% (57/60)	1	96,7% (58/60)	1	86,1% (31/36)	1	93,3% (83/89)
		2	100,0% (59/59)	2	88,3% (53/60)	2	94,4% (34/36)	2	92,2% (83/90)
		3	83,3% (50/60)	3	93,2% (55/59)	3	94,3% (33/35)	-	-
		-	-	-	-	4	94,4% (34/36)	-	-
		-	-	-	-	5	94,4% (34/36)	-	-
	3,0 x LoD	1	98,3% (59/60)	1	98,3% (59/60)	1	100,0% (36/36)	1	98,9% (89/90)
		2	100,0% (60/60)	2	100,0% (60/60)	2	100,0% (36/36)	2	100,0% (90/90)
		3	100,0% (60/60)	3	100,0% (60/60)	3	97,2% (35/36)	-	-
		-	-	-	-	4	100,0% (36/36)	-	-
		-	-	-	-	5	100,0% (36/36)	-	-

Informazioni supplementari

Caratteristiche del test

Tipo di campione	Plasma e siero
Quantità minima di campione necessaria per un donatore vivente	1000 µl
Quantità di campione analizzato per un donatore vivente	850 µl
Quantità minima di campione necessaria per un donatore non vivente	300 µl
Quantità di campione analizzato per un donatore non vivente	150 µl
Durata del test	I risultati sono disponibili in meno di 3 ore e mezza dal caricamento del campione sul sistema.

Simboli

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

Tabella 29 Simboli utilizzati sulle etichette dei prodotti diagnostici PCR di Roche

	Software ausiliario		Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i>
	Mandatario nella Comunità Europea		Limite inferiore dell'intervallo assegnato
	Foglio di dati del barcode		Fabbricante
	Codice del batch		Conservare al buio
	Rischio biologico		Contenuto sufficiente per $<n>$ test
	Numero di catalogo		Limiti di temperatura
	Consultare le istruzioni per l'uso		File di definizione del test
	Contenuto del kit		Limite superiore dell'intervallo assegnato
	Distribuito da		Utilizzare entro la data
	Solo per valutazione delle prestazioni IVD		Global Trade Item Number
Rx Only	Solo USA: la legge federale statunitense limita la vendita di questo dispositivo ai medici o su presentazione di prescrizione medica.		Data di produzione

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

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

Produttore e distributori

Tabella 30 Produttore e distributori



Fabbricato negli USA

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

Made in USA



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 e 10358675) e dagli omologhi stranieri di ognuno.

COBAS, COBAS OMNI, COBAS P, AMPERASE e TAQSCREEN sono marchi di Roche.

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

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.

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

Copyright

©2021 Roche Molecular Systems, Inc.



Bibliografia

1. Petersen LR, Brault AC, Nasci RS. West Nile virus: review of the literature. *JAMA*. 2013;310:308-315.
2. Gray TJ, Webb CE. A review of the epidemiological and clinical aspects of West Nile virus. *Intl J Gen Med*. 2014;7:193-203.
3. Kuno G, Chang GJ, Tsuchiya KR, Karabatsos N, Cropp CB. Phylogeny of the genus *Flavivirus*. *J Virol*. 1998;72:73-83.
4. Burke DS, Monath TP. *Flavirviruses*. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, et al. editors, *Fields' Virology*, vol. 1. 4th ed.. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2001:pp. 1043-1126.
5. Mackenzie JS, Gubler DJ, Petersen LR. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile, and dengue viruses. *Nat Med*. 2004;10 Suppl 12:S98-S109.
6. Beasley DW, Davis CT, Whiteman M, Granwehr B, Kinney RM, Barrett AD. Molecular determinants of virulence of West Nile virus in North America. *Arch Virol Suppl*. 2004;18:35-41.
7. Papa A, Xanthopoulou K, Gewehr S, Mourelatos S. Detection of West Nile virus lineage 2 in mosquitoes during a human outbreak in Greece. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17:1176-1180.
8. Sambri V, Capobianchi M, Charrel R, et al. West Nile virus in Europe: emergence, epidemiology, diagnosis, treatment, and prevention. *Clin Microbiol Infect*. 2013;19:699-704.
9. Petersen LR, Busch MP. Transfusion-transmitted arboviruses. *Vox Sang*. 2010;98:495-503.
10. Artsob H, Gubler DJ, Enria DA, et al. West Nile Virus in the New World: trends in the spread and proliferation of West Nile Virus in the Western Hemisphere. *Zoonoses Public Health*. 2009;56:357-369.
11. May FJ, Davis CT, Tesh RB, Barrett AD. Phylogeography of West Nile virus: from cradle of evolution in Africa to Eurasia, Australia, and the Americas. *J Virol*. 2011;85:2964-2974.
12. Petersen LR, Hayes EB. West Nile virus in the Americas. *Med Clin North Am*. 2008;92:1307-1322.
13. Nash D, Mostashari F, Fine A, et al.;1999 West Nile Outbreak Response Working Group. The outbreak of West Nile virus infection in the New York area 1999. *N Engl J Med*. 2001;344:1807-1814.
14. Pealer LN, Marfin AA, Petersen LR, et al and the West Nile Virus Transmission Investigation Team. Transmission of West Nile Virus through blood transfusion in the United States in 2002. *N Engl J Med*. 2003;349:1236-1245.
15. Harrington T, Kuehnert MJ, Kamel H, et al. West Nile virus infection transmitted by blood transfusion. *Transfusion*. 2003;43:1018-1022.
16. Nett RJ, Kuehnert MJ, Ison MG, Orlowski JP, Fischer JM, Staples JE. Current practices and evaluation of screening solid organ donors for West Nile virus. *Transpl Infect Dis*. 2012;14:268-277.
17. Biggerstaff BJ, Petersen LR. Estimated risk of West Nile virus transmission through blood transfusion during an epidemic in Queens, New York City. *Transfusion*. 2002;42:1019-1026.
18. Custer B, Kamel H, Kiely NE, et al. Associations between West Nile virus infection and symptoms reported by blood donors identified through nucleic acid test screening. *Transfusion*. 2009;49:278-288.

19. Busch MP, Wright DJ, Custer B, et al. West Nile virus infections projected from blood donor screening data, United States, 2003. *Emerg Infect Dis.* 2006;12:395-402.
20. Sejvar JJ, Haddad MB, Tierney BC, et al. Neurologic manifestations and outcome of West Nile virus infection. *JAMA.* 2003;290:511-515.
21. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Fatal West Nile Virus infection after probable transfusion-associated transmission-Colorado, 2012. *MMWR.* 2013;62(31):622-624.
22. Kamar N, Bendell R, Legrand-Abravanel F, et al. Hepatitis E. *Lancet.* 2012;379:2477-2488.
23. AABB website; West Nile Virus Vigilance Network (for West Nile virus 2006-2010). Data compiled by Susan L. Stramer, American Red Cross, available at <http://www.aabb.org/research/hemovigilance/Pages/wnv.aspx>.
24. Zou S, Foster GA, Dodd RY, Petersen LR, Stramer SL. West Nile fever characteristics among viremic persons identified through blood donor screening. *J Infect Dis.* 2010;202:1354-1361.
25. Mostashari F, Bunning ML, Kitsutani PT, et al. Epidemic West Nile encephalitis, New York, 1999: results of a household-based seroepidemiological survey. *Lancet.* 2001;358:261-264.
26. Sejvar JJ, Curns AT, Welburg L, et al. Neurocognitive and functional outcomes in person recovering from West Nile virus illness. *J Neuropsychol.* 2008;2(pt.2):477-499.
27. Burton JM, Kern RZ, Halliday W, et al. Neurological manifestations of West Nile virus infection. *Can J Neurol Sci.* 2004;31:185-193.
28. Robinson RL, Shahida S, Madan N, Rao S, Khardori N. Transient parkinsonism in West Nile virus encephalitis. *Am J Med.* 2003;115:252-253.
29. Sejvar JJ, Bode AV, Marfin AA, et al. West Nile virus-associated flaccid paralysis. *Emerg Infect Dis.* 2005;11:1021-1027.
30. Leis AA, Stokic DS. Neuromuscular manifestations of west nile virus infection. *Front Neurol.* 2012;3:37.
31. Emig M, Apple DJ. Severe West Nile virus disease in healthy adults. *Clin Infect Dis.* 2004;38:289-292.
32. Sadek JR, Pergam SA, Harrington JA, et al. Persistent neuropsychological impairment associated with West Nile virus infection. *J Clin Exp Neuropsychol.* 2010;32:81-87.
33. Lindsey NP, Staples JE, Lehman JA, Fischer M; Center for Disease Control and Prevention (CDC). Surveillance for human West Nile virus disease. *MMWR Surveill Summ.* 2010;59:1-17.
34. 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.
35. 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.
36. 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.
37. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (NY).* 1992;10:413-417.
38. Heid CA, Stevens J, Livak JK, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 1996;6:986-994.

39. 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.
40. 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.
41. Pisani G, Pupella S, Cristiano K, et al. Detection of West Nile virus RNA (lineages 1 and 2) in an external quality assessment programme for laboratories screening blood and blood components for West Nile virus by nucleic acid amplification testing. Blood Transfus. 2012;10: 515–520.

Revisione del documento

Informazioni sulla revisione del documento	
Doc Rev. 7.0 03/2021	Inserimento del simbolo Rx Only nella prima pagina. Aggiornamento degli avvertimenti sui pericoli. Aggiornata la pagina dei simboli armonizzati. Aggiornamento della sezione Marchi e brevetti. Aggiornati gli indirizzi dei Distributori. Aggiunta della dichiarazione "Made in". Per ulteriori domande e chiarimenti, è possibile rivolgersi al rappresentante Roche locale.