

Aptima™ HIV-1 Quant Dx Assay

Per uso diagnostico *in vitro*.

Solo per l'esportazione dagli USA.

| | |
|--|-----------|
| Informazioni generali | 2 |
| Utilizzo previsto | 2 |
| Sommario e spiegazione del test | 2 |
| Principi della procedura | 3 |
| Avvertenze e precauzioni | 4 |
| Requisiti di conservazione e manipolazione dei reagenti | 7 |
| Raccolta e conservazione dei campioni | 8 |
| Campioni caricati sul Panther System | 11 |
| Trasporto del campione | 11 |
| Panther System | 12 |
| Reagenti e materiali forniti | 12 |
| Materiali richiesti ma disponibili separatamente | 14 |
| Materiali opzionali | 15 |
| Procedura di analisi del Panther System | 15 |
| Note procedurali | 19 |
| Controllo della qualità | 21 |
| Calibrazione del test | 21 |
| Controlli positivi e negativi | 21 |
| Calibratore interno/Controllo interno | 21 |
| Interpretazione dei risultati | 22 |
| Limiti | 23 |
| Prestazioni | 24 |
| Limite di rilevamento (LoD) utilizzando il 3° Standard Internazionale dell'OMS per l'HIV-1 | 24 |
| Limite di rilevamento nei sottotipi e gruppi HIV-1 | 25 |
| Range lineare | 26 |
| Linearità nei sottotipi e gruppi HIV-1 | 27 |
| Limite inferiore di quantificazione utilizzando il 3° Standard Internazionale dell'OMS HIV-1 | 28 |
| Verifica dell'LLoQ nei sottotipi e gruppi HIV-1 | 29 |
| Precisione | 30 |
| Sostanze potenzialmente interferenti | 31 |
| Specificità | 33 |
| Specificità analitica | 34 |
| Ripetibilità dei campioni clinici | 35 |
| Diluizione dei campioni con il diluente per campioni biologici | 36 |
| Correlazione fra metodi | 37 |
| Concordanza diagnostica | 37 |
| Contaminazione crociata | 38 |
| Pannello di sieroconversione | 38 |
| Studio di equivalenza con siero e plasma | 39 |
| Bibliografia | 40 |

Informazioni generali

Utilizzo previsto

L'Aptima HIV-1 Quant Dx Assay è un test di amplificazione dell'acido nucleico *in vitro* per il rilevamento e la quantificazione del virus dell'immunodeficienza umana di tipo 1 (HIV-1), gruppi RNA M, N e O sul Panther™ System interamente automatizzato. È previsto per essere usato come ausilio nella diagnosi di infezione da HIV-1, come strumento di conferma dell'infezione da HIV-1 e come ausilio nella gestione clinica dei pazienti con infezione da HIV-1.

L'Aptima HIV-1 Quant Dx Assay può essere usato come ausilio nella diagnosi di infezione da HIV-1, inclusa infezione acuta o primaria. La presenza di RNA dell'HIV-1 nel plasma o nel siero di pazienti sprovvisti di anticorpi anti-HIV-1 è indicativa di infezione da HIV-1 acuta o primaria. L'Aptima HIV-1 Quant Dx Assay può essere usato come test supplementare per i campioni biologici che risultano ripetutamente reattivi con i test immunologici per HIV approvati. Se il campione biologico è reattivo con l'Aptima HIV-1 Quant Dx Assay, l'infezione da HIV-1 è confermata.

L'Aptima HIV-1 Quant Dx Assay può essere utilizzato anche congiuntamente alla presentazione clinica e ad altri marker di laboratorio per la prognosi di malattia negli individui con infezione da HIV-1. L'Aptima HIV-1 Quant Dx Assay può essere utilizzato come ausilio nel monitoraggio dell'effetto della terapia antiretrovirale misurando le variazioni delle concentrazioni plasmatiche di RNA dell'HIV-1.

Quando l'Aptima HIV-1 Quant Dx Assay viene impiegato come ausilio nella diagnosi dell'infezione da HIV-1, le prestazioni in termini di risultati qualitativi vengono stabilite con campioni biologici sia di plasma che di siero. Quando il test viene utilizzato come ausilio nel monitoraggio dell'effetto della terapia antiretrovirale, le prestazioni in termini di risultati quantitativi vengono stabilite con soli campioni biologici di plasma. I campioni biologici di siero non possono essere usati per ottenere risultati quantitativi.

Questo test non è previsto per l'uso nello screening dei donatori di sangue o plasma.

Sommario e spiegazione del test

Gli studi epidemiologici hanno identificato il virus dell'immunodeficienza umana di tipo 1 (HIV-1) come l'agente eziologico della sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS) (1-7). L'HIV può essere trasmesso per contatto sessuale, esposizione a sangue o emoderivati infetti o attraverso la trasmissione da madre a figlio (8). A distanza di 3-6 settimane dall'esposizione all'HIV, gli individui infetti sviluppano generalmente una sindrome acuta di breve durata caratterizzata da sintomi simil-influenzali e associata ad alti livelli di viremia nel sangue periferico (9-12). Nella maggioranza degli individui infetti, a questa prima fase fa seguito una risposta immune HIV-specifica e un declino della viremia plasmatica, solitamente entro 4-6 settimane dalla comparsa dei sintomi (13-14). Dopo la sierconversione, gli individui infetti entrano tipicamente in una fase asintomatica, clinicamente stabile, che può protrarsi per anni (15-17). Il periodo asintomatico è caratterizzato da persistente viremia plasmatica di basso livello (18) e da una graduale deplezione dei linfociti T CD4+. Tale deplezione provoca immunodeficienza grave, svariate infezioni opportunistiche, neoplasie maligne e la morte (19). Sebbene i livelli di virus nel sangue periferico siano relativamente bassi durante la fase asintomatica dell'infezione, la replicazione e la clearance virali sembrano essere processi dinamici in cui tassi elevati di produzione di virus e infezione di cellule CD4+ sono bilanciati da tassi altrettanto elevati di clearance virale, morte di cellule infette e reintegrazione di cellule CD4+, determinando livelli relativamente stabili sia di viremia plasmatica che di cellule CD4+ (20-22).

Le misurazioni quantitative dell'HIV nel sangue periferico hanno mostrato che livelli virali più elevati potrebbero essere correlati ad aumento del rischio di progressione clinica di malattia HIV-associata, e che la riduzione dei livelli plasmatici del virus potrebbe essere associata a diminuzione del rischio di progressione clinica (23-25). I livelli virali nel sangue periferico possono essere determinati mediante misurazione quantitativa dell'antigene p24 dell'HIV nel siero, mediante coltura quantitativa dell'HIV dal plasma o mediante misurazione diretta dell'RNA virale nel plasma utilizzando tecnologie di amplificazione degli acidi nucleici o di amplificazione del segnale (26-30).

Attualmente il rilevamento dell'infezione da HIV-1 si basa principalmente su test sierologici di ricerca degli anticorpi e/o dell'antigene p24 mediante un test immunologico. I Centri per il controllo e la prevenzione delle malattie (Centers for Disease Control, CDC) degli Stati Uniti raccomandano di impiegare un test degli anticorpi e dell'RNA per diagnosticare le infezioni da HIV acute (31). Sebbene la sensibilità del rilevamento degli anticorpi anti-HIV-1 e dell'antigene p24 sia migliorata, esiste ancora una finestra temporale fra il momento dell'infezione e il momento del rilevamento da parte dei marker sierologici, che varia in base alla sensibilità del test sierologico usato. Una stima (32) suggerisce che i test di quarta generazione dell'antigene p24/degli anticorpi siano in grado di rilevare l'infezione quando la concentrazione di RNA dell'HIV-1 raggiunge 14.000 copie/ml. Il limite di rilevamento dell'Aptima HIV-1 Quant Dx Assay è notevolmente inferiore a 14.000 copie/ml e potrebbe rilevare la presenza dell'HIV-1 prima dei test immunologici dell'HIV.

Tecniche molecolari quali l'amplificazione mediata da trascrizione (Transcription Mediated Amplification, TMA) sono state ampiamente utilizzate per amplificare gli acidi nucleici (31). La TMA utilizza la cattura del bersaglio specifica e l'amplificazione isoterma per rilevare gli acidi nucleici in diversi patogeni infettivi (32).

L'Aptima HIV-1 Quant Dx assay, attraverso la TMA, utilizza diversi primer lunghi che mirano diverse regioni del genoma HIV-1, al fine di compensare l'elevato tasso di mutazione e diverse potenziali mutazioni nella regione bersaglio.

Principi della procedura

L'Aptima HIV-1 Quant Dx Assay prevede tre passaggi principali, che si svolgono tutti in un'unica provetta caricata sul Panther System: cattura del target, amplificazione del target mediante amplificazione mediata da trascrizione (Transcription Mediated Amplification, TMA), e rilevamento dei prodotti dell'amplificazione (amplicone) mediante sonde marcate con composti fluorescenti (torce).

Durante la cattura del target, gli acidi nucleici virali vengono isolati dai campioni biologici. Il campione viene trattato con un detergente per solubilizzare l'envelope virale, denaturare le proteine e rilasciare l'RNA genomico virale. Gli oligonucleotidi di cattura ibridizzano con le regioni altamente conservate del genoma HIV-1, se presente, nel campione biologico analizzato. Il target ibridizzato viene successivamente catturato su microparticelle magnetiche che sono separate dal campione biologico in un campo magnetico. Le fasi di lavaggio servono a rimuovere i componenti esterni dalla provetta di reazione.

L'amplificazione del target avviene mediante TMA, un metodo di amplificazione degli acidi nucleici mediato da trascrizione, che utilizza due enzimi: la transcriptasi inversa del virus della leucemia murina di Moloney (MMLV) e la polimerasi dell'RNA T7. La transcriptasi inversa viene utilizzata per generare una copia di DNA (contenente una sequenza promotrice per la polimerasi dell'RNA T7) della sequenza target. La polimerasi dell'RNA T7 produce copie multiple di amplicone di RNA dal modello della copia di DNA. L'Aptima HIV-1 Quant Dx Assay utilizza il metodo TMA per amplificare due regioni dell'RNA dell'HIV-1 (pol e LTR).


L'amplificazione di queste specifiche regioni avviene utilizzando primer specifici previsti per amplificare i gruppi M, N e O dell'HIV-1. La configurazione dei primer e l'approccio con doppio target assicurano il rilevamento e la quantificazione accurati dell'HIV-1.

Il rilevamento viene ottenuto utilizzando torce di acido nucleico monofilamento presenti durante l'amplificazione del target, che ibridizzano specificamente con l'amplicone in tempo reale. Ciascuna torcia contiene un fluoroforo e un quencher. Quando la torcia non è ibridizzata con l'amplicone, il quencher si trova in stretta prossimità del fluoroforo e sopprime la fluorescenza. Quando la torcia si lega all'amplicone, il quencher viene allontanato dal fluoroforo e, quando eccitato da una sorgente luminosa, emette un segnale a una lunghezza d'onda specifica. Mano a mano che un numero maggiore di torce ibridizzano con l'amplicone, viene generato un segnale fluorescente più potente. Il tempo impiegato dal segnale fluorescente per raggiungere una soglia prestabilita è proporzionale alla concentrazione iniziale di HIV-1. Ciascuna reazione ha un calibratore interno/controllo interno (internal control, IC) che controlla le variazioni in termini di trattamento del campione biologico, amplificazione e rilevamento. La concentrazione di un campione viene determinata dal Panther System Software utilizzando i segnali HIV-1 e IC per ciascuna reazione e confrontandoli alle informazioni di calibrazione.

Avvertenze e precauzioni

- A. Per uso diagnostico *in vitro*.
- B. Per ridurre il rischio di generare risultati non validi, prima di eseguire il test leggere attentamente da cima a fondo il foglietto illustrativo e il *Panther System Operator's Manual* (Manuale per l'operatore del Panther System).

Pertinenti al laboratorio

-  C. **ATTENZIONE** – I controlli per questo test contengono plasma umano. Il plasma è negativo per l'antigene di superficie dell'epatite B (HBsAg), gli anticorpi anti-HCV, anti-HIV-1 e anti-HIV-2, e per l'antigene dell'HIV quando testato con procedure autorizzate dall'FDA, l'ente statunitense preposto al controllo dei farmaci e degli alimenti. Inoltre, il plasma non è reattivo per l'RNA dell'HCV e l'RNA dell'HIV-1 quando analizzato con test autorizzati degli acidi nucleici che utilizzano campioni combinati in pool. Tutti i materiali derivati da sangue umano devono essere considerati potenzialmente infettivi e maneggiati rispettando le Precauzioni universali (35-37).
- D. Questa procedura deve essere svolta esclusivamente da personale adeguatamente addestrato all'utilizzo dell'Aptima HIV-1 Quant Dx Assay e alla manipolazione di materiali potenzialmente infettivi. Se si verifica un versamento, disinfettare immediatamente attenendosi alle procedure appropriate stabilite dal laboratorio.
- E. Usare solo contenitori da laboratorio monouso forniti o indicati in modo specifico come monouso.
- F. Adottare le consuete precauzioni di laboratorio. Non pipettare con la bocca. Non mangiare, bere né fumare nelle aree di lavoro designate. Quando si maneggiano campioni e reagenti del kit, indossare guanti monouso senza talco, occhiali protettivi e camici da laboratorio. Lavarsi accuratamente le mani dopo aver maneggiato campioni e reagenti del kit.
- G. Le superfici di lavoro, le pipette e le altre apparecchiature devono essere decontaminate regolarmente con una soluzione di ipoclorito di sodio al 2,5% – 3,5% (da 0,35 M a 0,5 M).

- H. Smaltire tutti i materiali venuti a contatto con i campioni biologici e i reagenti attenendosi ai regolamenti nazionali e locali (35-38). Pulire e disinfettare accuratamente tutte le superfici di lavoro.
- I. I controlli contengono sodio azide come conservante. Non utilizzare tubi metallici per trasferire i reagenti. Se le soluzioni contenenti composti di azidi metalliche vengono versate nelle tubature, devono essere diluite e scaricate con abbondanti quantità di acqua corrente. Si raccomanda di prendere queste precauzioni per evitare l'accumulo di depositi nelle tubature metalliche, in cui si potrebbero formare azidi metalliche fortemente esplosive.
- J. Il monitoraggio ambientale rientra nelle buone pratiche standard per i laboratori molecolari. Per monitorare l'ambiente del laboratorio si consiglia di attenersi alla seguente procedura.
1. Procurarsi un bastoncino di ovatta e abbinarlo alla Provetta per aliquota di campione (SAT) Aptima.
 2. Etichettare ciascuna SAT nel modo appropriato.
 3. Riempire ciascuna SAT con 1 ml di diluente dei campioni Aptima.
 4. Per raccogliere i campioni dalle superfici, inumidire leggermente un bastoncino di ovatta con acqua deionizzata priva di nucleasi.
 5. Passare il bastoncino di ovatta sulla superficie di interesse con un movimento dall'alto al basso. Mentre si passa il bastoncino di ovatta sulla superficie di interesse, ruotarlo di circa mezzo giro.
 6. Collocare immediatamente nella provetta il bastoncino con il campione e roteare delicatamente il bastoncino nel diluente per estrarre gli eventuali materiali prelevati. Premere il bastoncino sul lato della provetta di trasporto per fare fuoriuscire quanto più liquido possibile. Gettare il bastoncino e tappare la provetta.
 7. Ripetere queste fasi per i rimanenti bastoncini con i campioni.
 8. Analizzare il bastoncino con il test molecolare.

Pertinenti ai campioni

- K. I campioni potrebbero essere infettivi. Nell'eseguire questo test, adottare le Precauzioni universali (35-37). Stabilire i metodi idonei di manipolazione e smaltimento attenendosi ai regolamenti locali (38). Questa procedura deve essere svolta esclusivamente da personale adeguatamente addestrato all'utilizzo dell'Aptima HIV-1 Quant Dx Assay e alla manipolazione di materiali infettivi.
- L. Mantenere le corrette condizioni di conservazione durante la spedizione del campione, per assicurarne l'integrità. La stabilità del campione in condizioni di spedizione diverse da quelle raccomandate non è stata determinata.
- M. Evitare la contaminazione crociata durante i procedimenti di manipolazione dei campioni. Prestare particolare attenzione a evitare la contaminazione provocata dalla diffusione degli aerosol quando si allentano o si tolgono i tappi dei contenitori dei campioni. I campioni possono contenere livelli di organismi estremamente alti. Assicurarsi che i contenitori dei campioni non vengano in contatto tra di loro ed eliminare i materiali usati senza farli passare sopra i contenitori aperti. Cambiare i guanti se vengono a contatto con i campioni.

Pertinenti al test

- N. I risultati quantitativi dell'Aptima HIV-1 Quant Dx Assay sono stati sottoposti a valutazione con plasma. Il siero non può essere usato per ottenere risultati quantitativi. I risultati qualitativi sono stati sottoposti a valutazione sia con plasma che con siero.
- O. Non usare il kit reagenti, il calibratore o i controlli dopo la data di scadenza.
- P. Non scambiare, mescolare o combinare reagenti del test provenienti da kit con numeri di lotto master diversi. I liquidi del test possono avere numeri di lotto diversi. I controlli e il calibratore possono avere numeri di lotto diversi.
- Q. Evitare la contaminazione microbica e da nucleasi dei reagenti.
- R. Tappare e conservare tutti i reagenti del test alle temperature specificate. L'uso di reagenti conservati in modo improprio può influire sulle prestazioni del test. Per ulteriori informazioni vedere *Requisiti di conservazione e manipolazione dei reagenti e Procedura di analisi del Panther System*.
- S. Non combinare reagenti o liquidi del test senza istruzioni specifiche. Non rabboccare i flaconi di reagenti o liquidi. Il Panther System verifica i livelli dei reagenti.

**HIV VL Kit Controls**

Azoturo di sodio 0.2%
Human Serum 95-100%

**Avvertenza**

H312 - Nocivo per contatto con la pelle
H412 - Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata
P280 - Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso
P273 - Non disperdere nell'ambiente
P280 - Proteggere gli occhi/il viso


Nota: la comunicazione dei pericoli riflette le classificazioni delle schede di sicurezza degli Stati Uniti e dell'UE (SDS). Per informazioni relative alla comunicazione sui pericoli specifiche per la propria regione, fare riferimento alla scheda SDS specifica della regione nella Raccolta delle schede di sicurezza all'indirizzo www.hologicsds.com.

Requisiti di conservazione e manipolazione dei reagenti

- A. La tabella seguente mostra le condizioni di conservazione e la stabilità di reagenti, controlli e calibratore.

| Reagente | Conservazione a confezione chiusa | Kit aperto (ricostituito) | |
|---|-----------------------------------|---------------------------|--|
| | | Conservazione | Stabilità |
| Reagente di amplificazione qHIV-1 | da 2 °C a 8 °C | | |
| Soluzione di ricostituzione amplificazione qHIV-1 | da 2 °C a 8 °C | da 2 °C a 8 °C | 30 giorni ^a |
| Reagente enzimatico qHIV-1 | da 2 °C a 8 °C | | |
| Soluzione di ricostituzione enzimatica qHIV-1 | da 2 °C a 8 °C | da 2 °C a 8 °C | 30 giorni ^a |
| Reagente promotore qHIV-1 | da 2 °C a 8 °C | | |
| Soluzione di ricostituzione promotrice qHIV-1 | da 2 °C a 8 °C | da 2 °C a 8 °C | 30 giorni ^a |
| Reagente di cattura del target qHIV-1 | da 2 °C a 8 °C | da 2 °C a 8 °C | 30 giorni ^a |
| CONTROLLO NC qHIV-1 – (Controllo negativo) | da -15 °C a -35 °C | da 15 °C a 30 °C | Fiala monouso Utilizzare entro 20 ore |
| CONTROLLO LPC qHIV-1 + (Controllo positivo basso) | da -15 °C a -35 °C | da 15 °C a 30 °C | Fiala monouso Utilizzare entro 20 ore |
| CONTROLLO HPC qHIV-1 + (Controllo positivo alto) | da -15 °C a -35 °C | da 15 °C a 30 °C | Fiala monouso Utilizzare entro 20 ore |
| qHIV-1 PCAL (Calibratore positivo) | da -15 °C a -35 °C | da 15 °C a 30 °C | Fiala monouso Utilizzare entro 20 ore |

^a Quando i reagenti vengono rimossi dal Panther System, devono essere riportati immediatamente alle temperature di conservazione idonee.

- B. Eliminare dopo 30 giorni o dopo la data di scadenza del lotto master (la prima delle due evenienze) tutti i reagenti e il reagente di cattura del target (target capture reagent, TCR) ricostituiti e non utilizzati.
- C. I reagenti conservati sul Panther System sono stabili per 72 ore quando sono conservati sullo strumento. I reagenti possono essere caricati sul Panther System fino a 5 volte. Il Panther System registra tutte le volte in cui i reagenti vengono caricati sullo strumento.
- D. Quando il calibratore è scongelato, la soluzione deve essere trasparente, cioè non deve essere torbida e non deve presentare tracce di precipitati.
-  E. Il reagente promotore e il reagente promotore ricostituito sono fotosensibili. Proteggere questi reagenti dalla luce durante la conservazione e la preparazione per l'uso.

Raccolta e conservazione dei campioni

Nota – *Maneggiare tutti i campioni come se contenessero agenti potenzialmente infettivi. Adottare le Precauzioni universali.*

Nota – *Assicurarsi di evitare la contaminazione crociata durante le fasi di manipolazione del campione. Ad esempio, eliminare i materiali usati senza farli passare sopra le provette aperte. È consentito usare campioni di sangue intero raccolti nelle seguenti provette di vetro o plastica.*

Per le misurazioni quantitative:

- Provette contenenti EDTA o ACD (destrosio citrato acido) come anticoagulanti, oppure
- Provette di preparazione del plasma (Plasma Preparation Tube, PPT).

Per la determinazione qualitativa:

- Provette contenenti EDTA o ACD come anticoagulanti, oppure
- PPT, oppure
- Provette con siero, oppure
- Provette con separatore di siero (Serum Separator Tube, SST).

Per il siero, prima di trattare ulteriormente, consentire che si formi il coagulo.

A. Raccolta dei campioni

Il sangue intero può essere conservato a 2 °C – 30 °C e centrifugato entro 24 ore dalla raccolta del campione. Separare il plasma o il siero dal pellet di globuli rossi attenendosi alle istruzioni del fabbricante della provetta utilizzata. Il plasma o il siero possono essere analizzati sul Panther System nella provetta primaria oppure trasferiti nella Provetta per aliquota di campione (SAT) Aptima secondaria e analizzati sul Panther System. Il volume minimo di plasma o siero per le provette di raccolta primarie è 1200 µl; per le SAT il volume minimo è 700 µl per ottenere il volume di reazione di 500 µl.

Se non analizzati immediatamente, plasma e siero possono essere conservati attenendosi alle specifiche seguenti. Se trasferito alla SAT, il plasma può essere congelato a -20 °C o -70 °C, e il siero può essere congelato a -20 °C. Non congelare e scongelare per più di tre volte, per evitare di compromettere i risultati. Non congelare i campioni in provette di raccolta primarie contenenti EDTA, ACD o siero.

B. Condizioni di conservazione dei campioni

1. Campioni di plasma con EDTA e ACD

Per un massimo di 24 ore dopo la raccolta del campione, le provette primarie contenenti plasma centrifugato possono essere conservate a 2 °C – 30 °C (Figura 1, riquadro in alto). Dopo 24 ore, il plasma può essere conservato per un periodo più lungo a una delle condizioni seguenti (Figura 1, riquadri in basso):

- Nella provetta di raccolta primaria a 2 °C – 8 °C per un massimo di 3 giorni,
- Nella SAT a 2 °C – 8 °C per un massimo di 5 giorni, oppure
- Nella SAT a -20 °C o -70 °C per un massimo di 90 giorni.

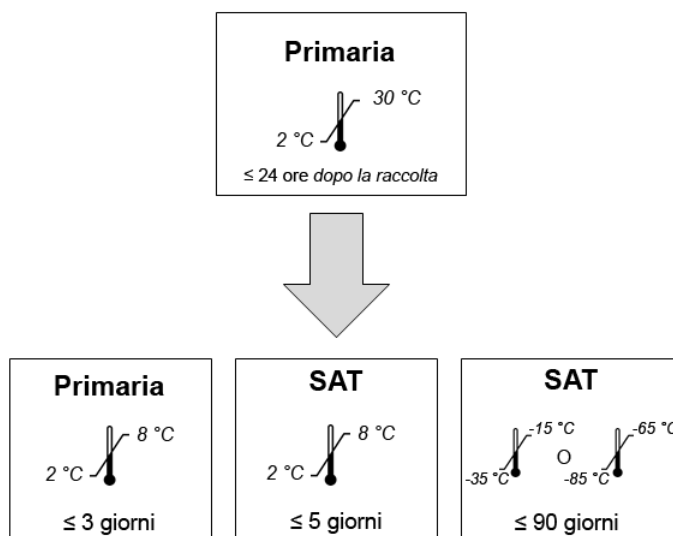


Figura 1. Condizioni di conservazione per le provette contenenti EDTA/ACD

2. Campioni PPT

Per un massimo di 24 ore dopo la raccolta del campione, le PPT contenenti plasma centrifugato possono essere conservate a 2 °C – 30 °C (Figura 2, riquadro in alto). Dopo 24 ore, il plasma può essere conservato per un periodo più lungo a una delle condizioni seguenti (Figura 2, riquadri in basso):

- Nella PPT a 2 °C – 8 °C per un massimo di 3 giorni,
- Nella SAT a 2 °C – 8 °C per un massimo di 5 giorni, oppure
- Nella PPT o SAT a -20 °C o -70 °C per un massimo di 90 giorni.

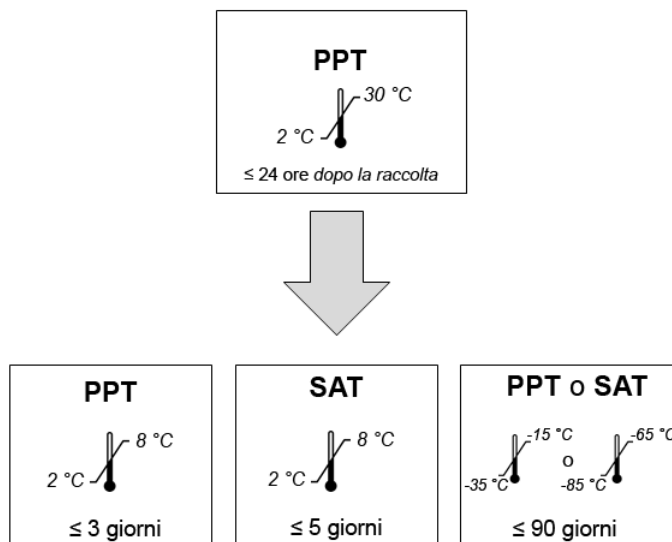


Figura 2. Condizioni di conservazione per le PPT

3. Campioni in provette per siero

Per un massimo di 24 ore dopo la raccolta del campione, le provette per siero contenenti siero centrifugato possono essere conservate a temperature comprese fra 2 °C e 30 °C (Figura 3, riquadro in alto). Dopo 24 ore, il siero può essere conservato per un periodo più lungo in una delle condizioni seguenti (Figura 3, riquadri in basso):

- Nella provetta per siero a 2 °C – 8 °C per un massimo di 5 giorni,
- Nella SAT a 2 °C – 8 °C per un massimo di 5 giorni, oppure
- Nella SAT a -20 °C per un massimo di 7 giorni.

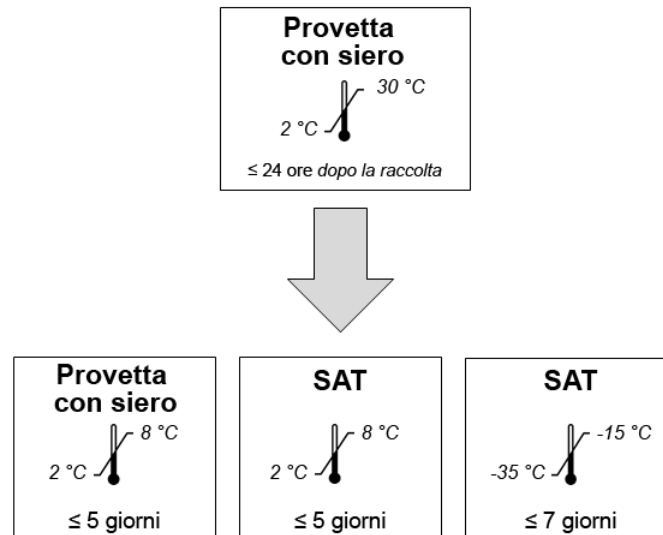


Figura 3. Condizioni di conservazione delle provette contenenti siero

4. Campioni SST

Per un massimo di 24 ore dopo la raccolta del campione, le SST contenenti siero centrifugato possono essere conservate a 2 °C – 30 °C (Figura 4, riquadro in alto). Dopo 24 ore, il siero può essere conservato per un periodo più lungo in una delle condizioni seguenti (Figura 4, riquadri in basso):

- Nella SST a 2 °C – 8 °C per un massimo di 5 giorni,
- Nella SAT a 2 °C – 8 °C per un massimo di 5 giorni, oppure
- Nella SAT o nella SST a -20 °C per un massimo di 7 giorni.

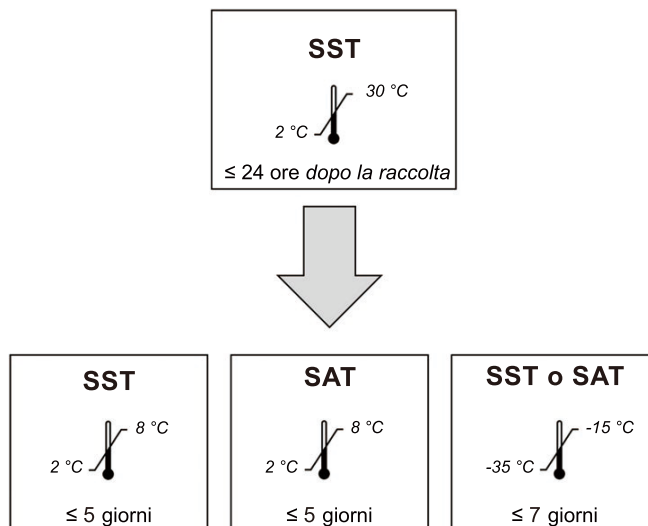


Figura 4. Condizioni di conservazione delle SST

C. Diluizione dei campioni di plasma

Un campione di plasma può essere diluito nella SAT per l'analisi con il Panther System. Per informazioni dettagliate, vedere *Procedura di analisi del Panther System*, Passaggio E.6 qui sotto.

Nota – Se un campione viene diluito, deve essere analizzato immediatamente dopo la diluizione. Non congelare un campione diluito.

⚠ La diluizione dei campioni di plasma può essere effettuata unicamente per ottenere risultati quantitativi. Non diluire campioni di plasma per ottenere risultati diagnostici.

Campioni caricati sul Panther System

I campioni possono essere lasciati stappati sul Panther System per un totale di 8 ore al massimo. I campioni possono essere rimossi dal Panther System e analizzati fintantoché la loro permanenza totale sullo strumento non supera 8 ore prima del loro pipettaggio da parte del Panther System.

Trasporto del campione

Mantenere le condizioni di conservazione del campione come descritto nella sezione *Raccolta e conservazione dei campioni*.

Nota – La spedizione dei campioni deve essere effettuata in conformità ai regolamenti applicabili relativi al trasporto nazionale, internazionale e regionale.

Panther System

I reagenti per l'Aptima HIV-1 Quant Dx Assay sono elencati sotto per il Panther System. Accanto al nome di ciascun reagente è indicato anche il rispettivo simbolo identificativo.

Reagenti e materiali forniti

Nota – per informazioni sulle indicazioni di pericolo e i consigli di prudenza che possono essere associati ai reagenti, consultare la libreria delle schede di sicurezza (Safety Data Sheet Library) all'indirizzo www.hologic.com/sds.

Kit Aptima HIV-1 Quant Dx Assay, 100 test, N. di catalogo PRD-03000 (1 scatola del test, 1 kit calibratore e 1 kit controlli)

Calibratori e controlli aggiuntivi possono essere ordinati separatamente. Consultare i relativi numeri di catalogo di seguito.

Scatola dell'Aptima HIV-1 Quant Dx Assay

(alla consegna, conservare a 2 °C – 8 °C)

| Simbolo | Componente | Quantità |
|-------------|---|-------------|
| A | Reagente di amplificazione qHIV-1 <i>Acidi nucleici non infettivi essiccati in soluzione tamponata.</i> | 1 flacone |
| E | Reagente enzimatico qHIV-1 <i>Transcriptasi inversa e polimerasi dell'RNA essiccate in soluzione tamponata HEPES.</i> | 1 flacone |
| PRO | Reagente promotore qHIV-1 <i>Acidi nucleici non infettivi essiccati in soluzione tamponata.</i> | 1 flacone |
| AR | Soluzione di ricostituzione amplificazione qHIV-1 <i>Soluzione acquosa contenente glicerolo e conservanti.</i> | 1 x 7,2 ml |
| ER | Soluzione di ricostituzione enzimatica qHIV-1 <i>Soluzione tamponata HEPES contenente un tensioattivo e glicerolo.</i> | 1 x 5,8 ml |
| PROR | Soluzione di ricostituzione promotrice qHIV-1 <i>Soluzione acquosa contenente glicerolo e conservanti.</i> | 1 x 4,5 ml |
| TCR | Reagente di cattura del target qHIV-1 <i>Acidi nucleici in una soluzione salina tamponata contenente acidi nucleici non infettivi in fase solida e calibratore interno.</i> | 1 x 72,0 ml |
| | Collari per ricostituzione | 3 |
| | Foglio dei codici a barre dei lotti master | 1 foglio |

Kit calibratore Aptima HIV-1 Quant Dx (N. di catalogo PRD-03001)
(alla consegna, conservare a -15 °C – -35 °C)

| Simbolo | Componente | Quantità |
|---------|---|------------|
| PCAL | Calibratore positivo qHIV-1 <i>Trascritto in soluzione tamponata.</i> | 5 x 2,5 ml |
| | Etichetta del codice a barre del calibratore | — |

Kit controlli Aptima HIV-1 Quant Dx (N. di catalogo PRD-03002)
(alla consegna, conservare a -15 °C – -35 °C)

| Simbolo | Componente | Quantità |
|---------|---|------------|
| NC | Controllo negativo qHIV-1 <i>Plasma umano defibrinato, negativo a HIV-1, contenente gentamicina e sodio azide allo 0,2% come conservanti.</i> | 5 x 1,5 ml |
| LPC | Controllo positivo basso qHIV-1 <i>Armored RNA dell'HIV-1 non infettivo in plasma umano defibrinato, contenente gentamicina e sodio azide allo 0,2% come conservanti.</i> | 5 x 1,5 ml |
| HPC | Controllo positivo alto qHIV-1 <i>Armored RNA dell'HIV-1 non infettivo in plasma umano defibrinato, contenente gentamicina e sodio azide allo 0,2% come conservanti.</i> | 5 x 1,5 ml |
| | Etichetta dei codici a barre dei controlli | — |

Materiali richiesti ma disponibili separatamente

Nota – Salvo altrimenti specificato, per i materiali disponibili presso Hologic sono indicati i rispettivi numeri di catalogo.

| Materiale | N. di cat. |
|--|--|
| Panther System | — |
| Kit sessione analitica Panther per test in tempo reale (solo per test in tempo reale) | PRD-03455 (5000 test) |
| Kit di liquidi per l'Aptima Assay (<i>detto anche kit Universal Fluids</i>) <i>contiene soluzione di lavaggio Aptima, tampone Aptima per liquido di disattivazione e reagente oleoso Aptima</i> | 303014 (1000 test) |
| <i>Unità multiprovetta (Multi-Tube Unit, MTU)</i> | 104772-02 |
| <i>Kit dei sacchetti di rifiuti Panther</i> | 902731 |
| <i>Coperchio del bin di scarico Panther</i> | 504405 |
| O, Kit sessione analitica sistema Panther <i>(quando si eseguono test TMA non in tempo reale in parallelo con test TMA in tempo reale)</i> <i>contiene unità multiprovette (MTU), sacchetti di scarico, coperchi del bin di scarico, rilevamento automatico e liquidi del test</i> | 303096 (5000 test) |
| Puntali, 1000 µl conduttivi, rilevatori di liquido | 10612513 (Tecan) |
| Candeggina, soluzione di ipoclorito di sodio al 5% – 7% (da 0,7 M a 1,0 M) | — |
| Guanti monouso senza talco | — |
| Tappi non penetrabili di ricambio | 103036A |
| Tappi di ricambio per reagenti <i>Flaconi di ricostituzione reagente di amplificazione, enzimatico e promotore</i> <i>Flacone TCR</i> | CL0041 (100 tappi) CL0040 (100 tappi) |
| Teli da banco di laboratorio plastificati | — |
| Panni che non lasciano pelucchi | — |
| Pipettatore | — |
| Puntali | — |
| È consentito usare provette di raccolta primarie (ACD, EDTA, PPT, SST, Siero) delle seguenti dimensioni: <i>13 mm x 100 mm</i> <i>13 mm x 75 mm</i> <i>16 mm x 100 mm</i> | — |
| Centrifuga | — |
| Miscelatore vortex | — |

Materiali opzionali

| Materiale | N. di cat. |
|---|------------|
| Provette per aliquota di campione (SAT) Aptima (confezione da 100) | 503762 |
| Tappo per provette di trasporto (confezione da 100) <i>tappo per SAT</i> | 504415 |
| Diluyente del campione Aptima | PRD-03003 |
| Kit diluyente dei campioni Aptima <i>contiene il diluyente dei campioni, 100 SAT e 100 tappi</i> | PRD-03478 |
| Pipette di trasferimento | — |
| Pannelli disponibili in commercio; ad esempio: <i>HIV-1 di Quality Control for Molecular Diagnostics (QCMD) oppure il pannello del College of American Pathologists (CAP) HIV Viral Load Survey (Indagine sulla carica virale HIV) oppure i pannelli ACCURUN HIV di SeraCare</i> | — |
| Bastoncini di ovatta | — |
| Agitatore oscillante per provette | — |

Procedura di analisi del Panther System

Nota – Per ulteriori informazioni procedurali, vedere il *Panther System Operator's Manual (Manuale per l'operatore del Panther System)*.

A. Preparazione dell'area di lavoro

1. Pulire le superfici di lavoro dove verranno preparati i reagenti. Passare sulle superfici di lavoro una soluzione di ipoclorito di sodio al 2,5% – 3,5% (da 0,35 M a 0,5 M). Lasciare la soluzione di ipoclorito di sodio a contatto con le superfici per almeno 1 minuto, quindi risciacquare con acqua deionizzata. Non lasciare asciugare la soluzione di ipoclorito di sodio. Coprire la superficie del banco sul quale verranno preparati i reagenti e i campioni con teli da banco di laboratorio puliti, assorbenti e plastificati.
2. Pulire una superficie di lavoro separata su cui preparare i campioni. Utilizzare la procedura descritta in precedenza (Passaggio A.1).
3. Pulire eventuali pipettatori. Utilizzare la procedura descritta in precedenza (Passaggio A.1).

B. Preparazione del calibratore e dei controlli

Consentire al calibratore e ai controlli di raggiungere una temperatura compresa fra 15 °C e 30 °C prima del trattamento, come indicato di seguito:

1. Togliere il calibratore e i controlli dal luogo in cui sono conservati (da -15 °C a -35 °C) e porli a una temperatura compresa fra 15 °C e 30 °C. Durante l'intero processo di scongelamento, capovolgere delicatamente ciascuna provetta per miscelarla accuratamente. Assicurarsi che il contenuto della provetta sia completamente scongelato prima di utilizzarlo.

Opzione. Le provette di calibratore e controlli possono essere collocate su un agitatore oscillante per essere miscelate accuratamente. Assicurarsi che il contenuto della provetta sia completamente scongelato prima di utilizzarlo.

Nota – *Non generare schiuma eccessiva quando si capovolgono calibratore e controlli. La schiuma pregiudica la sensibilità di rilevamento dei livelli nel Panther System.*

2. Quando il contenuto della provetta si è scongelato, asciugare l'esterno della provetta con un panno monouso pulito e asciutto.
3. Per evitare la contaminazione, non aprire le provette in questo momento.

C. Ricostituzione del reagente/preparazione di un nuovo kit

Nota – *Eseguire la ricostituzione dei reagenti prima di iniziare qualsiasi lavoro sul Panther System.*

1. Per preparare il reagente di cattura del target (TCR), procedere nel modo seguente.
 - a. Togliere il TCR dal luogo in cui è conservato (a 2 °C – 8 °C). Controllare il numero di lotto sul flacone del TCR per assicurarsi che corrisponda al numero di lotto riportato sul foglio dei codici a barre dei lotti master.
 - b. Agitare immediatamente il flacone di TCR in modo vigoroso per 10 volte. Lasciare riscaldare il flacone di TCR a 15 °C – 30 °C per almeno 45 minuti. Durante questo periodo, roteare e capovolgere il flacone di TCR almeno ogni 10 minuti.

Opzione. Il flacone può essere preparato su un agitatore oscillante per provette attenendosi a queste istruzioni: togliere il TCR dal luogo in cui è conservato (a 2 °C – 8 °C) e agitarlo immediatamente in modo vigoroso per 10 volte. Collocare il flacone di TCR su un agitatore oscillante per provette e lasciare il TCR a riscaldarsi a 15 °C – 30 °C per almeno 45 minuti.
 - c. Prima di utilizzarlo, assicurarsi che tutto il precipitato sia in soluzione e che le particelle magnetiche siano in sospensione.
2. Per ricostituire il reagente di amplificazione, il reagente enzimatico e il reagente promotore, procedere nel modo seguente.
 - a. Togliere dal luogo di conservazione (2 °C – 8 °C) i reagenti liofilizzati e le corrispondenti soluzioni di ricostituzione. Abbinare ciascuna soluzione di ricostituzione al rispettivo reagente liofilizzato.
 - b. Assicurarsi che l'etichetta della soluzione di ricostituzione e l'etichetta del reagente liofilizzato abbiano colori corrispondenti. Controllare i numeri di lotto sul foglio dei codici a barre dei lotti master per assicurarsi di abbinare i reagenti appropriati.
 - i. Aprire la fiala di reagente liofilizzato rimuovendo il sigillo metallico e il tappo di gomma.
 - ii. Inserire con decisione sulla fiala l'estremità indentata del collare di ricostituzione (nero) (Figura 5, Passaggio 1).
 - iii. Aprire il flacone della soluzione di ricostituzione corrispondente e appoggiare il tappo su una superficie di lavoro pulita e coperta.
 - iv. Appoggiare il flacone con la soluzione di ricostituzione su una superficie stabile (sul banco). Quindi capovolgere la fiala del reagente liofilizzato sul flacone con la soluzione di ricostituzione e fissare saldamente il collare al flacone con la soluzione di ricostituzione (Figura 5, Passaggio 2).
 - v. Capovolgere lentamente i flaconi assemblati (fiala fissata al flacone con la soluzione) per consentire alla soluzione di drenare nella fiala di vetro (Figura 5, Passaggio 3).
 - vi. Raccogliere i flaconi assemblati e rotarli per almeno 10 secondi (Figura 5, Passaggio 4).
 - vii. Attendere almeno 30 minuti per permettere al reagente liofilizzato di andare in soluzione.

- viii. Dopo che il reagente liofilizzato è andato in soluzione, roteare i flaconi assemblati per almeno 10 secondi, quindi fare oscillare leggermente avanti e indietro la soluzione all'interno della fiala di vetro per miscelare bene.
- c. Inclinare di nuovo lentamente i flaconi assemblati per consentire a tutta la soluzione di drenare nuovamente nel flacone della soluzione di ricostituzione (Figura 5, Passaggio 5).
- d. Rimuovere con cautela il collare di ricostituzione e il flacone di vetro (Figura 5, Procedimento 6).
- e. Rimettere il cappuccio al flacone. Registrare sull'etichetta le iniziali dell'operatore e la data di ricostituzione (Figura 5, Procedimento 7).
- f. Gettare via sia il collare di ricostituzione che il flacone di vetro (Figura 5, Procedimento 8).

Avvertenza – Evitare la formazione di schiuma eccessiva durante la ricostituzione dei reagenti. La schiuma pregiudica la sensibilità di rilevamento dei livelli nel Panther System.

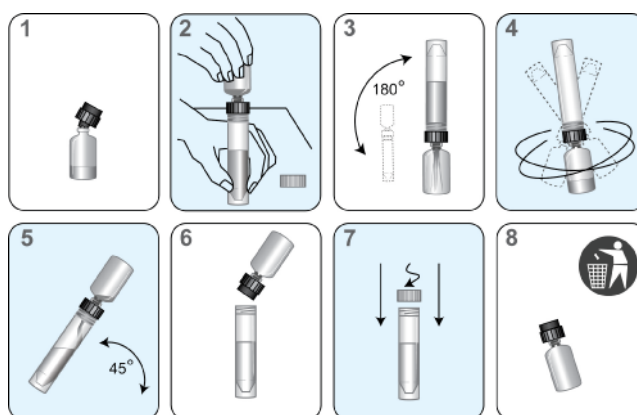


Figura 5. Processo di ricostituzione dei reagenti

D. Preparazione di reagenti per i reagenti precedentemente preparati

1. Togliere dal luogo di conservazione (a 2 °C – 8 °C) i reagenti precedentemente preparati.
2. I reagenti di amplificazione, enzimatico e promotore e il TCR precedentemente preparati devono raggiungere una temperatura compresa fra 15 °C e 30 °C prima dell'avvio del test.
3. Per il TCR precedentemente preparato, eseguire il passaggio C.1 descritto in precedenza, prima di caricarlo sul sistema.
4. Roteare e capovolgere i reagenti di amplificazione, enzimatico e promotore per miscelarli bene prima di caricarli sul sistema. Evitare la formazione di schiuma eccessiva quando si capovolgono i reagenti.
5. Evitare di rabboccare i flaconi dei reagenti. Il Panther System riconosce e rifiuta i flaconi rabboccati.

E. Manipolazione dei campioni

1. Assicurarsi che i campioni congelati siano scongelati del tutto. Miscelare con vortex i campioni scongelati per 3-5 secondi per miscelarli bene.
2. Lasciare che i campioni raggiungano i 15 °C – 30 °C prima di sottoporli al trattamento. Per ulteriori informazioni sul caricamento dei campioni sullo strumento, vedere *Campioni caricati sul Panther System*.

3. Assicurarsi che ciascuna provetta di raccolta primaria contenga almeno 1200 µl di campione biologico. Assicurarsi che ciascuna Provetta per aliquota di campione (SAT) Aptima contenga almeno 700 µl di campione. Se si rende necessario diluire il campione biologico, per ulteriori informazioni vedere il passaggio E.6 qui sotto.
4. Miscelare con vortex i campioni nelle SAT per 3-5 secondi per miscelarli bene.
5. Immediatamente prima di caricare i campioni in una rastrelliera campioni, centrifugare ciascun campione a 1000 – 3000g per 10 minuti. Non togliere i tappi. La presenza di bolle nella provetta pregiudica la sensibilità di rilevamento del livello di liquido nel Panther System.

Per informazioni su come caricare la rastrelliera e togliere i tappi, vedere *Preparazione del sistema*, passaggio F.2 qui sotto.

6. Diluizione di un campione di plasma nella SAT

Un campione di plasma può essere diluito nella SAT per l'analisi con il Panther System.

⚠ La diluizione dei campioni di plasma può essere effettuata unicamente per ottenere risultati quantitativi. Non diluire campioni di plasma per ottenere risultati diagnostici.

Nota – *Se un campione viene diluito, deve essere analizzato immediatamente dopo la diluizione.*

- a. Diluizione di campioni con volume ridotto

Per portare il volume dei campioni di plasma al volume minimo richiesto (700 µl) utilizzare il diluente dei campioni Aptima. I campioni contenenti almeno 240 µl di plasma possono essere diluiti nel modo seguente con due parti di diluente dei campioni (1:3).

- i. Trasferire 240 µl di campione nella SAT.
- ii. Aggiungere 480 µl di diluente dei campioni.
- iii. Tappare la provetta.
- iv. Capovolgerla delicatamente 5 volte per miscelarla.

I campioni diluiti 1:3 possono essere analizzati utilizzando l'opzione 1:3 sul Panther System. Per ulteriori informazioni vedere il *Panther System Operator's Manual* (Manuale per l'operatore del Panther System). Il software riporterà automaticamente il risultato per il campione non diluito applicando il fattore di diluizione. Questi campioni saranno segnalati come campioni diluiti.

- b. Diluizione di campioni con alto titolo

Se il risultato dell'analisi di un campione è al di sopra del limite superiore di quantificazione, il campione può essere diluito nel modo seguente con 99 parti di diluente dei campioni Aptima (1:100).

- i. Trasferire 30 µl di campione nella SAT.
- ii. Aggiungere 2970 µl di diluente dei campioni.
- iii. Tappare la provetta.
- iv. Capovolgerla delicatamente 5 volte per miscelarla.

I campioni diluiti 1:100 possono essere analizzati utilizzando l'opzione 1:100 sul Panther System. Per ulteriori informazioni vedere il *Panther System Operator's Manual* (Manuale per l'operatore del Panther System). Il software riporterà

automaticamente il risultato per il campione non diluito applicando il fattore di diluizione. Questi campioni saranno segnalati come campioni diluiti.

Nota – Per i campioni diluiti con concentrazioni non diluite superiori all'ULOQ, i risultati saranno comunicati utilizzando la notazione scientifica.

F. Preparazione del sistema

1. Impostare il sistema in base alle istruzioni fornite nel *Panther System Operator's Manual* (Manuale per l'operatore del Panther System) e nelle *Note procedurali*. Assicurarsi di utilizzare rastrelliere reagenti e adattatori TCR di dimensioni appropriate.
2. Caricare i campioni nella rastrelliera campioni. Eseguire i seguenti passaggi per ciascuna provetta di campione (campione biologico e, quando necessario, calibratore e controlli).

- a. Allentare il tappo di una delle provette dei campioni, senza però rimuoverlo.

Nota – Prestare particolare attenzione a evitare la contaminazione provocata dalla diffusione degli aerosol. Allentare delicatamente i tappi dei campioni.

- b. Caricare la provetta del campione nella rastrelliera campioni.
- c. Ripetere i passaggi 2.a e 2.b per ciascun campione rimanente.
- d. Dopo che i campioni sono stati caricati nella rastrelliera campioni, rimuovere e gettare tutti i tappi delle provette dei campioni di una rastrelliera campioni. Per evitare la contaminazione, non fare passare i tappi sopra le altre rastrelliere campioni o sopra le provette dei campioni.
- e. Se necessario, utilizzare una pipetta di trasferimento monouso nuova per eliminare eventuali bolle o schiuma.
- f. Dopo aver rimosso l'ultimo tappo, caricare la rastrelliera campioni in uno scomparto campioni.

Nota – Se contemporaneamente si eseguono altri test e si analizzano altri tipi di campioni, fissare il fermo campioni prima di caricare la rastrelliera campioni in uno scomparto campioni.

- g. Ripetere i passaggi da 2.a a 2.f per la successiva rastrelliera campioni.

Note procedurali

A. Calibratore e controlli

1. Il calibratore positivo qHIV-1, il controllo positivo basso qHIV-1, il controllo positivo alto qHIV-1 e il controllo negativo qHIV-1 possono essere caricati in una posizione qualsiasi nella rastrelliera campioni e in una corsia qualsiasi dello scomparto campioni sul Panther System. Il pipettaggio dei campioni inizierà quando verrà soddisfatta una delle due seguenti condizioni:
 - a. Il calibratore e i controlli sono in fase di trattamento sul sistema.
 - b. I risultati validi del calibratore e dei controlli sono stati registrati nel sistema.
2. Quando le provette del calibratore e dei controlli sono state pipettate e sono in fase di trattamento per il kit reagenti Aptima HIV-1 Quant Dx Assay, i campioni biologici possono essere analizzati con il kit ricostituito ad essi associato per un massimo di 24 ore, **a meno che**:
 - a. Il risultato di calibratore o controllo risulti non valido.
 - b. Il kit di reagenti del test associato viene rimosso dal sistema.

- c. Il kit di reagenti del test associato ha superato i limiti di stabilità.
 - 3. Ciascuna provetta di calibratore e controllo può essere analizzata solo una volta. Se si tenta di analizzare la provetta più di una volta, è possibile che si verifichino errori di trattamento.
- B. Talco dei guanti
- Come in qualsiasi sistema di reagenti, il talco eccessivo in alcuni guanti può causare la contaminazione delle provette aperte. Si consigliano guanti privi di talco.

Controllo della qualità

Il risultato di una sessione analitica o di un campione biologico può essere annullato da un operatore se durante l'esecuzione del test si riscontrano problemi tecnici o difficoltà riconducibili all'operatore o allo strumento e tali difficoltà vengono documentate. In questo caso, i campioni devono essere ritestati.

Calibrazione del test

Per generare risultati validi è necessario completare la calibrazione del test. Un singolo calibratore positivo viene analizzato in triplicato tutte le volte che un kit reagenti viene caricato sul Panther System. Una volta stabilita, la calibrazione rimane valida per un massimo di 24 ore. Il software del Panther System avvisa l'operatore quando è necessario eseguire la calibrazione. L'operatore esegue la scansione di un coefficiente di calibrazione riportato nel foglio dei codici a barre dei lotti master fornito con ciascun kit reagenti.

Durante il trattamento, i criteri per l'accettazione del calibratore vengono verificati automaticamente dal software del Panther System. Se risultano validi meno di due dei replicati del calibratore, il software annulla automaticamente la sessione analitica. I campioni di una sessione analitica annullata devono essere rianalizzati utilizzando calibratore e controlli preparati al momento.

Controlli positivi e negativi

Per generare risultati validi è necessario analizzare un set di controlli del test. È necessario analizzare un replicato del controllo negativo, del controllo positivo basso e del controllo positivo alto tutte le volte che un kit reagenti viene caricato sul Panther System. Una volta stabiliti, i controlli rimangono validi per un massimo di 24 ore. Il software del Panther System avvisa l'operatore quando è necessario utilizzare i controlli.

Durante il trattamento, i criteri per l'accettazione dei controlli vengono verificati automaticamente dal software del Panther System. Per generare risultati validi, il controllo negativo deve dare un risultato di "Non rilevato" e i controlli positivi devono dare risultati rientranti nei parametri predefiniti. Se uno qualsiasi dei controlli genera risultati non validi, il software annulla automaticamente la sessione analitica. I campioni di una sessione analitica annullata devono essere rianalizzati utilizzando calibratore e controlli preparati al momento.

Calibratore interno/Controllo interno

Ciascun campione contiene un calibratore interno/controllo interno (IC). Durante il trattamento, i criteri di accettazione IC sono verificati automaticamente dal Panther System Software. Se un risultato IC risulta non valido, il risultato del campione viene annullato. Ciascun campione con un risultato IC non valido deve essere rianalizzato per ottenere un risultato valido.

Il software del Panther System è progettato per verificare accuratamente i processi quando le procedure vengono eseguite nel rispetto delle istruzioni fornire nel presente foglietto illustrativo e del *Panther System Operator's Manual* (Manuale per l'operatore del Panther System).

Interpretazione dei risultati

Nota – I risultati quantitativi dell'Aptima HIV-1 Quant Dx Assay sono stati sottoposti a valutazione con plasma. Il siero non può essere usato per ottenere risultati quantitativi. I risultati qualitativi sono stati sottoposti a valutazione sia con plasma che con siero.

Il Panther System determina automaticamente la concentrazione di RNA dell'HIV-1 nei campioni biologici e nei controlli mettendo a confronto i risultati con una curva di calibrazione. Le concentrazioni di RNA dell'HIV-1 vengono riportate in copie/ml e \log_{10} copie/ml.

L'interpretazione dei risultati è inclusa nella Tabella 1. Se si usa la diluizione 1:3 o 1:100 per i campioni biologici diluiti, il Panther System calcola automaticamente la concentrazione di HIV-1 per il campione biologico non diluito moltiplicando la concentrazione diluita per il fattore di diluizione e i campioni diluiti vengono contrassegnati come tali.

Nota – Per i campioni diluiti, i risultati elencati come “Non rilevato” o “<30 rilevato” possono essere generati diluendo un campione con una concentrazione superiore ma vicina all'LoD (limite di quantificazione) o all'LLoQ (limite inferiore di quantificazione). Se non si ottiene un risultato quantitativo, si consiglia di raccogliere e analizzare un altro campione biologico non diluito.

Il Panther System non fornisce un risultato qualitativo (cioè, “Reattivo” oppure “Non reattivo”) per uso diagnostico. L'operatore deve interpretare in un risultato qualitativo la concentrazione di RNA dell'HIV-1 riportata (Tabella 1). I campioni biologici con risultati elencati come “Non rilevato” sono non reattivi per l'RNA dell'HIV-1. I campioni biologici con risultati elencati come “<30 rilevato” o i campioni biologici con risultati che rientrano nel range lineare indicano rilevamento del RNA dell'HIV-1 e questi campioni sono reattivi per l'RNA dell'HIV-1.

Tabella 1 - Interpretazione dei risultati

| Risultato Aptima HIV-1 Quant Dx Assay riportato | | Interpretazione della concentrazione dell'RNA dell'HIV-1 | Interpretazione diagnostica qualitativa dell'utilizzatore ^e |
|---|---------------------------------------|---|--|
| Copie/ml ^a | Valore ^b Log ₁₀ | | |
| Non rilevato | Non rilevato | RNA dell'HIV-1 non rilevato. | Non reattivo per l'RNA dell'HIV-1 |
| <30 rilevate | <1,47 | L'RNA dell'HIV-1 è stato rilevato, ma a un livello inferiore all'LLoQ | Reattivo per l'RNA dell'HIV-1 |
| da 30 a 10.000.000 | da 1,47 a 7,00 | La concentrazione di RNA dell'HIV-1 rientra nel range lineare compreso fra 30 e 10.000.000 copie/ml. | Reattivo per l'RNA dell'HIV-1 |
| >10.000.000 | >7,00 | La concentrazione di RNA dell'HIV-1 è superiore al Limite superiore di quantificazione (Upper Limit of Quantitation, ULoQ). | Reattivo per l'RNA dell'HIV-1 |
| Non valido ^d | Non valido ^d | Si è verificato un errore nella generazione del risultato. Il campione biologico deve essere rianalizzato. | Non valido |

^a Il fattore di conversione da copie a Unità Internazionali (UI) per il 3° Standard Internazionale per la rilevazione dell'RNA dell'HIV-1 (10/152) è 0,35 copie/UI.

^b Il valore viene troncato a due cifre decimali.

^c L'interpretazione diagnostica può essere effettuata con campioni di siero o di plasma che non sono stati diluiti.

^d I risultati non validi vengono visualizzati in blu.

Limiti

- A. L'uso di questo test va limitato al personale che è stato addestrato nella relativa procedura. La mancata osservanza delle istruzioni fornite in questo foglietto illustrativo può determinare risultati erranei.
- B. L'affidabilità dei risultati è subordinata alla raccolta, al trasporto, alla conservazione e al trattamento adeguati del campione.
- C. Questo test è stato convalidato per l'uso come test quantitativo solo con plasma umano.
- D. Questo test è stato convalidato per l'uso come test qualitativo con plasma e siero umani.
- E. Sebbene rare, le mutazioni all'interno delle regioni altamente conservate del genoma virale coperto dai primer e/o dalle sonde nell'Aptima HIV-1 Quant Dx Assay possono determinare una quantificazione insufficiente del virus o il mancato rilevamento dello stesso.

Prestazioni

Limite di rilevamento (LoD) utilizzando il 3° Standard Internazionale dell'OMS per l'HIV-1

Si definisce Limite di rilevamento (Limit of Detection, LoD) la concentrazione di RNA dell'HIV-1 rilevata con una probabilità del 95% o maggiore in conformità alla linea guida CLSI EP17-A2 (39). L'LoD è stato determinato analizzando pannelli che consistevano di diluizioni del 3° Standard Internazionale dell'OMS per l'HIV-1 (sottotipo B, codice NIBSC: 10/152) in plasma negativo a HIV-1. Trenta replicati di ciascuna diluizione sono stati analizzati con tre Panther System utilizzando tre lotti di reagente, per un totale di 90 replicati per ciascuna diluizione. In conformità alla linea guida CLSI EP17-A2, i risultati generati dal lotto reagenti con la concentrazione più alta per il limite di rilevamento previsto sono definiti come LoD e sono riportati nella Tabella 2. Mediante l'analisi Probit, l'LoD per l'Aptima HIV-1 Quant Dx Assay è di 12 copie/ml (35 UI/ml; 0,35 copie = 1 UI).

Tabella 2 - Limite di rilevamento dell'Aptima HIV-1 Quant Dx Assay utilizzando il 3° Standard Internazionale dell'OMS per l'HIV-1

| Limite di rilevamento previsto | Concentrazione (copie/ml) |
|---------------------------------------|----------------------------------|
| 10% | 1,2 |
| 20% | 1,6 |
| 30% | 2,0 |
| 40% | 2,5 |
| 50% | 3,1 |
| 60% | 3,8 |
| 70% | 4,8 |
| 80% | 6,2 |
| 90% | 9,0 |
| 95% | 12,1 |

Limite di rilevamento nei sottotipi e gruppi HIV-1

Per il gruppo M (sottotipi A, C, D, F, G, CRF01_AE, CRF02_AG) e i gruppi N e O dell'HIV-1, sono stati creati sette pannelli aggiungendo a plasma umano negativo a HIV-1 (0 – 40 copie/ml), virus HIV-1 ottenuto per coltura o campioni clinici positivi. Ciascun elemento del pannello è stato analizzato in 30 replicati con due lotti di reagente per un totale di 60 replicati per elemento del pannello. L'assegnazione della concentrazione dei campioni clinici o degli stock di virus ottenuto per coltura è stata determinata utilizzando un test di confronto. L'analisi Probit è stata eseguita per generare limiti di rilevamento previsti del 50% e 95%. In conformità alla linea guida CLSI EP17-A2 (39), i risultati generati dal lotto reagenti con la concentrazione più alta per il limite di rilevamento previsto sono definiti come LoD e sono riportati nella Tabella 3.

Tabella 3 - Limite di rilevamento nei sottotipi e gruppi HIV-1

| Sottotipo/ Gruppo | Limite di rilevamento previsto | Concentrazione (copie/ml) |
|----------------------|--------------------------------------|------------------------------|
| A | 50% | 3,0 |
| | 95% | 12,3 |
| CRF01_AE | 50% | 1,8 |
| | 95% | 6,2 |
| CRF02_AG | 50% | 3,4 |
| | 95% | 15,4 |
| C | 50% | 2,0 |
| | 95% | 10,7 |
| D | 50% | 3,7 |
| | 95% | 14,0 |
| F | 50% | 2,1 |
| | 95% | 8,3 |
| G | 50% | 3,1 |
| | 95% | 17,5 |
| N | 50% | 1,2 |
| | 95% | 7,8 |
| O | 50% | 1,8 |
| | 95% | 8,0 |

Range lineare

Il range lineare dell'Aptima HIV-1 Quant Dx Assay è stato stabilito analizzando pannelli che consistevano di virus HIV-1, sottotipo B, ottenuto per coltura, diluito in plasma umano negativo a HIV-1 in conformità alla linea guida CLSI EP06-A (40). La concentrazione dei pannelli era compresa fra 1,30 e 7,30 log copie/ml. L'analisi è stata eseguita con sette Panther System con due lotti di reagenti di Aptima HIV-1 Quant Dx Assay. Come illustrato nella Figura 6, l'Aptima Quant Dx Assay ha dimostrato linearità nell'ambito del range analizzato.

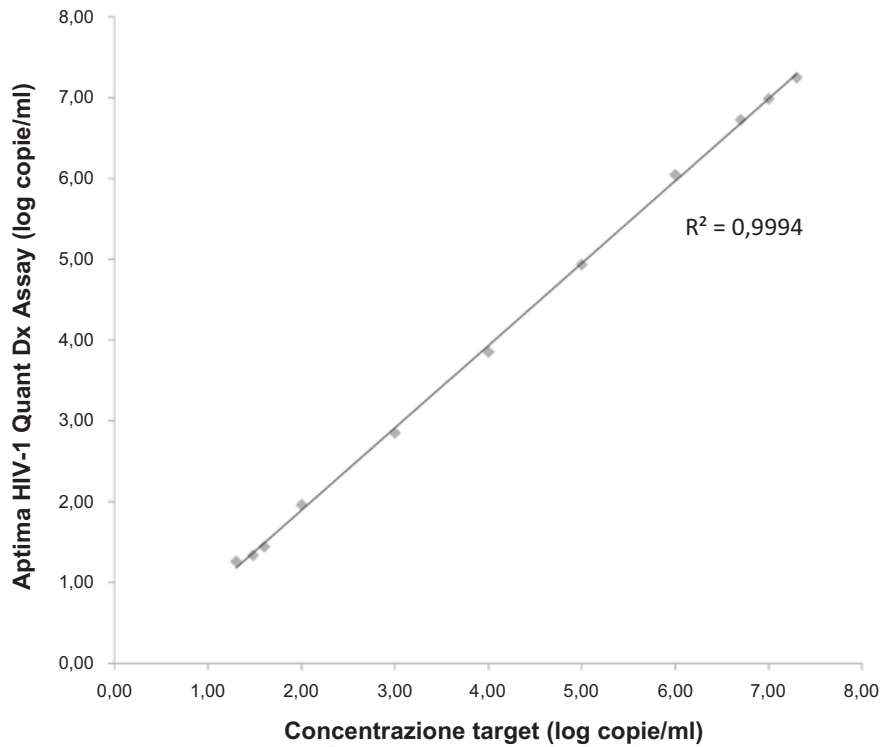


Figura 6. Linearità dell'Aptima HIV-1 Quant Dx Assay

Linearità nei sottotipi e gruppi HIV-1

La risposta lineare dell'Aptima HIV-1 Quant Dx Assay nel gruppo M (sottotipi A, B, C, D, F, G, H, CRF01_AE) e nei gruppi N e O è stata confermata mediante analisi di pannelli costituiti da trascritto di HIV-1 diluito in tampone a concentrazioni comprese fra 2,00 e 6,70 log copie/ml. L'analisi è stata eseguita con quattro Panther System e sei sessioni analitiche. La linearità è stata dimostrata nel range testato (Figura 7).

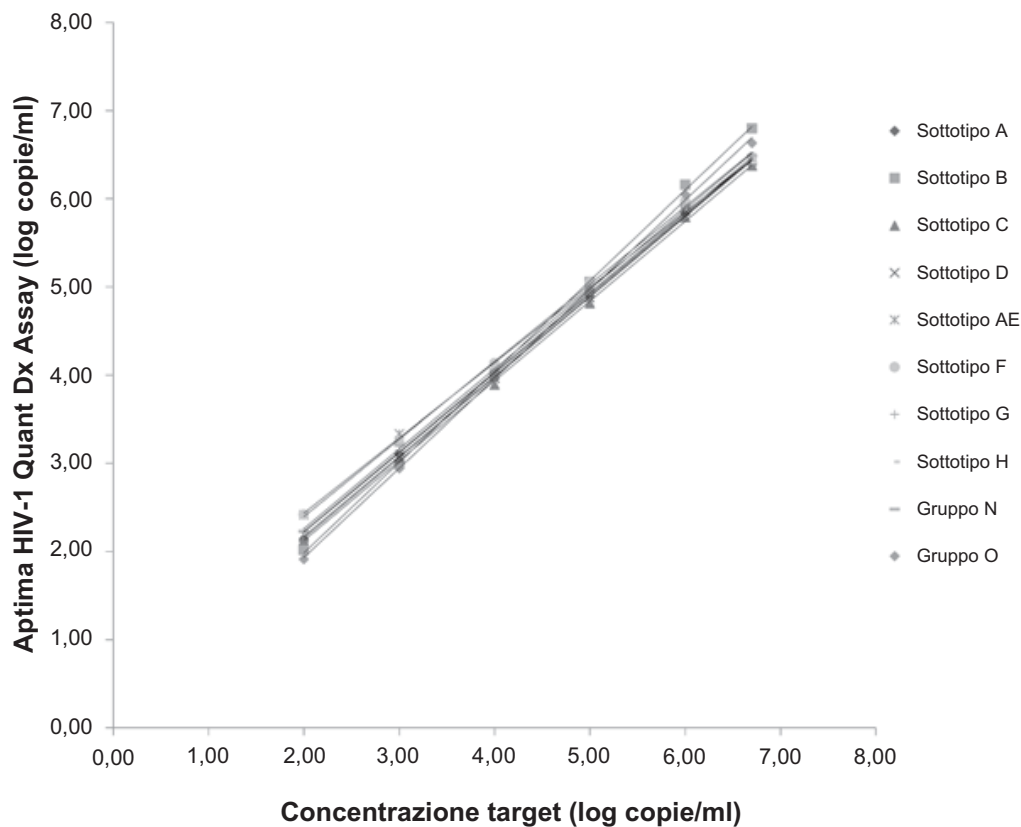


Figura 7. Linearità nel Gruppo M (Sottotipi A, B, C, D, F, G, H, CRF01_AE) e nei Gruppi N e O

Limite inferiore di quantificazione utilizzando il 3° Standard Internazionale dell'OMS HIV-1

Si definisce Limite inferiore di quantificazione (LLOQ) la concentrazione più bassa alla quale l'RNA dell'HIV-1 viene quantificato in modo affidabile nei limiti di un errore totale (Total Error, TE), in conformità alla linea guida CLSI EP17-A2 (39). TE è stato calcolato utilizzando il modello di Westgard ($TE = |bias| + 2DS$). Per garantire l'accuratezza e la precisione delle misurazioni, il TE dell'Aptima HIV-1 Quant Dx Assay è stato impostato a 1 log copie/ml (vale a dire che all'LLOQ, la differenza di più di 1 log copie/ml fra due misurazioni ha significatività statistica).

L'LLOQ è stato determinato analizzando pannelli che consistevano di diluizioni del 3° Standard Internazionale dell'OMS per l'HIV-1 (sottotipo B, codice NIBSC: 10/152) in plasma negativo a HIV-1. In conformità alla linea guida CLSI EP17-A2, i pannelli sono stati analizzati con tre lotti di reagenti in replicati di 30 per ciascun lotto in 23 sessioni analitiche. I risultati sono riportati nella Tabella 4. L'LLOQ più alto per i tre lotti analizzati con l'Aptima HIV-1 Quant Dx Assay utilizzando il 3° Standard Internazionale dell'OMS per l'HIV-1 è 15 copie/ml (1,17 copie log/ml) (Tabella 5).

Tabella 4 - Determinazione dell'LLOQ dell'Aptima HIV-1 Quant Dx Assay utilizzando il 3° Standard Internazionale dell'OMS per l'HIV-1

| Lotto reagenti | Concentrazione target (log copie/ml) | Aptima HIV-1 Quant Dx (log copie/ml) | DS (log copie/ml) | Bias (log copie/ml) | TE calcolato (log copie/ml) |
|----------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-------------------|----------------------|-----------------------------|
| 1 | 1,15 | 1,05 | 0,37 | 0,10 | 0,84 |
| | 1,24 | 0,94 | 0,35 | 0,30 | 1,00 |
| | 1,42 | 1,37 | 0,33 | 0,05 | 0,71 |
| | 1,54 | 1,47 | 0,22 | 0,07 | 0,50 |
| | 1,94 | 1,98 | 0,13 | 0,04 | 0,30 |
| | 2,42 | 2,45 | 0,07 | 0,03 | 0,17 |
| 2 | 1,15 | 0,50 | 0,33 | 0,65 | 1,31 |
| | 1,24 | 0,80 | 0,44 | 0,45 | 1,33 |
| | 1,42 | 0,93 | 0,37 | 0,49 | 1,24 |
| | 1,54 | 1,17 | 0,31 | 0,38 | 0,99 |
| | 1,94 | 1,75 | 0,21 | 0,19 | 0,62 |
| | 2,42 | 2,28 | 0,21 | 0,14 | 0,55 |
| 3 | 1,15 | 0,88 | 0,41 | 0,26 | 1,09 |
| | 1,24 | 0,98 | 0,35 | 0,27 | 0,97 |
| | 1,42 | 1,15 | 0,34 | 0,27 | 0,96 |
| | 1,54 | 1,35 | 0,37 | 0,20 | 0,93 |
| | 1,94 | 1,84 | 0,17 | 0,11 | 0,44 |
| | 2,42 | 2,37 | 0,11 | 0,05 | 0,27 |

DS = deviazione standard

Tabella 5 - Sommario dell'LLoQ utilizzando il 3° Standard Internazionale dell'OMS per l'HIV-1 (3 lotti di reagenti)

| Lotto reagenti | LLoQ (log copie/ml) | LLoQ (copie/ml) |
|----------------|------------------------|--------------------|
| 1 | 0,94 | 8,7 |
| 2 | 1,17 | 15 |
| 3 | 0,98 | 9,5 |

Verifica dell'LLoQ nei sottotipi e gruppi HIV-1

L'LLoQ nei sottotipi e gruppi HIV-1 è stato verificato in conformità alla linea guida CLSI EP17-A2 (39). Per ciascun gruppo HIV-1 M (sottotipi A, B, C, D, F, G, CRF01_AE, CRF02_AG) e per i gruppi N e O, i pannelli sono stati creati aggiungendo a plasma umano combinato in pool negativo a HIV-1 isolati clinici o campioni clinici naturalmente infetti. Sono stati analizzati in totale 30 replicati per elemento del pannello. I dati riportati nella Tabella 6 mostrano la più bassa concentrazione per ciascun sottotipo o gruppo alla quale TE era inferiore a 1 log copie/ml. L'LLoQ più alto per tutti i sottotipi e gruppi analizzati era pari a 30 copie/ml; pertanto, questo valore più alto è stato scelto come l'LLoQ per l'Aptima HIV-1 Quant Dx Assay.

Tabella 6 - Verifica dell'LLoQ in base al sottotipo o gruppo HIV-1

| Pannello | LLoQ (copie/ml) |
|--------------------|--------------------|
| Sottotipo A | 30 |
| Sottotipo CRF01_AE | 10 |
| Sottotipo CRF02_AG | 30 |
| Sottotipo B | 10 |
| Sottotipo C | 30 |
| Sottotipo D | 15 |
| Sottotipo F | 15 |
| Sottotipo G | 30 |
| Gruppo N | 10 |
| Gruppo O | 15 |

Precisione

Per valutare la precisione dell'Aptima HIV-1 Quant Dx Assay, un pannello creato aggiungendo virus HIV-1, sottotipo B, ottenuto per coltura, in plasma negativo a HIV-1, è stato analizzato da tre operatori utilizzando tre lotti di reagenti con tre Panther System nell'arco di 20 giorni (Tabella 7). Il pannello era costituito da un elemento negativo a HIV-1 e da otto elementi positivi a HIV-1. L'assegnazione della concentrazione dei campioni clinici o degli stock di virus ottenuto per coltura è stata determinata utilizzando un test di confronto.

Tabella 7 - Precisione dell'Aptima HIV-1 Quant Dx Assay

| Numero di replicati validi | Concentrazione media (log copie/ml) | Tra strumenti | | Tra operatori | | Tra lotti | | Tra sessioni analitiche | | Nella sessione analitica | | Totale | |
|----------------------------|-------------------------------------|---------------|--------|---------------|--------|-----------|--------|-------------------------|--------|--------------------------|--------|--------|--------|
| | | DS | CV (%) | DS | CV (%) | DS | CV (%) | DS | CV (%) | DS | CV (%) | DS | CV (%) |
| 137 | 1,80 | 0,00 | 0,00 | 0,03 | 1,72 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,16 | 8,93 | 0,16 | 9,10 |
| 157 | 2,37 | 0,00 | 0,00 | 0,05 | 2,08 | 0,01 | 0,36 | 0,08 | 3,33 | 0,15 | 6,19 | 0,17 | 7,34 |
| 160 | 2,47 ^a | 0,00 | 0,00 | 0,03 | 1,37 | 0,03 | 1,35 | 0,07 | 2,97 | 0,12 | 5,03 | 0,15 | 6,15 |
| 162 | 2,95 | 0,00 | 0,00 | 0,08 | 2,57 | 0,02 | 0,61 | 0,10 | 3,29 | 0,09 | 3,04 | 0,15 | 5,20 |
| 162 | 3,80 | 0,01 | 0,32 | 0,03 | 0,80 | 0,02 | 0,48 | 0,06 | 1,49 | 0,07 | 1,80 | 0,10 | 2,53 |
| 159 | 4,93 | 0,00 | 0,00 | 0,02 | 0,37 | 0,04 | 0,77 | 0,05 | 1,10 | 0,04 | 0,71 | 0,08 | 1,56 |
| 162 | 5,69 | 0,00 | 0,00 | 0,02 | 0,27 | 0,04 | 0,66 | 0,03 | 0,58 | 0,07 | 1,29 | 0,09 | 1,58 |
| 162 | 6,71 | 0,00 | 0,00 | 0,01 | 0,22 | 0,04 | 0,52 | 0,04 | 0,60 | 0,05 | 0,78 | 0,08 | 1,13 |

CV = coefficiente di variazione, DS = deviazione standard

^a Questo elemento del pannello è stato diluito 1:3 con diluente per campioni e analizzato per valutare la precisione del campione diluito.

Nota- La variabilità da alcuni fattori potrebbe risultare numericamente negativa, il che può verificarsi se la variabilità dovuta a quei fattori è molto piccola. Quando questo si verifica, DS = 0 e CV = 0%. Il numero totale di replicati testati per ciascun pannello era 162; sono stati analizzati solo replicati con un valore numerico.

Sostanze potenzialmente interferenti

È stata valutata la suscettibilità dell'Aptima HIV-1 Quant Dx Assay a interferenza da livelli elevati di sostanze endogene e da farmaci comunemente prescritti ai soggetti con infezione da HIV-1. Sono stati analizzati campioni di plasma umano negativi all'HIV-1 e campioni corretti a una concentrazione di 3 log copie/ml di RNA dell'HIV-1.

Non è stata osservata interferenza nelle prestazioni dell'Aptima HIV-1 Quant Dx Assay in presenza di albumina (90 mg/ml), emoglobina (5 mg/ml), trigliceridi (30 mg/ml) o bilirubina non coniugata (0,2 mg/ml).

Non è stata osservata interferenza nelle prestazioni dell'Aptima HIV-1 Quant Dx Assay in presenza delle sostanze esogene elencate nella Tabella 8 a concentrazioni almeno tre volte superiori a C_{max} (plasma umano).

Tabella 8 - Sostanze esogene

| Pool di sostanze esogene | Sostanze esogene analizzate |
|--------------------------|--|
| 1 | Lopinavir, indinavir, saquinavir, ritonavir, nelfinavir mesilato, darunavir, amprenavir, atazanavir |
| 2 | Nevirapina, efavirenz, rilpivirina, claritromicina, amfotericina B |
| 3 | Tenofovir disoproxil fumarato, adefovir dipivoxil, ribavirina, enfuvirtide, maraviroc, raltegravir, dolutegravir |
| 4 | Abacavir solfato, didanosina, zidovudina, lamivudina, stavudina, entecavir, telbivudina, emtricitabina |
| 5 | Paroxetina HCl, fluoxetina, sertralina |
| 6 | Ganciclovir, valacyclovir, acyclovir, rifampina/rifampicina, etambutolo |
| 7 | Ciprofloxacina, azitromicina, amoxicillina, cefalexina, ampicillina, trimethoprim |
| 8 | Valganciclovir cloridrato, boceprevir, telaprevir, simeprevir, sofosbuvir |
| 9 | Interferone peghilato alfa-2b, interferone alfa-2a, interferone alfa-2b |
| 10 | Eparina, EDTA, citrato di sodio |
| 11 | Tipranavir |
| 12 | Isoniazid |

I campioni clinici di plasma elencati nella Tabella 9 provenienti da pazienti con livelli elevati di sostanze definite o da pazienti affetti dalle malattie elencate sono stati analizzati con l'Aptima HIV-1 Quant Dx Assay con e senza la presenza di 3 log copie di RNA dell'HIV-1. Non è stata osservata interferenza nelle prestazioni.

Tabella 9 - Tipi di campioni clinici testati

| Tipi di campioni clinici | |
|--------------------------|--|
| 1 | Fattore reumatoide (RF) |
| 2 | Anticorpo antinucleare (ANA) |
| 3 | Anticorpo anti-Jo-1 (JO-1) |
| 4 | Lupus eritematoso sistemico (SLE) |
| 5 | Artrite reumatoide (RA) |
| 6 | Sclerosi multipla (MS) |
| 7 | Iperglobulinemia |
| 8 | Alanina aminotransferasi (ALT) elevata |
| 9 | Cirrosi alcolica (AC) |
| 10 | Mieloma multiplo (MM) |
| 11 | Lipemici (lipidi elevati) |
| 12 | Itterici (bilirubina elevata) |
| 13 | Emolizzati (emoglobina elevata) |
| 14 | Albumina elevata |
| 15 | Anticorpi HCV |
| 16 | Anticorpi HBV |
| 17 | Anticorpi HIV-2 |

Specificità

La specificità dell'Aptima HIV-1 Quant Dx Assay è stata determinata utilizzando 120 campioni di plasma negativi a HIV-1 appena preparati e 510 congelati, e utilizzando 120 campioni di siero negativi a HIV-1 appena preparati e 510 congelati. Tutti sono risultati non reattivi (specificità del 100%; IC 95%: 99,4-100%).

Tabella 10 - Specificità nei campioni di plasma e siero

| | Plasma appena preparato | Plasma congelato | Plasma totale | Siero appena preparato | Siero congelato | Siero totale |
|-----------------------------|-------------------------|--------------------|--------------------|------------------------|--------------------|--------------------|
| Replicati validi (n) | 120 | 510 | 630 | 120 | 510 | 630 |
| Non reattivo | 120 | 510 | 630 | 120 | 510 | 630 |
| Specificità (IC 95%) | 100% (97,0-100) | 100% (99,3-100) | 100% (99,4-100) | 100% (97,0-100) | 100% (99,3-100) | 100% (99,4-100) |

IC = intervallo di confidenza

Specificità analitica

La potenziale reattività crociata con i patogeni (Tabella 11) è stata valutata nell'Aptima HIV-1 Quant Dx Assay in presenza o assenza di 3 log copie/ml di RNA dell'HIV-1 in plasma negativo a HIV-1. Non è stata osservata alcuna interferenza nelle prestazioni del test in presenza dei patogeni.

Tabella 11 - Patogeni analizzati per la specificità analitica

| Patogeno | Concentrazione |
|--|-------------------------------|
| Virus dell'epatite A | 100.000 PFU/ml ^a |
| Virus dell'epatite B | 100.000 UI/ml ^b |
| Virus dell'epatite C | 100.000 UI/ml |
| Virus dell'epatite G | 100.000 copie/ml |
| Virus dell'herpes simplex 1 (HSV-1) | 100.000 PFU/ml |
| Virus dell'herpes simplex 2 (HSV-2) | 75.000 PFU/ml |
| Virus dell'herpes umano 6 | 100.000 copie/ml |
| Virus dell'herpes umano 8 | 42.000 PFU/ml |
| HIV-2 | 5.500 PFU/ml |
| Virus della leucemia a cellule T dell'uomo (HTLV) | 100.000 vp/ml ^c |
| Virus del Nilo occidentale | 100.000 copie/ml |
| Parvovirus B19 | 100.000 UI/ml |
| Citomegalovirus | 100.000 copie/ml |
| Virus di Epstein-Barr | 100.000 copie/ml |
| Adenovirus tipo 5 | 100.000 PFU/ml |
| Virus Dengue | 100.000 copie/ml |
| Virus dell'influenza A | 100.000 PFU/ml |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 1.000.000 CFU/ml ^d |
| <i>Propionibacterium acnes</i> | 1.000.000 CFU/ml |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 1.000.000 CFU/ml |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | 1.000.000 CFU/ml |
| <i>Chlamydia trachomatis</i> | 300.000 IFU/ml ^e |
| <i>Candida albicans</i> | 1.000.000 CFU/ml |

^a PFU/ml = Unità formanti placche per ml.

^b UI/ml = Unità internazionali per ml.

^c vp/ml = Particelle virali per ml.

^d CFU/ml = Unità formanti colonie per ml.

^e IFU/ml = Unità formanti inclusioni per ml.

Ripetibilità dei campioni clinici

Dieci campioni clinici di plasma sono stati analizzati in tre replicati utilizzando l'Aptima HIV-1 Quant Dx Assay. La concentrazione media e la deviazione standard sono riportate nella Tabella 12.

Tabella 12 - Ripetibilità dei campioni clinici

| Campione biologico | Concentrazione media (log copie/ml) | DS |
|---------------------------|--|-----------|
| 1 | 2,57 | 0,06 |
| 2 | 3,20 | 0,03 |
| 3 | 3,24 | 0,06 |
| 4 | 3,97 | 0,02 |
| 5 | 4,20 | 0,05 |
| 6 | 4,85 | 0,01 |
| 7 | 5,17 | 0,04 |
| 8 | 5,51 | 0,06 |
| 9 | 5,84 | 0,02 |
| 10 | 6,64 | 0,00 |

Diluizione dei campioni con il diluente per campioni biologici

Per valutare la diluizione dei campioni, è stato analizzato un pannello costituito da 11 campioni aventi concentrazioni che abbracciavano il range lineare dell'Aptima HIV-1 Quant Dx Assay e da due campioni sopra il limite superiore di quantificazione del test, non diluiti e diluiti (1:3 o 1:100 in diluente del campione) in triplicato (Tabella 13).

Tabella 13 - Diluizione dei campioni

| Diluizione | Concentrazione media del campione non diluito (log copie/ml) | Concentrazione media riportata ^a (log copie/ml) | Differenza |
|------------|--|--|------------|
| 1:3 | 2,57 | 2,72 | 0,15 |
| | 3,20 | 3,33 | 0,13 |
| | 3,24 | 3,55 | 0,30 |
| | 3,97 | 4,05 | 0,07 |
| | 4,20 | 4,24 | 0,04 |
| | 4,85 | 4,81 | -0,04 |
| | 5,17 | 5,08 | -0,08 |
| | 5,51 | 5,32 | -0,19 |
| | 5,84 | 5,94 | 0,10 |
| | 6,64 | 6,66 | 0,02 |
| | 2,46 ^b | 2,19 | -0,27 |
| 1:100 | >7,00 (7,16 ^c) | 7,48 | 0,32 |
| 1:100 | >7,00 (7,40 ^c) ^b | 7,39 | -0,01 |

^a La concentrazione riportata è il valore riportato dal Panther System dopo che è stato applicato il fattore di diluizione.

^b Campione biologico corretto.

^c Tutti i risultati >7,00 log copie/ml sono stati stimati utilizzando un'analisi addizionale.

Correlazione fra metodi

Le prestazioni dell'Aptima HIV-1 Quant Dx Assay sono state determinate confrontandole con quelle di un test di confronto con marchio CE analizzando campioni clinici di plasma non diluiti provenienti da pazienti con infezione da HIV-1, utilizzando quattro Panther System con due lotti di reagenti. Un totale di 342 campioni di plasma congelati e 108 campioni di plasma appena preparati, aventi risultati quantificabili sia con l'Aptima HIV-1 Quant Dx Assay che con il test di confronto sono stati utilizzati per la regressione lineare (Figura 8). I campioni biologici includevano HIV-1 gruppo M (sottotipi A, B, C, D, F, G, H, CRF01_AE, CRF02_AG).

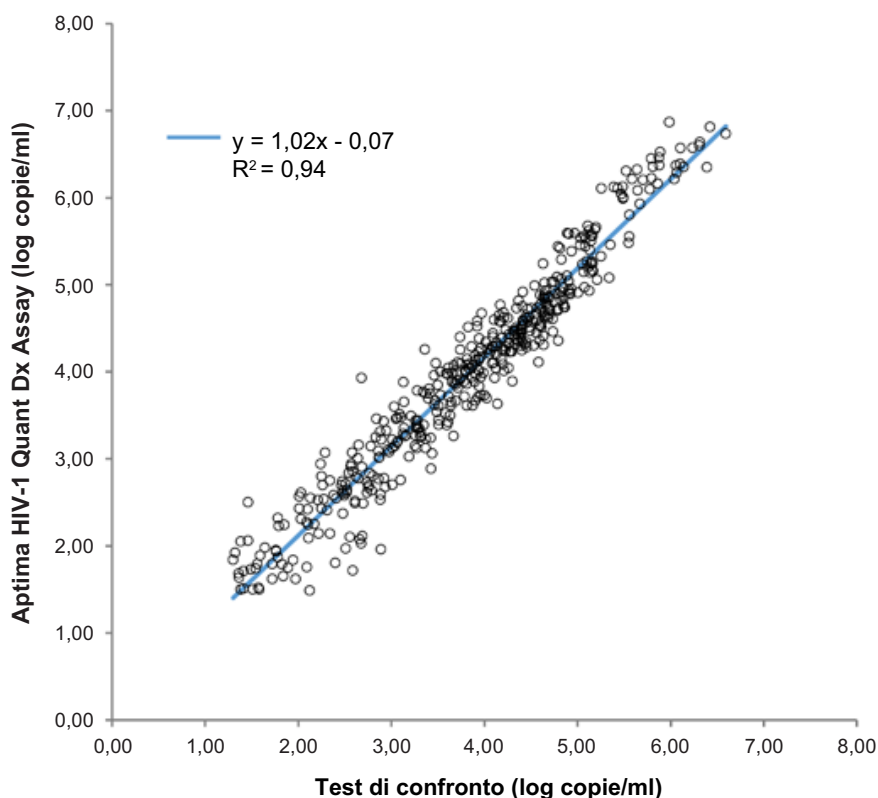


Figura 8. Correlazione fra l'Aptima HIV-1 Quant Dx Assay e il test di confronto

Concordanza diagnostica

Per determinare la concordanza diagnostica, i campioni biologici di individui positivi a HIV-1 sono stati analizzati utilizzando l'Aptima HIV-1 Quant Dx Assay e un test qualitativo di confronto per HIV-1 con marchio CE: 414 campioni biologici avevano risultati validi (Tabella 14). I risultati di entrambi i test sono stati categorizzati nel modo seguente. I risultati con risultato quantificabile o rilevabile sono stati categorizzati come "Rilevato". Tutti i risultati di target non rilevato sono stati categorizzati come "Target non rilevato".

Tabella 14 - Concordanza diagnostica fra l'Aptima HIV-1 Quant Dx Assay e il test di confronto

| | | Aptima HIV-1 Quant Dx Assay | |
|-------------------|---------------------|-----------------------------|---------------------|
| | | Rilevato | Target non rilevato |
| Test di confronto | Rilevato | 214 | 0 |
| | Target non rilevato | 0 | 200 |

Contaminazione crociata

Per stabilire che il Panther System riduce al minimo il rischio di risultati falsi positivi causati da contaminazione crociata, è stato condotto uno studio analitico con più sessioni analitiche che ha impiegato pannelli corretti su due Panther System. La contaminazione crociata è stata valutata utilizzando campioni corretti con HIV-1 ad alto titolo (7 log copie/ml) disseminati fra campioni negativi all'HIV-1 in una disposizione a scacchiera. L'analisi è stata eseguita nel corso di cinque sessioni analitiche. Il tasso generale di contaminazione crociata era dello 0% (n = 469).

Pannello di sieroconversione

Diciannove set di pannelli di sieroconversione per HIV-1, costituiti da 204 campioni, sono stati analizzati utilizzando l'Aptima HIV-1 Quant Dx Assay. Il rilevamento dell'RNA dell'HIV-1 è stato messo a confronto con i test dell'antigene p24 e con i test degli anticorpi HIV-1/2. Il numero di giorni fino al primo risultato reattivo utilizzando i test dell'antigene p24, i test degli anticorpi anti-HIV 1/2 e l'Aptima HIV-1 Quant Dx Assay è riportato nella Tabella 15. L'Aptima HIV-1 Quant Dx Assay ha rilevato l'RNA dell'HIV-1 in media 5,58 e 11,16 giorni prima dei test dell'anticorpo dell'antigene p24 e anti-HIV 1/2.

Tabella 15 - Riepilogo dei dati dei pannelli di sieroconversione

| ID pannello | Numero di elementi testati | Numero di elementi reattivi | | | Giorni al primo risultato reattivo | | | Differenza in giorni al primo risultato reattivo (in base alla data del prelievo) | |
|---------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------|------------------------|------------------------------------|-----------------------|------------------------|---|--|
| | | Aptima HIV-1 Quant Dx | Antigene p24 dell'HIV | Anticorpo anti-HIV 1/2 | Aptima HIV-1 Quant Dx | Antigene p24 dell'HIV | Anticorpo anti-HIV 1/2 | Giorni di rilevamento in anticipo rispetto ad Antigene p24 dell'HIV | Giorni di rilevamento in anticipo rispetto ad Anticorpo anti-HIV 1/2 |
| 6248 | 7 | 3 | 2 | 1 | 14 | 18 | 25 | 4 | 11 |
| 6243 | 10 | 6 | 3 | 2 | 18 | 25 | 32 | 7 | 14 |
| 6247 | 9 | 4 | 4 | 1 | 21 | 21 | 30 | 0 | 9 |
| 9016 | 10 | 3 | 2 | 0 | 27 | 30 | 34 ^a | 3 | 7 |
| 9018 | 11 | 5 | 3 | 2 | 21 | 28 | 32 | 7 | 11 |
| 9020 | 22 | 5 | 4 | 1 | 83 | 87 | 97 | 4 | 14 |
| 9021 | 17 | 5 | 4 | 1 | 43 | 47 | 57 | 4 | 14 |
| 9022 | 9 | 3 | 2 | 1 | 23 | 25 | 32 | 2 | 9 |
| 9023 | 22 | 5 | 3 | 0 | 71 | 78 | 85 ^a | 7 | 14 |
| 9030 | 16 | 5 | 3 | 1 | 40 | 47 | 54 | 7 | 14 |
| 9034 | 13 | 4 | 3 | 1 | 41 | 46 | 53 | 5 | 12 |
| 9089 | 6 | 5 | 3 | 2 | 7 | 16 | 20 | 9 | 13 |
| 12008 | 13 | 7 | 4 | 4 | 21 | 28 | 33 | 7 | 12 |
| PRB962 | 6 | 4 | 2 | 0 | 7 | 14 | 17 ^a | 7 | 10 |
| PRB963 | 7 | 4 | 2 | 0 | 9 | 17 | 21 ^a | 8 | 12 |
| PRB966 | 10 | 5 | 3 | 2 | 35 | 44 | 48 | 9 | 13 |
| PRB974 ^b | 4 | 3 | 2 | 1 | 7 | 9 | 16 | 2 | 9 |
| PRB975 ^b | 5 | 3 | 1 | 0 | 7 | 14 | 14 ^a | 7 | 7 |
| PRB978 ^b | 7 | 3 | 1 | 0 | 26 | 33 | 33 ^a | 7 | 7 |
| Totale | 204 | 82 | 51 | 20 | | | Media | 5,58 | 11,16 |
| | | | | | | | Mediana | 7 | 12 |

^a Tutti i prelievi di questo pannello erano risultati non reattivi per l'anticorpo anti-HIV 1/2. Il giorno dell'ultimo prelievo è stato usato come il valore "Giorni al primo risultato reattivo".

Il test degli anticorpi anti-HIV-1/2 è stato completato con il prodotto Abbott Anti-HIV 1/2, con le seguenti eccezioni:

^b I pannelli PRB974, PRB975 e PRB978 sono stati analizzati con il test Siemens Anti-HIV 1/2.

Il test dell'antigene p24 dell'HIV-1 è stato completato con il prodotto Coulter HIV-1 p24 Ag, con le seguenti eccezioni:

^b I pannelli PRB974, PRB975 e PRB978 sono stati analizzati con il test BioMerieux p24 Ag.

Studio di equivalenza con siero e plasma

Set corrispondenti di siero e plasma (25 HIV-1 positivi e 25 HIV-1 negativi), e 40 campioni che erano stati corretti con HIV-1 ottenuto per coltura ($50-1.000.000$ copie/ml in plasma e siero negativi a HIV-1) sono stati analizzati con l'Aptima HIV-1 Quant Dx Assay per valutare l'equivalenza. La concordanza dei negativi era pari al 100,0% (IC 95%: 97,0%-100,0%). La concordanza dei positivi era pari al 98,4% (IC 95%: 95,4%-99,5%).

Bibliografia

1. **Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dauguet, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouziuz, W. Rozenbaum, and L. Montagnier.** 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). *Science* **220**:868–871.
2. **Popovic, M., M. G. Sarngadharan, E. Read, and R. C. Gallo.** 1984. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* **224**:497–500.
3. **Gallo R. C., S. Z. Salahuddin, M. Popovic, G. M. Streater, M. Kaplan, D. F. Haynas, T. J. Palker, R. Redfield, J. Oleske, B. Safai, G. White, P. Foster, and P. D. Markham.** 1984. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* **224**:500–503.
4. **Piot, P., F. A. Plummer, F. S. Mhalu, J-L. Lamboray, J. Chin, and J. M. Mann.** 1988. AIDS: An international perspective. *Science* **239**:573–579.
5. **Sarngadharan, J. G., M. Popovic, L. Broch, J. Scupbach, and R. C. Gallo.** 1984. Antibodies reactive with human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) in the serum of patients with AIDS. *Science* **224**:506–508.
6. **Gallo, D., J. S. Kimpton, and P. J. Dailey.** 1987. Comparative studies on use of fresh and frozen peripheral blood lymphocyte specimens for isolation of human immunodeficiency virus and effects of cell lysis on isolation efficiency. *J. Clin. Microbiol.* **25**:1291–1294.
7. **Clavel, F., D. Guetard, F. Brun-Vezinet, S. Chamaret, M. Rey, M. O. Santos-Ferraira, A. G. Laurent, C. Dauguet, C. Katlama, C. Rouzioux, D. Klatzmann, J. L. Champalimaud, and L. Montagnier.** 1986. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* **233**:343–346.
8. **Curran, J. W., H. W. Jaffe, A. M. Hardy, W. M. Morgan, R. M. Selik, and T. J. Dondero.** 1988. Epidemiology of HIV Infection and AIDS in the United States. *Science* **239**:610–616.
9. **Gaines, H., M. A. von Sydow, and L.V. von Stedingk.** 1990. Immunological changes in primary HIV-1 infection. *AIDS* **4**:995–999.
10. **Tindall, B., and D. A. Cooper.** 1991. Primary HIV-1 infection: host responses and intervention strategies. *AIDS* **5**:1–14.
11. **Daar, E. S., T. Moudgil, R. D. Meyer, and D. D. Ho.** 1991. Transient high levels of viremia in patients with primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *N. Engl. J. Med.* **324**:961–964.
12. **Clark, S. J., M. S. Saag, and W. D. Decker.** 1991. High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection. *N. Engl. J. Medicine* **324**:954–960.
13. **Albert J., B. Abrahamsson, K. Nagy, E. Aurelius, H. Gaines, G. Nystrom, and E. M. Fenyo.** 1990. Rapid development of isolate-specific neutralizing antibodies after primary HIV-1 infection and consequent emergence of virus variants which resist neutralization by autologous sera. *AIDS* **4**:107–112.
14. **Horsburgh, C. R. Jr., C. Y. Ou, J. Jason, S. D. Holmberg, I. M. Longini Jr., C. Schable, K. H. Mayer, A. R. Lifson, G. Schochetman, J. W. Ward, et al.** 1989. Duration of human immunodeficiency virus infection before detection of antibody. *Lancet* **16**:637–640.
15. **Schnittman, S. M., M. C. Psallidopoulos, H. C. Lane, L. Thompson, M. Baseler, F. Massari, C. H. Fox, N. P. Salzman, and A. S. Fauci.** 1989. The reservoir for HIV-1 in human peripheral blood is a T cell that maintains expression of CD4. *Science* **245**:305–308. Erratum in: *Science* 1989 **245**, preceding 694.
16. **Schnittman, S. M., J. J. Greenhouse, M. C. Psallidopoulos, M. Baseler, N. P. Salzman, A. S. Fauci, and H. C. Lane.** 1990. Increasing viral burden in CD4+ T cells from patients with human immunodeficiency virus (HIV) infection reflects rapidly progressive immunosuppression and clinical disease. *Ann. Intern. Med.* **113**:438–443.
17. **Pantaleo, G., C. Graziosi, and A. S. Fauci.** 1993. New concepts in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *N. Engl. J. Med.* **328**:327–335.
18. **Piatak, M. Jr., M. S. Saag, L. C. Yang, S. J. Clark, J. C. Kappes, K. C. Luk, B. H. Hahn, G. M. Shaw, and J. D. Lifson.** 1993. High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science* **259**:1749–1754.
19. **Fauci, A. S., S. M. Schnittman, G. Poli, S. Koenig, and G. Pantaleo.** 1991. NIH conference: immunopathogenic mechanisms in human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Ann. Intern. Med.* **114**:678–693.
20. **Coffin, J. M.** 1995. HIV-1 population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science* **267**:483–489.
21. **Ho, D. D., A. U. Neumann, A. S. Perelson, W. Chen, J. M. Leonard, and M. Markowitz.** 1995. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* **373**:123–126.
22. **Wei, X., S. K. Ghosh, M. E. Taylor, V. A. Johnson, E. A. Emini, P. Deutsch, J. D. Lifson, S. Bonhoeffer, M. A. Nowak, B. H. Hahn et al.** 1995. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* **373**:117–122.
23. **O'Brien, W. A., P. M. Hartigan, D. Martin, J. Esinhardt, A. Hill, S. Benoit, M. Rubin, M. S. Simberkoff, and J. D. Hamilton.** 1996. Changes in plasma HIV-1 RNA and CD4 lymphocyte counts and the risk of progression to AIDS. Veterans Affairs Cooperative Study Group on AIDS. *N. Engl. J. Med.* **334**:426–431.
24. **Welles, S. L., J. B. Jackson, B. Yen-Lieberman, L. Demeter, A. J. Japour, L. M. Smeaton, V. A. Johnson, D. R. Kuritzkes, R. T. D'Aquila, P. A. Reichelderfer, D. D. Richman, R. Reichman, M. Fischl, R. Dolin, R. W. Coombs, J. O. Kahn, C. McLaren, J. Todd, S. Kwok, and C. S. Crumpacker.** 1996. Prognostic value of plasma Human Immunodeficiency Virus Type I (HIV-1) RNA

- levels in patients with advanced HIV-1 disease and with little or no zidovudine therapy. AIDS Clinical Trials Group Protocol 116A/116B/117 Team. *J. Infect. Dis.* **174**:696–703.
25. **Coombs, R. W., S. L. Welles, C. Hooper, P. S. Reichelderfer, R. T. D'Aquila, A. J. Japour, V. A. Johnson, D. R. Kuritzkes, D. D. Richman, S. Kwok, J. Todd, J. B. Jackson, V. DeGruttola, C. S. Crumpacker, and J. Kahn.** 1996. Association of plasma Human Immunodeficiency Virus Type I RNA level with risk of clinical progression in patients with advanced infection. AIDS Clinical Trials Group (ACTG) 116B/117 Study Team. ACTG Virology Committee Resistance and HIV-1 RNA Working Groups. *J. Infect. Dis.* **174**:704–712.
 26. **Hammer, S., C. Crumpacker, R. D'Aquila, B. Jackson, J. Lathey, D. Livnat, and P. Reichelderfer.** 1993. Use of virologic assays for detection of human immunodeficiency virus in clinical trials: Recommendations of the AIDS Clinical Trials Group Virology Committee. *J. Clin. Microbiol.* **31**:2557–2564.
 27. **Schochetman, G., and J. R. George,** ed. 1994. *AIDS Testing: A Comprehensive Guide To Technical, Medical, Social, Legal and Management Issues*, 2nd ed. Springer-Verlag, New York.
 28. **Mulder, J., N. McKinney, C. Christopherson, J. Sninsky, L. Greenfield, and S. Kwok.** 1994. Rapid and simple PCR assay for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma: application to acute retroviral infection. *J. Clin. Microbiol.* **32**:292–300.
 29. **Dewar, R. L., H. C. Highbarger, M. D. Sarmiento, J. A. Todd, M. B. Vasudevachari, R. T. Davey, Jr., J. A. Kovacs, N. P. Salzman, H. C. Lane, and M. S. Urdea.** 1994. Application of branched DNA signal amplification to monitor human immunodeficiency virus type 1 burden in human plasma. *J. Infect. Dis.* **170**:1172–1179.
 30. **van Gemen, B., T. Kievits, R. Schukink, D. van Strijp, L. T. Malek, R. Sooknanan, H. G. Huisman, and P. Lens.** 1993. Quantification of HIV-1 RNA in plasma using NASBA during HIV-1 primary infection. *J. Virol. Methods* **43**:177–187.
 31. **Centers for Disease Control and Association of Public Health Laboratories.** 2014. Laboratory testing for the diagnosis of HIV infection: Updated recommendations.
 32. **Pandori, M. W., J. Hackett Jr., B. Louie, A. Vallari, T. Dowling, S. Liska, and J. D. Klausner.** 2009. Assessment of the ability of a fourth-generation immunoassay for human immunodeficiency virus (HIV) antibody and p24 antigen to detect both acute and recent HIV infections in a high-risk setting. *J. Clin. Microbiol.* **47**:2639–2642.
 33. **Gill, P. and Ghaemi, A.** 2008. Nucleic acid isothermal amplification technologies: a review. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* **27**(3):224–43.
 34. **Hill, C.** 2001. Molecular diagnostic testing for infectious diseases using TMA technology. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **1**(4): 445–455.
 35. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2005. *Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods; Approved Guideline.* CLSI Document MM13-A. Wayne, PA.
 36. **29 CFR Part 1910.1030.** Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens; current version.
 37. **Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health.** *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL); current version.*
 38. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2002. *Clinical Laboratory Waste Management.* CLSI Document GP5-A2. Villanova, PA.
 39. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2012. *Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline—Second Edition.* CLSI Document EP17-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
 40. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2003. *Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline.* CLSI document EP06-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.



Hologic, Inc.
10210 Genetic Center Drive
San Diego, CA 92121 USA

Assistenza alla clientela: +1 800 442 9892
customersupport@hologic.com

Assistenza tecnica: +1 888 484 4747
molecularsupport@hologic.com

Per ulteriori informazioni di contatto visitare il sito www.hologic.com.



Hologic N.V.
Da Vincilaan 5
1930 Zaventem
Belgium

Hologic, Aptima e Panther e i relativi loghi sono marchi commerciali e/o marchi commerciali registrati di Hologic, Inc. e/o delle aziende consociate negli Stati Uniti e/o in altri paesi.

Armored RNA è un marchio commerciale di Asuragen, Inc.

Tutti gli altri marchi commerciali che possono apparire in questo foglietto illustrativo appartengono ai rispettivi proprietari.

Questo prodotto potrebbe essere protetto da uno o più brevetti statunitensi identificati nel sito www.hologic.com/patents.

© 2014-2018 Hologic, Inc. Tutti i diritti riservati.
AW-11853-701 Rev. 004
2018-05