

Aptima™ Zika Virus Assay

Per uso diagnostico *in vitro*.
Solo per l'esportazione dagli U.S.A.

Informazioni generali	2
Uso previsto	2
Riepilogo e spiegazione del test	2
Principi della procedura	2
Avvertenze e precauzioni	3
Requisiti di conservazione e manipolazione dei reagenti	5
Raccolta e conservazione dei campioni biologici	6
Panther™ System	9
Reagenti e materiali forniti	9
Materiali richiesti ma disponibili separatamente	10
Materiali opzionali	11
Procedura di analisi del Panther System	11
Note procedurali	17
Controllo della qualità	18
Criteri di accettabilità per il test Aptima Zika Virus Assay	18
Criteri di accettabilità per la calibrazione e il calcolo di cutoff	18
Interpretazione dei risultati	21
Limiti	22
Prestazioni	23
Sensibilità analitica	23
Riproducibilità	24
Interferenza	26
Reattività crociata	28
Valutazione clinica	29
Bibliografia	31

Informazioni generali

Uso previsto

Aptima Zika Virus Assay (Test per il virus Zika Aptima) è un test di amplificazione mediata da trascrizione realizzato per il rilevamento qualitativo dell'RNA del virus Zika nel siero, nel plasma o nell'urina trattata. I campioni biologici vengono analizzati utilizzando il Panther™ System per il trattamento, l'amplificazione e il rilevamento automatici dei campioni. I risultati vengono utilizzati per l'identificazione dell'RNA del virus Zika.

Riepilogo e spiegazione del test

Il virus Zika (ZIKV) è un virus a RNA che fa parte della famiglia delle *Flaviviridae* e del gene *Flavivirus*.¹ Viene trasmesso all'uomo tramite le zanzare appartenenti al genere *Aedes*.² Il virus ZIKV è stato identificato per la prima volta nel 1947 in un macaco rhesus infetto nella foresta Zika in Uganda, al quale sono poi seguiti i primi casi umani riportati in Uganda e nella Repubblica Unita di Tanzania nel 1952.³ Da allora, sono state documentate epidemie sporadiche di ZIKV in diverse aree dell'Africa e del Sud-est Asiatico. Il primo caso di epidemia di ZIKV al di fuori di Asia o Africa si è verificato nel 2007, con un'estesa epidemia nell'isola di Yap nel Pacifico, negli Stati Federati della Micronesia.⁴

Nel 2013 e 2014, è stata riportata un'estesa epidemia dell'infezione da virus ZIKV nella Polinesia francese, associata a complicanze cliniche.⁵ Nel maggio del 2015 sono stati confermati in Brasile i primi casi di infezione da virus ZIKV registrati a livello locale nelle Americhe.^{6,7} A partire da dicembre 2016, l'Organizzazione Mondiale della Sanità ha segnalato che in 75 Paesi e territori è stata riportata un'evidenza di trasmissione del virus ZIKV veicolato dalle zanzare fin dal 2007 e, di questi Paesi, ben 69 hanno registrato segnalazioni dal 2015 in poi.⁸ Il virus ZIKV è generalmente associato a disturbi umani che vanno da infezioni subcliniche a lievi patologie simili all'influenza, ma l'infezione da virus ZIKV è stata associata anche a casi gravi e talvolta letali di sindrome di Guillain-Barré.⁹ Inoltre, il virus è stato collegato a microcefalia e altri difetti della nascita in bambini nati da madri infette.¹⁰ Sebbene la principale fonte di infezione sembri risiedere nella puntura di una zanzara, sono state segnalate anche la trasmissione sessuale¹¹ e possibili trasmissioni mediante trasfusioni¹² di virus ZIKV.

Principi della procedura

Il test Aptima Zika Virus Assay mira a due regioni altamente conservate nelle regioni NS2 e NS4/NS5 per una maggiore tolleranza alle potenziali mutazioni. Il test prevede tre passaggi principali, che hanno luogo in una singola provetta sul Panther System automatico: preparazione dei campioni, amplificazione del target dell'RNA del virus ZIKV mediante amplificazione mediata da trascrizione (TMA)¹³ e rilevamento dei prodotti dell'amplificazione (amplicone) mediante analisi con protezione dell'ibridizzazione (HPA).¹⁴ Il test incorpora un controllo interno (CI) per il monitoraggio della cattura, dell'amplificazione e del rilevamento dell'acido nucleico e dell'individuazione di eventuali errori dell'operatore o della strumentazione.

Durante la preparazione dei campioni, l'RNA viene isolato dai campioni biologici tramite cattura del target. Il campione biologico viene trattato con un detergente per solubilizzare l'envelope virale, denaturare le proteine e rilasciare l'RNA genomico virale. Gli oligonucleotidi ("oligonucleotidi di cattura") omologhi a regioni altamente conservate di virus ZIKV vengono ibridizzati sul target dell'RNA del virus ZIKV, se presente, nel campione biologico da analizzare. Il target ibridizzato viene successivamente catturato su microparticelle

magnetiche che sono separate dal campione biologico in un campo magnetico. Le fasi di lavaggio vengono utilizzate per rimuovere i componenti esterni dalla provetta di reazione. La separazione magnetica e le fasi di lavaggio vengono eseguite con un sistema di cattura del target.

L'amplificazione del target avviene tramite TMA, un metodo di amplificazione degli acidi nucleici basato su trascrizione che utilizza due enzimi, la transcriptasi inversa MMLV e la polimerasi dell'RNA T7. La transcriptasi inversa viene usata per generare una copia di DNA (contenente una sequenza promotrice della polimerasi dell'RNA T7) della sequenza dell'RNA target. La polimerasi dell'RNA T7 produce copie multiple di amplicone di RNA dal modello della copia di DNA. Il test Aptima Zika Virus Assay utilizza il metodo TMA per amplificare le regioni dell'RNA del virus ZIKV.

Il rilevamento avviene mediante HPA utilizzando sonde di acido nucleico a singolo filamento con marcatori chemiluminescenti complementari all'amplicone. Le sonde di acido nucleico marcate si ibridizzano specificamente con l'amplicone. Il reagente di selezione distingue le sonde ibridizzate da quelle non ibridizzate inattivando il marcatore sulle sonde non ibridizzate. Durante la fase di rilevamento, il segnale chemiluminescente emesso dalla sonda ibridizzata viene misurato in un luminometro ed espresso in unità di luce relativa (RLU).

Il controllo interno viene aggiunto a ciascun campione biologico da analizzare e calibratore del test tramite il reagente di cattura del target di lavoro. Il controllo interno nel test Aptima Zika Virus Assay controlla le fasi di trattamento, amplificazione e rilevamento dei campioni biologici. Il segnale del controllo interno viene distinto dal segnale del virus ZIKV grazie alle sonde marcate in modo diverso che emettono luce con cinetica differente.¹⁴ L'amplicone specifico del controllo interno viene rilevato con una sonda a emissione di luce rapida (segnale "flash"). L'amplicone specifico del virus ZIKV viene rilevato utilizzando sonde con cinetica di emissione di luce relativamente più lenta (segnale "glow"). Il test cinetico doppio (DKA) è un metodo usato per differenziare i segnali provenienti da marcatori con segnale "flash" e "glow".¹⁵

I calibratori del test Aptima Zika Virus Assay vengono utilizzati per determinare i valori di cutoff e valutare la validità procedurale in ciascuna sessione analitica. Consultare *Controllo della qualità* per maggiori dettagli.

Avvertenze e precauzioni

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

Pertinenti al laboratorio

- C. Solo il personale adeguatamente formato nell'utilizzo del test Aptima Zika Virus Assay e nella manipolazione di materiali potenzialmente infettivi deve eseguire questa procedura. Se si verifica un versamento, disinfettare immediatamente seguendo le procedure del centro appropriate.
- D. Usare solo contenitori da laboratorio monouso forniti o indicati in modo specifico come monouso.

- E. Adottare le consuete precauzioni di laboratorio. Non pipettare con la bocca. Non mangiare, bere o fumare nelle aree di lavoro. 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.
- F. 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% (0,35 M – 0,5 M).
- G. Smaltire tutti i materiali che sono venuti a contatto con i campioni biologici e con i reagenti in conformità alle normative locali, statali e federali.^{16,17,18,19} Pulire e disinfettare accuratamente tutte le superfici di lavoro.
- H. Il reagente enzimatico contiene azoturo di sodio come conservante. Non utilizzare tubi metallici per il trasferimento dei reagenti. Se soluzioni contenenti composti dell'azoturo di sodio vengono smaltite in un sistema idraulico, devono essere diluite e risciacquate con abbondanti quantità di acqua corrente. Queste precauzioni sono consigliate per evitare l'accumulo di depositi nelle tubazioni metalliche in cui potrebbero svilupparsi condizioni esplosive.

Pertinenti ai campioni biologici

- I. I campioni biologici potrebbero essere infettivi. Nell'eseguire questo test, adottare le precauzioni universali^{16,17,18}. Metodi adeguati di manipolazione e smaltimento vanno stabiliti in conformità alle normative locali.¹⁹ Solo il personale adeguatamente formato nell'utilizzo del test Aptima Zika Virus Assay e nella manipolazione di materiali potenzialmente infettivi deve eseguire questa procedura.
- J. Le procedure di raccolta, trasporto, conservazione e trattamento dei campioni biologici riportate nel presente foglietto illustrativo sono necessarie per ottenere prestazioni ottimali da questo test. Una raccolta, un trasporto o una conservazione impropri dei campioni biologici potrebbero fornire risultati errati.
- K. Mantenere le corrette condizioni di conservazione durante la spedizione del campione biologico per assicurarne l'integrità. La stabilità del campione biologico in condizioni di spedizione diverse da quelle raccomandate non è stata determinata.
- L. Evitare la contaminazione crociata durante le fasi di manipolazione dei campioni biologici. Prestare particolare attenzione a evitare la contaminazione provocata dalla diffusione degli aerosol quando si allentano o si tolgono i tappi dei contenitori dei campioni biologici. I campioni biologici possono contenere livelli di organismi estremamente alti. Assicurarsi che i contenitori dei campioni biologici 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 biologici.

Pertinenti al test

- M. Non utilizzare il kit di reagente o i calibratori dopo la data di scadenza.
- N. 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.
- O. Evitare la contaminazione microbica e da nucleasi dei reagenti.

- P. Tappare e conservare tutti i reagenti del test alle temperature specificate. L'uso di reagenti del test conservati in modo improprio può influire sulle prestazioni del test. Consultare *Requisiti di conservazione e manipolazione dei reagenti e Procedura di analisi del Panther System* per maggiori informazioni.
- Q. 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.
- R. Alcuni reagenti del presente kit sono etichettati con simboli di rischio e sicurezza e devono essere manipolati in maniera conforme.

Nota: per informazioni sulle dichiarazioni relative a pericoli e precauzioni che possono essere associate ai reagenti, consultare la libreria delle schede di sicurezza reperibile sul sito www.hologicds.com.

	Reagente di amplificazione AVVERTENZA H315 - Provoca irritazione cutanea H319 - Provoca grave irritazione oculare
	Reagente enzimatico AVVERTENZA H315 - Provoca irritazione cutanea H319 - Provoca grave irritazione oculare H412 - Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata
 	Reagente di selezione <i>Acido borico 1 – 5%</i> <i>Idrossido di sodio <1%</i> AVVERTENZA H315 - Provoca irritazione cutanea H319 - Provoca grave irritazione oculare H371 - Può provocare danni agli organi H373 - Può provocare danni agli organi in caso di esposizione prolungata o ripetuta P264 - Lavare accuratamente viso, mani e qualsiasi parte di cute esposta dopo l'uso P280 - Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/Proteggere il viso P305 + P351 + P338 - IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: Sciacquare accuratamente per diversi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a risciacquare. P337 + P313 - Se l'irritazione degli occhi persiste: Consultare un medico P302 + P352 - IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: Lavare abbondantemente con acqua e sapone P332 + P313 - In caso di irritazione della pelle: Consultare un medico P362 - Togliersi di dosso gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente

Requisiti di conservazione e manipolazione dei reagenti

- A. La seguente tabella mostra le condizioni di conservazione e la stabilità di reagenti e calibratori.

Reagente	Conservazione a confezione chiusa	Kit aperto (scongelato) ^a	
		Conservazione	Stabilità
Reagente di amplificazione	Da -35 °C a -15 °C	Da 2 °C a 8 °C	30 giorni ^b
Reagente enzimatico	Da -35 °C a -15 °C	Da 2 °C a 8 °C	30 giorni ^b
Reagente sonda	Da -35 °C a -15 °C	Da 2 °C a 8 °C	30 giorni ^b
Controllo interno	Da -35 °C a -15 °C	Da 15 °C a 30 °C	8 ore prima della combinazione con TCR
Reagente di cattura del target (TCR)	Da 2 °C a 8 °C	N/D	N/D

Reagente di cattura del target di lavoro (wTCR)	N/D	Da 2 °C a 8 °C	30 giorni ^b
Reagente di selezione	Da 15 °C a 30 °C	Da 15 °C a 30 °C	30 giorni ^b
NCAL (calibratore negativo)	Da -35 °C a -15 °C	N/D	Fiala monouso Utilizzare entro 8 ore
PCAL (calibratore positivo)	Da -35 °C a -15 °C	N/D	Fiala monouso Utilizzare entro 8 ore

^a Le condizioni di stabilità e conservazione di un kit aperto si basano su test convalidati simili.

^b Quando i reagenti vengono rimossi dal Panther System, devono essere immediatamente riportati alle loro temperature di conservazione appropriate.

- B. Smaltire eventuali reagenti preparati in precedenza e reagenti di cattura del target di lavoro inutilizzati dopo 30 giorni.
- C. I reagenti conservati sul Panther System sono stabili per 120 ore (cumulative) quando sono conservati sullo strumento. Il Panther System registra ogni volta che i reagenti vengono caricati.
- D. Se si forma del precipitato nel reagente di cattura del target (TCR) durante la conservazione, consultare le istruzioni contenute in *Preparazione di un nuovo kit*. NON MISCELARE CON VORTEX. NON CONGELARE IL TCR.
- E. Non ricongelare il controllo interno, i reagenti di amplificazione, enzimatici e sonda dopo lo scongelamento iniziale.
- F. I calibratori sono fiale monouso e devono essere smaltiti dopo l'uso.
- G. Se si forma del precipitato nel reagente di selezione, nel reagente sonda, nel calibratore negativo o nel calibratore positivo, consultare le istruzioni contenute in *Procedura di analisi del Panther System*.
- H. Eventuali variazioni nell'aspetto del reagente fornito potrebbero indicare instabilità o deterioramento di tali materiali. Se si rilevano variazioni nell'aspetto dei reagenti (ad es. cambiamenti oggettivi del colore del reagente o torbidità sono indicativi di contaminazione microbica), non devono essere utilizzati.
- I. Dopo lo scongelamento dei calibratori, la soluzione deve essere trasparente, ossia non torbida o con precipitati.
-  J. Il reagente sonda è fotosensibile. Proteggere il reagente dalla luce durante la conservazione e la preparazione per l'uso.

Raccolta e conservazione dei campioni biologici

Il test Aptima Zika Virus Assay può essere utilizzato con campioni di siero, plasma e urina trattata.

Un campione di urina trattata comprende urina pura aggiunta a un terreno di coltura dell'urina in una provetta di trasporto dei campioni di urina Aptima.

Nota: maneggiare tutti i campioni come se contenessero agenti potenzialmente infettivi. Adottare le precauzioni universali.

Nota: prestare attenzione a evitare la contaminazione crociata durante le fasi di manipolazione dei campioni. Ad esempio, smaltire il materiale utilizzato senza farlo passare

sulle provette aperte. Potrebbero essere ottenuti risultati falsi positivi se una contaminazione crociata di campioni biologici non è controllata adeguatamente durante la manipolazione e il trattamento dei campioni biologici.

Nota: il volume minimo di plasma o siero per le provette di raccolta primaria è 1200 µl, mentre per le provette per aliquota di campione (SAT) il volume minimo è 700 µl per ottenere il volume di reazione di 500 µl.

A. Istruzioni per la raccolta

Per le istruzioni sulla raccolta, consultare il foglietto illustrativo del kit di raccolta dei campioni appropriato.

1. Campioni di plasma e siero

È possibile utilizzare i campioni di sangue intero raccolti nelle seguenti provette di vetro o di plastica, in conformità alle istruzioni del produttore:

- Provette contenenti acido etilendiamminotetraacetico (EDTA) o acido-citrato-destrosio di adenina (ACD-A) come anticoagulanti, oppure citrato di sodio (NAC)
- Provette di preparazione del plasma (PPT)
- Provette con siero
- Provette con separatore di siero (SST)

Per il siero, consentire la formazione del coagulo prima dell'ulteriore trattamento.

2. Campioni di urina

I campioni di urina devono essere raccolti in conformità alle istruzioni del produttore.

B. Trasporto e conservazione dei campioni prima dell'analisi

1. Campioni di plasma e siero

Il plasma e il siero potrebbero essere conservati per un totale di 13 giorni dal momento della raccolta al momento dell'analisi alle seguenti condizioni:

- I campioni di sangue intero devono essere centrifugati entro 72 ore dalla raccolta.
 - I campioni devono essere conservati a 2 °C – 8 °C, se non vengono congelati. Tuttavia, i campioni possono essere conservati per 72 ore a temperature fino a 25 °C e fino a 24 ore durante le 72 ore a temperature fino a 30 °C.
- a. Se occorre conservarli più a lungo, congelare plasma e siero separati dalle celle e conservare a -20 °C o -70 °C. Non congelare il sangue intero.
 - b. Non sono stati osservati effetti avversi sulle prestazioni del test quando i campioni di plasma e siero sono stati sottoposti a tre cicli di congelamento-scongelo.
 - c. Verificare che i campioni di plasma e siero siano caratterizzati da un volume di campione sufficiente sul separatore di gel o sull'interfaccia degli eritrociti.
 - d. I campioni con precipitati visibili o materiale fibrinoso devono essere chiariti mediante centrifuga per 10 minuti a 1000 – 3000 g prima di eseguire l'analisi.

2. Campioni di urina

- a. L'urina deve essere trasferita in una provetta di trasporto dei campioni di urina Aptima, che contiene un terreno di coltura per le urine, e miscelata accuratamente entro 72 ore. Consultare il foglietto illustrativo del kit di raccolta appropriato.

- b. Conservare il campione di urina miscelato e trattato a 2 °C – 30 °C e analizzare entro 30 giorni dalla raccolta. Se occorre conservarli più a lungo, congelare il campione di urina trattata a -20 °C o -70 °C.
 - c. Non sono stati osservati effetti avversi sulle prestazioni del test quando l'urina trattata è stata sottoposta a tre cicli di congelamento-scongelo.
 - d. Verificare che i campioni siano caratterizzati da un volume di campione sufficiente.
 - e. I campioni con precipitati visibili o materiale fibrinoso devono essere chiariti mediante centrifuga per 10 minuti a 1000 – 3000 g prima di eseguire l'analisi.
- C. Conservazione dei campioni dopo l'analisi
- 1. I campioni analizzati devono essere conservati su una rastrelliera, in posizione verticale.
 - 2. Le provette del campione vanno coperte con una nuova barriera pulita di pellicola di plastica o di alluminio.
 - 3. Se i campioni analizzati devono essere congelati o spediti, posizionare nuovi tappi sulle provette del campione. Se i campioni devono essere spediti per essere sottoposti ad analisi in un'altra struttura, occorre mantenere le temperature consigliate. Prima di rimuovere i tappi dalle provette di campioni precedentemente analizzati che sono state richiuse, occorre centrifugare brevemente le provette del campione (per 5 minuti a 500 g) per far scendere tutto il liquido sul fondo della provetta. **Evitare schizzi e contaminazione crociata.**

Nota: i campioni devono essere spediti in conformità alle normative sul trasporto nazionali, internazionali e regionali applicabili.

Panther™ System

Sono elencati di seguito i reagenti del test Aptima Zika Virus Assay per il Panther System. Accanto al nome di ciascun reagente è indicato anche il rispettivo simbolo identificativo.

Reagenti e materiali forniti

I kit del calibratore del virus Zika Aptima devono essere acquistati separatamente. Vedere di seguito il numero di catalogo del kit delle singole confezioni.

Kit Aptima Zika Virus Assay, 1000 test (4 x 250 test) N. di cat. PRD-04232 (3 scatole del test)

Scatola Aptima Zika Virus Assay

(alla consegna, conservare a -35 °C – -15 °C)

Simbolo	Componente	Quantità
A	Reagente di amplificazione <i>Acidi nucleici non infettivi in soluzione tamponata.</i>	4 x 26 ml
E	Reagente enzimatico <i>Transcriptasi inversa e polimerasi dell'RNA in soluzione tamponata HEPES.</i>	4 x 13,4 ml
P	Reagente sonda <i>Sonde chemiluminescenti in soluzione tampone succinato.</i>	4 x 34,7 ml
IC	Reagente di controllo interno <i>Una soluzione tamponata HEPES contenente detergente e un RNA trascritto.</i>	4 x 2,8 ml
	Scheda del codice a barre del lotto master	1 scheda

Scatola Aptima Zika Virus Assay

(alla consegna, conservare a 15 °C – 30 °C)

Simbolo	Componente	Quantità
S	Reagente di selezione <i>600 mM di soluzione tampone borato contenente tensioattivo.</i>	4 x 91 ml

Scatola Aptima Zika Virus Assay

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

Simbolo	Componente	Quantità
TCR	Reagente di cattura del target <i>Soluzione salina tamponata contenente acidi nucleici non infettivi in fase solida.</i>	4 x 161 ml

Materiali richiesti ma disponibili separatamente

Nota: salvo altrimenti specificato, per i materiali resi disponibili da Hologic sono indicati i rispettivi numeri di catalogo.

Materiale	N. di cat.
Panther System	—
Kit di liquidi per Aptima Assay (noto anche come kit dei liquidi universali) <i>contiene soluzione di lavaggio Aptima, tampone per liquido di disattivazione Aptima e reagente oleoso Aptima</i>	303014 (1000 test)
Kit Auto Detect Aptima	303013 (1000 test)
Unità multiprovetta (MTU)	104772-02
Kit dei sacchetti di rifiuti Panther	902731
Coperchio del contenitore per rifiuti Panther	504405
Oppure Kit procedurale Panther System <i>contiene MTU, sacchetti per rifiuti, coperchi del contenitore per i rifiuti, rilevamenti automatici e liquidi del test</i>	303096 (5000 test)
Puntali, 1000 µl conduttivi, rilevatori di liquido	10612513 (Tecan)
Kit del calibratore del virus Zika Aptima <i>NCAL. Calibratore negativo, soluzione tamponata contenente detergente, 15 x 2,2 ml</i> <i>PCAL. Calibratore positivo, RNA trascritto in soluzione tamponata contenente detergente, 15 x 2,2 ml</i>	PRD-04233
Candeggina, soluzione di ipoclorito di sodio al 5% – 7% (0,7 M – 1,0 M)	—
Guanti monouso senza talco	—
Tappi non penetrabili di ricambio	103036A
Tappi di sostituzione del reagente per flaconi da 250 test	
<i>Reagenti sonda e di amplificazione</i>	<i>CL0041 (100 tappi)</i>
<i>Reagente enzimatico</i>	<i>501616 (100 tappi)</i>
<i>TCR e reagenti di selezione</i>	<i>CL0040 (100 tappi)</i>
Teli da banco di laboratorio plastificati	—
Panni che non lasciano pelucchi	—
Pipettatore	—
Puntali	—
È consentito usare provette di raccolta del sangue primarie 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 Aptima (SAT) (confezione da 100)	503762
Tappo per provette di trasporto (confezione da 100) <i>tappo per SAT</i>	504415
Pipette di trasferimento	—
Bastoncini di ovatta	—
Agitatore oscillante per provette	—
Kit di raccolta dei campioni di urina Aptima	301040
Oppure provette di trasporto dei campioni di urina Aptima	105575
Sistema di equilibratura dei reagenti SB100™ (SB100-RES)	—
Bagnomaria	—

Procedura di analisi del Panther System

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

Nota: consultare il modulo di applicazione del sistema di equilibratura dei reagenti SB100 per informazioni sulla preparazione dei reagenti opzionali.

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% (0,35 M – 0,5 M). Lasciare la soluzione di ipoclorito di sodio a contatto con le superfici per almeno 1 minuto, quindi risciacquare con acqua deionizzata (DI). Non lasciare asciugare la soluzione di ipoclorito di sodio. Coprire la superficie del banco 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 (fase A.1).
3. Pulire eventuali pipettatori. Utilizzare la procedura di pulizia descritta in precedenza (fase A.1).

B. Preparazione di un nuovo kit

Avvertenza: evitare la formazione di schiuma eccessiva nei reagenti. La schiuma pregiudica il rilevamento del livello di liquido nel Panther System.

Nota: il reagente sonda è fotosensibile. Proteggerlo dalla luce durante la conservazione e la manipolazione.

Nota: i reagenti sonda, enzimatici e di amplificazione possono essere congelati fino a 24 ore a 2 °C – 8 °C prima della preparazione del reagente.

Nota: il controllo interno può essere congelato fino a 24 ore a 2 °C – 8 °C oppure fino a 8 ore a temperatura ambiente (15 °C – 30 °C) prima della preparazione del wTCR.

Preparazione del reagente di cattura del target (TCR) e dei reagenti di amplificazione, enzimatici e sonda

1. Rimuovere una nuova serie di reagenti dal luogo di conservazione. Controllare i numeri di lotto sui flaconi di reagente per assicurarsi che corrispondano ai numeri di lotto riportati sulla scheda del codice a barre del lotto master.
2. Lasciare che i reagenti raggiungano la temperatura ambiente (15 °C – 30 °C) utilizzando una delle tre opzioni descritte di seguito:

Preparazione con SB100-RES (opzione 1)

1. **Immediatamente** dopo la rimozione dal luogo di conservazione (2 °C – 8 °C), capovolgere il flacone di TCR per miscelare in modo vigoroso il gel nella soluzione (almeno 10 inversioni e finché il gel non è più presente sul fondo). **NON MISCELARE CON VORTEX.**
2. Preparare i reagenti TCR, di amplificazione, enzimatici e sonda utilizzando lo strumento SB100-RES.
3. Al momento di scaricare i reagenti, registrare la data di scongelamento per i reagenti di amplificazione, enzimatici e sonda, nello spazio fornito sull'etichetta.

Preparazione con bagnomaria (opzione 2)

Avvertenza: la temperatura del bagnomaria non deve superare i 30 °C.

Nota: fare riferimento alle istruzioni di preparazione a temperatura ambiente (15 °C – 30 °C) per preparare il TCR. Non utilizzare un bagnomaria per preparare il TCR.

1. Dopo la rimozione dal luogo di conservazione (-35 °C – -15 °C o 2 °C – 8 °C), collocare i reagenti di amplificazione, enzimatici e sonda in posizione verticale in un bagnomaria a temperatura ambiente dedicato (15 °C – 30 °C). Almeno ogni 10 minuti, capovolgere delicatamente i reagenti per miscelare con cura ed esaminare visivamente per garantire la dissoluzione dei precipitati. Continuare a capovolgere delicatamente e a esaminare visivamente finché i precipitati non sono più visibili.
2. Assicurarsi che i precipitati siano dissolti. Non utilizzare un reagente se sono presenti gel, precipitato o torbidità.
3. Registrare la data di scongelamento per i reagenti di amplificazione, enzimatici e sonda nello spazio fornito sull'etichetta.

Preparazione a temperatura ambiente (opzione 3)

Nota: il reagente sonda nel luogo di conservazione da -35 °C – -15 °C può richiedere fino a 4 ore per scongelarsi completamente a temperatura ambiente (15 °C – 30 °C), capovolgendolo delicatamente almeno ogni 10 minuti.

1. Per preparare il TCR, procedere nel modo seguente:
 - a. **Immediatamente** dopo la rimozione dal luogo di conservazione (2 °C – 8 °C), capovolgere il flacone di TCR per miscelare in modo vigoroso il gel nella soluzione (almeno 10 inversioni e finché il gel non è più presente sul fondo). **NON MISCELARE CON VORTEX.**
 - b. Lasciare il flacone di TCR a temperatura ambiente (15 °C – 30 °C) per almeno 45 minuti. Almeno ogni 10 minuti, capovolgere delicatamente il flacone di TCR (almeno 10 inversioni) per miscelare con cura ed esaminare visivamente per garantire che non sia presente gel.
 - c. Prima di utilizzarlo, assicurarsi che il gel sia dissolto e che le particelle magnetiche siano in sospensione.

Nota: se è presente del gel e persiste, non utilizzarlo. Riposizionare il flacone di TCR nel luogo di conservazione (2 °C – 8 °C) per utilizzarlo in seguito. Rimuovere un nuovo flacone di TCR dal luogo di conservazione (2 °C – 8 °C) e ripetere le fasi da 1.a a 1.c.

2. Per preparare i reagenti di amplificazione, enzimatici e sonda, procedere nel modo seguente:
 - a. Dopo la rimozione dal luogo di conservazione (-35 °C – -15 °C o 2 °C – 8 °C), collocare i reagenti in posizione verticale a temperatura ambiente (15 °C – 30 °C). Almeno ogni 10 minuti, capovolgere delicatamente i reagenti per miscelare con cura ed esaminare visivamente per garantire la dissoluzione dei precipitati. Continuare a fare scongelare finché non si dissolvono tutti i precipitati.
3. Assicurarsi che i precipitati siano dissolti. Non utilizzare un reagente se sono presenti gel, precipitato o torbidità.
4. Registrare la data di scongelamento per i reagenti di amplificazione, enzimatici e sonda nello spazio fornito sull'etichetta.

Preparazione del controllo interno e del reagente di cattura del target di lavoro (wTCR)

Nota: non utilizzare lo strumento SB100-RES per preparare il controllo interno.

1. Per preparare il controllo interno, procedere nel modo seguente:
 - a. Rimuovere una provetta di controllo interno dal luogo di conservazione (-35 °C – -15 °C o 2 °C – 8 °C).
 - b. Dopo la rimozione dal luogo di conservazione (-35 °C – -15 °C o 2 °C – 8 °C), tenere il controllo interno a temperatura ambiente (15 °C – 30 °C) per almeno 30 minuti.

Opzione: la provetta di controllo interno può essere posizionata in un bagnomaria a temperatura ambiente (15 °C – 30 °C).

- c. Almeno ogni 10 minuti, capovolgere delicatamente la provetta di controllo interno per miscelare con cura ed esaminare visivamente la presenza di gel. Assicurarsi che il gel si dissolva prima dell'utilizzo.

Opzione: la provetta di controllo interno può essere collocata su un agitatore oscillante per provette per una miscelazione accurata durante la preparazione a temperatura ambiente.

Nota: se si verifica una gelificazione, il gel deve essere dissolto prima dell'utilizzo ed entro il periodo di scongelamento di 8 ore a temperatura ambiente (15 °C – 30 °C). Se il gel persiste, non utilizzarlo. Smaltire la provetta, ottenere una nuova provetta di controllo interno e ripetere le fasi da 1.a a 1.c.

2. Per preparare il wTCR, procedere nel modo seguente:
 - a. Quando il TCR è pronto per l'utilizzo, versare l'intero contenuto della provetta di controllo interno nel flacone di TCR. Rimettere il tappo sul flacone di TCR e capovolgere delicatamente per miscelare con cura.
 - b. Nello spazio indicato sul flacone di TCR, registrare la data in cui è stato aggiunto il controllo interno, la data di scadenza del wTCR (la data in cui è stato aggiunto il controllo interno più 30 giorni), il numero di lotto del controllo interno (IC LOT) e le iniziali dell'operatore.
 - c. Conservare la provetta di controllo interno in quanto è necessario scansionare l'etichetta del codice a barre nel Panther System.

Preparazione del reagente di selezione

Nota: non usare il reagente se sono presenti precipitato o torbidità.

1. Per preparare il reagente di selezione, procedere nel modo seguente:
 - a. Rimuovere un flacone di reagente di selezione dal luogo di conservazione a temperatura ambiente (15 °C – 30 °C). Controllare il numero di lotto sul flacone di reagente per assicurarsi che corrisponda al numero di lotto riportato sulla scheda del codice a barre del lotto master.
 - b. Capovolgere delicatamente il flacone per miscelare con cura ed esaminare visivamente per garantire che non siano presenti precipitato o torbidità.
 - c. Registrare la data di prima apertura (data di apertura) sullo spazio fornito sull'etichetta.

Nota: recupero del reagente di selezione: se il reagente di selezione è stato inavvertitamente conservato a 2 °C – 8 °C o la temperatura del laboratorio scende al di sotto di 15 °C, potrebbe formarsi del precipitato. In tal caso, nel reagente di selezione durante la conservazione, riscaldare a 60 °C ± 1 °C per non più di 45 minuti e miscelare delicatamente e con una certa frequenza il flacone (ogni 5 – 10 minuti). Quando tutto il precipitato rientra in soluzione, collocare il flacone in un bagnomaria a temperatura ambiente (15 °C – 30 °C) e lasciare che quest'ultimo si stabilizzi per almeno 1 ora.

C. Preparazione del calibratore

Nota: evitare la formazione di schiuma eccessiva quando si capovolgono i calibratori. La schiuma pregiudica il rilevamento del livello di liquido nel Panther System.

Nota: non utilizzare lo strumento SB100-RES per scongelare i calibratori.

1. Dopo la rimozione dal luogo di conservazione (-35 °C – -15 °C), tenere i calibratori a temperatura ambiente (15 °C – 30 °C) per almeno 30 minuti.

Opzione: i calibratori possono essere collocati in un bagnomaria a temperatura ambiente (15 °C – 30 °C) per lo scongelamento.

2. Almeno ogni 10 minuti, capovolgere delicatamente ciascuna provetta per miscelare con cura. Assicurarsi che il contenuto delle provette sia completamente scongelato prima di utilizzarlo.

Opzione: i calibratori possono essere collocati su un agitatore oscillante per provette per miscelare accuratamente durante la preparazione a temperatura ambiente.

3. Se si osserva una gelificazione, capovolgere delicatamente la provetta finché non è più presente gel.

Nota: se si verifica una gelificazione, il gel deve essere dissolto prima dell'utilizzo ed entro il periodo di scongelamento di 8 ore a temperatura ambiente (15 °C – 30 °C). Se il gel persiste, non utilizzarlo. Smaltire le provette, ottenere nuove provette del calibratore e ripetere le fasi da C.1 a C.3.

4. Quando il contenuto della provetta si è scongelato completamente, asciugare l'esterno di ciascuna provetta con un panno monouso pulito e asciutto.
5. Per prevenire la contaminazione, non aprire le provette del calibratore.

D. Preparazione di reagenti per i reagenti precedentemente preparati**Preparazione di reagenti wTCR, di amplificazione, enzimatici e sonda**

1. Rimuovere i reagenti wTCR e precedentemente preparati dal luogo di conservazione.
2. Lasciare che i reagenti raggiungano la temperatura ambiente (15 °C – 30 °C) utilizzando una delle tre opzioni descritte di seguito:

Preparazione con SB100-RES (opzione 1)

1. **Immediatamente** dopo la rimozione dal luogo di conservazione (2 °C – 8 °C), capovolgere il flacone di TCR per miscelare in modo vigoroso il gel nella soluzione (almeno 10 inversioni e finché il gel non è più presente sul fondo). **NON MISCELARE CON VORTEX.**
2. Preparare i reagenti wTCR, di amplificazione, enzimatici e sonda utilizzando lo strumento SB100-RES.

Preparazione con bagnomaria (opzione 2)

Avvertenza: la temperatura del bagnomaria non deve superare i 30 °C.

Nota: fare riferimento alle istruzioni di preparazione a temperatura ambiente (15 °C – 30 °C) per preparare il wTCR. Non utilizzare un bagnomaria per preparare il wTCR.

1. Dopo la rimozione dal luogo di conservazione (2 °C – 8 °C), collocare i reagenti di amplificazione, enzimatici e sonda in posizione verticale in un bagnomaria a temperatura ambiente dedicato (15 °C – 30 °C). Almeno ogni 10 minuti, capovolgere delicatamente i reagenti per miscelare con cura ed esaminare visivamente per garantire la dissoluzione dei precipitati. Continuare a fare scongelare finché non si dissolvono tutti i precipitati.
2. Assicurarsi che i precipitati siano dissolti. Non utilizzare un reagente se sono presenti gel, precipitato o torbidità.

Preparazione a temperatura ambiente (opzione 3)

1. Per preparare il wTCR, procedere nel modo seguente:
 - a. **Immediatamente** dopo la rimozione dal luogo di conservazione (2 °C – 8 °C), capovolgere il flacone di wTCR per miscelare in modo vigoroso il gel nella soluzione (almeno 10 inversioni e finché il gel non è più presente sul fondo). **NON MISCELARE CON VORTEX.**
 - b. Lasciare il flacone di wTCR a temperatura ambiente (15 °C – 30 °C) per almeno 45 minuti. Almeno ogni 10 minuti, capovolgere delicatamente il flacone di wTCR (almeno 10 inversioni) per miscelare con cura ed esaminare visivamente per garantire che non sia presente gel.
 - c. Prima di utilizzarlo, assicurarsi che il gel sia dissolto e che le particelle magnetiche siano in sospensione.

Nota: se è presente del gel e persiste, non utilizzarlo. Riposizionare il flacone di wTCR e i reagenti corrispondenti nel luogo di conservazione (2 °C – 8 °C) per utilizzarlo in seguito.

2. Per preparare i reagenti di amplificazione, enzimatici e sonda, procedere nel modo seguente:
 - a. Dopo la rimozione dal luogo di conservazione (2 °C – 8 °C), preparare i reagenti in posizione verticale a temperatura ambiente (15 °C – 30 °C). Almeno ogni 10 minuti, capovolgere delicatamente i reagenti per miscelare con cura ed esaminare visivamente per garantire la dissoluzione del precipitato. Continuare a fare scongelare finché non si dissolvono tutti i precipitati.
3. Assicurarsi che i precipitati siano dissolti. Non utilizzare un reagente se sono presenti gel, precipitato o torbidità.

Preparazione del reagente di selezione

Nota: non usare il reagente se sono presenti precipitato o torbidità.

1. Rimuovere il flacone di reagente di selezione corrispondente dal luogo di conservazione a temperatura ambiente (15 °C – 30 °C).
2. Capovolgere delicatamente il flacone per miscelare con cura ed esaminare visivamente per garantire che non siano presenti precipitato o torbidità.

Nota: recupero del reagente di selezione: se il reagente di selezione è stato inavvertitamente conservato a 2 °C – 8 °C o la temperatura del laboratorio scende al di sotto di 15 °C, potrebbe formarsi del precipitato. In tal caso, nel reagente di selezione durante la conservazione, riscaldare a 60 °C ± 1 °C per non più di 45 minuti e miscelare delicatamente e con una certa frequenza il flacone (ogni 5 – 10 minuti). Quando tutto il precipitato rientra in soluzione, collocare il flacone in un bagnomaria a temperatura ambiente (15 °C – 30 °C) e lasciare che quest'ultimo si stabilizzi per almeno 1 ora.

E. Manipolazione dei campioni

1. Lasciare che i campioni biologici e i calibratori raggiungano i 15 °C – 30 °C prima di sottoporli al trattamento.
2. Verificare che ciascuna provetta del campione contenga un volume sufficiente per ciascun tipo di campione e provetta.
3. Miscelare accuratamente campioni freschi o congelati.
4. Immediatamente prima di caricare i campioni in una rastrelliera dei campioni, centrifugare ciascun campione a 1000 – 3000 g per 10 minuti. Non togliere i tappi. La presenza di bolle nella provetta pregiudica il rilevamento del livello di liquido nel Panther System. I tempi e le velocità di centrifuga per far scendere verso il basso tutti i liquidi e i precipitati devono essere convalidati dall'utente. Nel caso in cui il precipitato non rientri in soluzione, assicurarsi che il precipitato non impedisca l'erogazione del campione.

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

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 in *Note procedurali*. Assicurarsi di utilizzare rastrelliere di reagenti e adattatori TCR di dimensioni appropriate.
2. Caricare i campioni nella rastrelliera dei campioni. Attenersi ai seguenti passaggi per ciascuna provetta del campione (campione biologico e, quando necessario, calibratore):
 - a. Allentare il tappo di una delle provette del campione, 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 dei campioni.
 - c. Ripetere i passaggi 2.a e 2.b per ciascun campione rimanente.
 - d. Dopo che i campioni sono stati caricati nella rastrelliera dei campioni, rimuovere e gettare tutti i tappi delle provette del campione di una rastrelliera dei campioni. Per evitare la contaminazione, non fare passare i tappi sopra le altre rastrelliere dei campioni o sopra le provette del campione.

Nota: inoltre, i tappi perforabili dalla provetta di trasporto dei campioni di urina Aptima devono essere rimossi e smaltiti.

- 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 dei campioni in uno scomparto dei campioni.

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

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

Note procedurali

A. Calibratori

1. Le provette del calibratore possono essere caricate in qualsiasi posizione nella rastrelliera dei campioni e in qualsiasi corsia dello scomparto dei campioni sul Panther System. Il pipettaggio dei campioni biologici inizierà quando verrà soddisfatta una delle due seguenti condizioni:
 - a. I calibratori sono in fase di trattamento sul sistema.
 - b. Il sistema ha registrato risultati validi per il calibratore.
2. Quando le provette del calibratore sono state pipettate e sono in fase di trattamento per il kit di reagenti del test Aptima Zika Virus Assay, i campioni biologici possono essere analizzati con il kit a essi associato per un massimo di 24 ore **a meno che:**
 - a. Il risultato del calibratore risulti non valido.
 - b. Il kit di reagenti del test associato venga rimosso dal sistema.
 - c. Il kit di reagenti del test associato abbia superato i limiti di stabilità.
3. Ciascuna provetta del calibratore può essere utilizzata un'unica 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

Criteri di accettabilità per il test Aptima Zika Virus Assay

A. Validità della sessione analitica

Una sessione analitica (identificata anche come lista di lavoro) è valida se il numero minimo di calibratori soddisfa i relativi criteri di accettabilità e questi ultimi sono validi (consultare *Criteri di accettabilità per la calibrazione e il calcolo di cutoff*).

1. In una sessione analitica del test Aptima Zika Virus Assay devono essere validi almeno quattro calibratori su sei. Devono essere validi almeno due replicati del calibratore negativo su tre e due replicati del calibratore positivo su tre.
2. I criteri di accettabilità del calibratore vengono verificati automaticamente dal software del Panther System. Se risulta valido un valore inferiore al numero minimo di replicati del calibratore, il software del Panther System invalida automaticamente la sessione analitica.
3. In una sessione analitica valida, i valori di cutoff vengono calcolati automaticamente per controllo interno (segnale "flash") e analiti (segnale "glow").
4. Se una sessione analitica non è valida, i risultati del campione vengono riportati come non validi e tutti i campioni biologici devono essere rianalizzati.

B. Validità del campione

1. In una sessione analitica valida, il risultato di un campione è valido se il segnale del CI è uguale o superiore al cutoff CI, con le seguenti eccezioni:
 - a. I campioni biologici con un segnale dell'analita (segnale "glow") superiore al cutoff analita non sono invalidati anche se il segnale del controllo interno (CI) è inferiore al cutoff.
 - b. I campioni biologici con un segnale del CI superiore a 750.000 RLU sono invalidati dal software e il relativo stato reattivo non può essere valutato. Inoltre, il software invalida automaticamente i calibratori positivi con un segnale del CI superiore a 750.000 RLU.
2. Inoltre, un campione può essere invalidato a causa di errori di trattamento dello strumento e dei risultati. Fare riferimento al *Panther System Operator's Manual* (Manuale per l'operatore del Panther System) per i dettagli.
3. Tutti i risultati dei singoli campioni biologici che risultano non validi in una sessione analitica valida devono essere rianalizzati.

Criteri di accettabilità per la calibrazione e il calcolo di cutoff

A. Criteri di accettabilità del calibratore negativo

Il calibratore negativo (NC) viene analizzato in triplicato nel test Aptima Zika Virus Assay. Ciascun replicato di un singolo calibratore negativo deve avere un valore di controllo interno (CI) superiore o uguale a 50.000 RLU e inferiore o uguale a 500.000 RLU. Ciascun replicato di un singolo calibratore negativo deve anche avere un valore dell'analita inferiore o uguale a 40.000 RLU e superiore o uguale a 0 RLU. Se uno dei valori del replicato del calibratore negativo non è valido a causa di un valore di CI o analita al di fuori di tali limiti, la media del calibratore negativo (NC_x) sarà ricalcolata in base ai due valori accettabili. La sessione analitica non è valida e deve essere ripetuta se due o più dei tre valori del replicato del calibratore negativo presentano valori di CI o analiti che non rientrano in tali limiti.

Determinazione della media dei valori del calibratore negativo (NC_x) per il controllo interno [NC_x (controllo interno)]

Esempio:

Calibratore negativo	Controllo interno Unità di luce relativa
1	235.000
2	200.000
3	210.000
RLU controllo interno totale	= 645.000

$$NC_x \text{ (controllo interno)} = \frac{\text{RLU controllo interno totale}}{3} = 215.000$$

Determinazione della media dei valori del calibratore negativo (NC_x) per l'analisi [NC_x (analisi)]

Esempio:

Calibratore negativo	Analita Unità di luce relativa
1	14.000
2	16.000
3	15.000
RLU analisi totali	= 45.000

$$NC_x \text{ (analisi)} = \frac{\text{RLU analisi totali}}{3} = 15.000$$

B. Criteri di accettabilità del calibratore positivo

Il calibratore positivo viene analizzato in triplicato nel test Aptima Zika Virus Assay. I valori dell'analisi di un singolo calibratore positivo (PC) devono essere inferiori o uguali a 4.000.000 RLU e superiori o uguali a 400.000 RLU. I valori di CI non possono superare 750.000 RLU. Se uno dei valori del replicato del calibratore positivo non rientra in tali limiti, la media del calibratore positivo (PC_x) sarà ricalcolata in base ai due valori accettabili del replicato del calibratore positivo. La sessione analitica non è valida e deve essere ripetuta se due o più dei tre valori dell'analisi del calibratore positivo non rientrano in tali limiti.

Determinazione della media dei valori del calibratore positivo (PC_x) per l'analisi [PC_x (analisi)]

Esempio:

Calibratore positivo	Analita Unità di luce relativa
1	1.250.000
2	1.500.000
3	1.150.000
RLU analisi totali	= 3.900.000

$$PC_x \text{ (analisi)} = \frac{\text{RLU analisi totali}}{3} = 1.300.000$$

C. Calcolo del valore di cutoff del controllo interno

Valore di cutoff del controllo interno = $0,5 \times [\text{NC}_x \text{ (controllo interno)}]$

Utilizzando valori determinati nell'esempio del calibratore negativo indicato in precedenza:

Valore di cutoff del controllo interno = $0,5 \times (215.000)$

Valore di cutoff del controllo interno = 107.500 RLU

D. Calcolo del valore di cutoff analita del virus Zika

Valore di cutoff analita = $\text{NC}_x \text{ (analita)} + [0,03 \times \text{PC}_x \text{ (analita)}]$

Utilizzando valori determinati negli esempi del calibratore negativo e del calibratore positivo indicati in precedenza:

Valore di cutoff analita = $15.000 + (0,03 \times 1.300.000)$

Valore di cutoff analita = 54.000 RLU

E. Riepilogo dei criteri di accettabilità per il test Aptima Zika Virus Assay

Criteri di accettabilità	
Calibratore negativo	
Analita	Fra ≥ 0 e ≤ 40.000 RLU
Controllo interno	Fra ≥ 50.000 e ≤ 500.000 RLU
Calibratore positivo	
Analita	Fra ≥ 400.000 e $\leq 4.000.000$ RLU
Controllo interno	≤ 750.000 RLU

F. Riepilogo dei calcoli di cutoff per il test Aptima Zika Virus Assay

Cutoff analita = $\text{RLU media analita NC} + [0,03 \times (\text{RLU media analita PC})]$

Cutoff del controllo interno = $0,5 \times (\text{RLU media CI calibratore negativo})$

Interpretazione dei risultati

Tutti i calcoli descritti in precedenza vengono eseguiti dal software del Panther System. Per ciascun test sono stati determinati due cutoff: uno per il segnale dell'analita (segnale "glow") indicato come Cutoff analita e uno per il segnale del controllo interno (segnale "flash") indicato come Cutoff del controllo interno. Il calcolo di tali cutoff è mostrato sopra. Per ciascun esempio sono stati determinati un valore RLU del segnale dell'analita e un valore RLU del segnale del controllo interno. Il valore RLU del segnale dell'analita diviso per il cutoff analita è abbreviato come Segnale/Cutoff analita (S/CO) sul report.

Un campione biologico è negativo se il segnale dell'analita è inferiore al cutoff analita (ossia S/CO analita < 1,00) e il segnale del controllo interno (CI) è superiore o uguale al cutoff del controllo interno (cutoff CI) e inferiore o uguale a 750.000 RLU. Un campione biologico è positivo se il segnale dell'analita è superiore o uguale al cutoff analita (ossia S/CO analita ≥ 1,00) e il segnale del CI è inferiore o uguale a 750.000 RLU. I risultati saranno designati dal software. Un campione biologico non è valido se il segnale dell'analita è inferiore al cutoff analita (ossia S/CO analita < 1,00) e il segnale del controllo interno è inferiore al cutoff del controllo interno. Qualsiasi campione biologico con valori del controllo interno superiori a 750.000 RLU è considerato non valido.

Riepilogo dell'interpretazione dei campioni

Interpretazione dei campioni	Criteri
Negativo	S/CO analita < 1,00 e CI ≥ cutoff CI e CI ≤ 750.000 RLU
Positivo	S/CO analita ≥ 1,00 e CI ≤ 750.000 RLU*
Non valido	CI > 750.000 RLU o S/CO analita < 1,00 e CI < Cutoff

*Per i campioni biologici con segnale CI superiore a 750.000 RLU, il campione sarà invalidato dal software.

- A. Qualsiasi campione biologico interpretato come "Non valido" nel test Aptima Zika Virus Assay deve essere rianalizzato in singoletto.
- B. I campioni biologici con un valore del controllo interno valido e un S/CO analita inferiore a 1,00 nel test Aptima Zika Virus Assay sono considerati negativi per l'RNA del virus ZIKV.
- C. I campioni biologici con S/CO analita superiore o uguale a 1,00 con segnale del CI inferiore o uguale a 750.000 RLU sono considerati positivi per l'RNA del virus ZIKV.

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 biologico.
- C. L'effetto della conservazione a lungo termine dei campioni biologici sulle prestazioni del test Aptima Zika Virus Assay non è stato valutato completamente.
- D. Sebbene siano rare, le mutazioni all'interno delle regioni altamente conservate del genoma virale coperto dai primer e/o le sonde nel test Aptima Zika Virus Assay potrebbero comportare un errore nel rilevamento del virus.
- E. Questo test è stato sviluppato per l'utilizzo esclusivo con il Panther System.
- F. La contaminazione crociata di campioni può causare risultati falsi positivi.
- G. I test devono essere eseguiti, e i risultati interpretati, in conformità alle procedure fornite.
- H. Le deviazioni da queste procedure, condizioni avverse di spedizione e/o conservazione o l'utilizzo di reagenti datati potrebbero produrre risultati non affidabili.
- I. Il mancato ottenimento dei risultati previsti è indice di sessione analitica non valida. Possibili origini di errore includono deterioramento dei kit di test, errore dell'operatore, malfunzionamento dell'apparecchiatura, deterioramento del campione biologico o contaminazione dei reagenti.
- J. Questo test è stato analizzato usando solo i tipi di campioni biologici indicati. Non sono state valutate le prestazioni con altri tipi di campione.
- K. I risultati ottenuti con il test Aptima Zika Virus Assay vanno interpretati insieme agli altri dati clinici a disposizione del medico.
- L. Un risultato negativo non preclude una possibile infezione perché i risultati dipendono da un'appropriata raccolta dei campioni biologici. I risultati del test possono essere influenzati da un'inadeguata raccolta dei campioni biologici, errori tecnici, scambi di campioni biologici o livelli target inferiori al limite di rilevamento del test.
- M. Aptima Zika Virus Assay offre risultati qualitativi. Non può quindi essere tracciata una correlazione fra l'intensità di un segnale positivo del test e il numero di organismi in un campione biologico.
- N. Ciascun cliente deve convalidare in modo indipendente un processo di trasferimento al LIS.

Prestazioni

Sensibilità analitica

Limite di rilevamento (LoD) per i campioni biologici del plasma

Si definisce limite di rilevamento (LoD) la concentrazione di RNA del virus ZIKV rilevata con una probabilità del 95% o maggiore in conformità a CLSI EP17-A2.²⁰ Il LoD è stato determinato analizzando un campione di plasma positivo al virus ZIKV serialmente diluito nel plasma umano defibrinato e delipidato. Il campione di plasma positivo è stato raccolto da un donatore di sangue durante l'epidemia di Zika del 2015 in Brasile. Due lotti di reagenti e tre strumenti Panther sono stati utilizzati per analizzare 72 replicati di ciascun livello di copia per lotto di reagente per un totale di 144 replicati per livello, tranne per l'elemento del pannello con 90 copie/ml, che era stato analizzato in 20 replicati per lotto di reagente per un totale di 40 replicati. I risultati sono riassunti nella Tabella 1.

Tabella 1: Rilevamento del virus ZIKV nel plasma

Concentrazione (copie/ml)	% positività (IC 95%)		
	Lotto 1 (n=72)	Lotto 2 (n=72)	Combinati (n=144)
90	100 (84 – 100) ^a	100 (84 – 100) ^a	100 (91 – 100) ^b
30	100 (95 – 100)	100 (95 – 100)	100 (97 – 100)
10	100 (95 – 100)	100 (95 – 100)	100 (97 – 100)
3	86 (76 – 92)	92 (83 – 96)	89 (83 – 93)
1	38 (28 – 50)	60 (48 – 71)	49 (41 – 57)
0,3	19 (12 – 30)	14 (8 – 24)	17 (12 – 24)
0,1	1 (0 – 7)	6 (2 – 14)	3 (1 – 7)
0	0 (0 – 5)	0 (0 – 5)	0 (0 – 3)

IC = intervallo di confidenza.

^an=20.

^bn=40.

Le probabilità di rilevamento del 50% e del 95% di virus ZIKV nel plasma sono state determinate dall'analisi Probit utilizzando i dati ottenuti dal test della sensibilità analitica. Il limite di rilevamento per il virus ZIKV nel test Aptima Zika Virus Assay è compreso tra 0,91 copie/ml e 1,22 copie/ml alla probabilità di rilevamento del 50% e tra 3,30 copie/ml e 4,41 copie/ml alla probabilità di rilevamento del 95% (Tabella 2).

Tabella 2: Analisi Probit del rilevamento del virus ZIKV nel plasma

Lotto di reagenti	Limite di rilevamento del 50% (limiti di affidabilità del 95%)	Limite di rilevamento del 95% (limiti di affidabilità del 95%)
Lotto 1	1,22 (1,01 – 1,47)	4,41 (3,46 – 6,14)
Lotto 2	0,91 (0,74 – 1,09)	3,30 (2,63 – 4,44)
Combinati	1,06 (0,92 – 1,20)	3,87 (3,25 – 4,78)

Limite di rilevamento per i campioni di urina

Il LoD è stato determinato analizzando un campione di plasma positivo al virus ZIKV serialmente diluito nell'urina negativa in pool. Gli elementi del pannello della sensibilità dell'urina sono stati preparati correggendo il campione di plasma positivo al virus ZIKV nell'urina alla concentrazione indicata prima della miscelazione con un UTM a un rapporto di 1:1 (urina trattata). Sono stati utilizzati due lotti di reagenti e tre strumenti Panther per analizzare 30 replicati di ciascun livello di copia per lotto di reagente, per un totale di 60 replicati per livello. I risultati sono riassunti nella Tabella 3.

Tabella 3: Rilevamento del virus ZIKV nell'urina

Concentrazione ^a (copie/ml)	% positività (IC 95%)		
	Lotto 1 (n=30)	Lotto 2 (n=30)	Combinati (n=60)
90	100 (89 – 100)	100 (89 – 100)	100 (94 – 100)
30	100 (89 – 100)	100 (89 – 100)	100 (94 – 100)
10	97 (84 – 100)	83 (66 – 92)	90 (80 – 95)
3	63 (45 – 78)	43 (27 – 60)	53 (41 – 65)
1	27 (14 – 45)	30 (17 – 48)	28 (18 – 40)
0,3	7 (2 – 22)	3 (0 – 16)	5 (2 – 14)
0,1	0 (0 – 11)	0 (0 – 11)	0 (0 – 6)
0	0 (0 – 11)	0 (0 – 11)	0 (0 – 6)

IC = intervallo di confidenza.

^a Concentrazione nell'urina prima del trattamento.

Le probabilità di rilevamento del 50% e del 95% di virus ZIKV nell'urina sono state determinate dall'analisi Probit utilizzando i dati ottenuti dal test della sensibilità analitica. Il limite di rilevamento per il virus ZIKV nel test Aptima Zika Virus Assay è compreso tra 2,26 copie/ml e 3,42 copie/ml alla probabilità di rilevamento del 50% e tra 8,25 copie/ml e 15,63 copie/ml alla probabilità di rilevamento del 95% (Tabella 4).

Tabella 4: Analisi Probit del rilevamento del virus ZIKV nell'urina^a

Lotto di reagenti	Limite di rilevamento del 50% (limiti di affidabilità del 95%)	Limite di rilevamento del 95% (limiti di affidabilità del 95%)
Lotto 1	2,26 (1,67 – 3,00)	8,25 (5,89 – 13,53)
Lotto 2	3,42 (2,42 – 4,64)	15,63 (10,70 – 27,30)
Combinati	2,81 (2,23 – 3,47)	11,99 (9,17 – 17,04)

^a Concentrazione nell'urina prima del trattamento.

Riproducibilità

Riproducibilità per campioni di sangue

La riproducibilità del test Aptima Zika Virus Assay sul Panther System è stata valutata analizzando un pannello ZIKV, composto da elementi del pannello positivi a 100 copie/ml e 30 copie/ml, e un elemento del pannello negativo creato da plasma negativo (Tabella 5). Gli elementi del pannello positivi sono stati creati correggendo il campione di plasma positivo al virus ZIKV nel plasma negativo. Il pannello è stato analizzato da tre operatori utilizzando tre lotti di reagente differenti su tre strumenti Panther nell'arco di più giorni. È stato generato un totale di 27 sessioni analitiche valide con il test Aptima Zika Virus Assay. Ogni elemento del pannello è stato analizzato in 486 replicati in totale. Il tasso generale di non validità è dello 0% (0/1458).

Le analisi sulla riproducibilità includevano la valutazione della percentuale di concordanza e i rapporti medi del segnale/cutoff (S/CO) per gli elementi del pannello, la valutazione della deviazione standard (DS) e la percentuale del coefficiente di variazione (%CV) dei rapporti S/CO per ciascuno dei cinque fattori di varianza (Tabella 5). I rapporti del S/CO analita medio sono stati analizzati per gli elementi del pannello positivi e i rapporti del S/CO del controllo interno medio sono stati analizzati per l'elemento del pannello negativo. La percentuale di concordanza tra i risultati del test e lo stato effettivo di ciascun elemento del pannello è stata calcolata utilizzando il S/CO analita per tutti gli elementi del pannello.

La percentuale di concordanza totale dei risultati del test era del 100% sia per gli elementi del pannello positivi sia per l'elemento del pannello negativo. Non vi era alcuna correlazione di tasso reattivo sui fattori di varianza analizzati in questo studio. Relativamente alla variabilità del segnale, le diverse sessioni analitiche sono risultate il fattore contribuente più notevole sulla varianza totale (misurato mediante i valori DS) nel test Aptima Zika Virus Assay.

Tabella 5: Riproducibilità di Aptima Zika Virus Assay per i campioni di sangue

Elemento del pannello	N	#P	%A	S/CO medio ^a	Tra lotti diversi		Tra strumenti diversi		Tra operatori diversi		Tra diversi giorni		Nella sessione analitica		Totale	
					DS	%CV	DS	%CV	DS	%CV	DS	%CV	DS	%CV	DS	%CV
Alta (100 copie/ml)	486	486	100	33,22	0,02	0%	0,34	1%	0,17	1%	0,12	0%	1,33	4%	1,38	4%
Bassa (30 copie/ml)	486	486	100	33,35	0,17	1%	0,27	1%	0,08	0%	0,08	0%	1,27	4%	1,31	4%
Negativo	486	0	100	1,94	0,02	1%	0,01	1%	0,01	0%	0,00	0%	0,05	2%	0,05	3%

N = numero di elementi del pannello combinati per questa analisi; #P = numero di positivi; %A = percentuale di concordanza; S/CO = rapporto segnale/cutoff solo nei replicati reattivi; DS = deviazione standard; CV = coefficiente di variazione.

^a S/CO analita medio per gli elementi del pannello positivi (alto e basso); S/CO del controllo interno medio per l'elemento del pannello negativo.

Riproducibilità per campioni di urina

La riproducibilità del test Aptima Zika Virus Assay sul Panther System è stata valutata analizzando un pannello ZIKV composto da elementi del pannello positivi a 100 copie/ml e 30 copie/ml, e un elemento del pannello negativo creato da urina negativa in pool (Tabella 6). Gli elementi del pannello positivi sono stati preparati correggendo il campione di plasma positivo al virus ZIKV nell'urina negativa in pool alla concentrazione indicata. Tutti gli elementi del pannello sono stati miscelati con UTM in un rapporto 1:1 per creare pannelli di riproducibilità di urina trattata. Il pannello è stato analizzato da tre operatori utilizzando tre lotti di reagente differenti su tre strumenti Panther nell'arco di più giorni. È stato generato un totale di 27 sessioni analitiche valide con il test Aptima Zika Virus Assay. Ogni elemento del pannello è stato analizzato in 486 replicati in totale. Il tasso generale di non validità è dello 0% (0/1458).

Le analisi sulla riproducibilità includevano la valutazione della percentuale di concordanza e i rapporti medi del segnale/cutoff (S/CO) per gli elementi del pannello, la valutazione della deviazione standard (DS) e la percentuale del coefficiente di variazione (%CV) dei rapporti S/CO per ciascuno dei cinque fattori di varianza (Tabella 6). I rapporti del S/CO analita medio sono stati analizzati per gli elementi del pannello positivi e i rapporti del S/CO del controllo interno medio sono stati analizzati per l'elemento del pannello negativo. La percentuale di concordanza tra i risultati del test e lo stato effettivo di ciascun elemento del pannello è stata calcolata utilizzando il S/CO analita per tutti gli elementi del pannello.

La percentuale di concordanza totale dei risultati del test è risultata del 100% per l'elemento del pannello positivo, del 96,5% per l'elemento del pannello positivo basso e del 100% per l'elemento del pannello negativo. Non vi era alcuna correlazione di tasso reattivo sui fattori di

varianza analizzati in questo studio. Relativamente alla variabilità del segnale, le diverse sessioni analitiche sono risultate il fattore contribuente più notevole sulla varianza totale (misurato mediante i valori DS) nel test Aptima Zika Virus Assay.

Tabella 6: Riproducibilità di Aptima Zika Virus Assay per i campioni di urina

Elemento del pannello ^a	N	#P	% A	S/CO medio ^b	Tra lotti diversi		Tra strumenti diversi		Tra operatori diversi		Tra diversi giorni		Nella sessione analitica		Totale	
					DS	%CV	DS	%CV	DS	%CV	DS	%CV	DS	%CV	DS	%CV
Alta (100 copie/ml)	486	486	100	34,36	0,09	0%	0,25	1%	0,08	0%	0,07	0%	1,31	4%	1,34	4%
Bassa (30 copie/ml)	486	469	96,5	32,02	1,01	3%	0,30	1%	0,46	1%	1,46	5%	5,21	16%	5,53	17%
Negativo	486	0	100	1,99	0,02	1%	0,01	1%	0,02	1%	0,01	0%	0,04	2%	0,05	2%

N = numero di elementi del pannello combinati per questa analisi; #P = numero di positivi; %A = percentuale di concordanza; S/CO = rapporto segnale/cutoff solo nei replicati reattivi; DS = deviazione standard; CV = coefficiente di variazione.

^a Concentrazione nell'urina prima del trattamento.

^b S/CO analita medio per gli elementi del pannello positivi (alto e basso); S/CO del controllo interno medio per l'elemento del pannello negativo.

Interferenza

Sostanze interferenti per campioni di sangue

Il potenziale per l'interferenza di sostanze endogene è stato valutato analizzando campioni di pazienti affetti da malattie autoimmuni e altre patologie. Sono stati valutati dieci campioni di plasma di ciascun gruppo di pazienti con le seguenti malattie autoimmuni e altre condizioni: itterici, lipemici, emolizzati, anticorpi antinucleari, mieloma multiplo, lupus eritematoso sistemico e fattore reumatoide. Ciascun campione è stato suddiviso in due aliquote. Un'aliquota è stata corretta con plasma positivo al virus ZIKV a una concentrazione di 18 copie/ml. Le aliquote corrette e non corrette sono state analizzate con il test Aptima Zika Virus Assay. Tutti i campioni non corretti erano negativi. Tutti i campioni corretti erano positivi, tranne un'aliquota corretta di un paziente affetto da lupus eritematoso sistemico. Un'aliquota fresca del campione è stata corretta e rianalizzata. Il risultato era positivo al momento della nuova analisi.

Il potenziale per l'interferenza di sostanze endogene è stato valutato ulteriormente analizzando plasma mediante correzione delle seguenti sostanze: albumina (60.000 mg/l), emoglobina (2.000 mg/l), bilirubina (200 mg/l) e lipidi (30.000 mg/l). Non è stata osservata alcuna interferenza mediante la valutazione della specificità e della sensibilità.

Per valutare l'interferenza di anticoagulanti e il dispositivo di raccolta, sono state confrontate le prestazioni dei campioni di siero e plasma nel test Aptima Zika Virus Assay. È stato prelevato del sangue da 10 donatori normali utilizzando i seguenti anticoagulanti e tipi di provette: 1) acido etilendiamminotetraacetico di dipotassio (EDTA K2), 2) acido etilendiamminotetraacetico di tripotassio (EDTA K3), 3) acido-citrato-destrosio di adenina (ACD-A), 4) citrato di sodio (NAC), 5) provette di preparazione del plasma (PPT), 6) provetta con separatore di siero (SST) e 7) provetta di siero (siero). Per ognuno dei 10 donatori, il sangue è stato raccolto utilizzando ciascuno dei sette tipi di provette. Il campione di ciascun donatore è stato suddiviso in due aliquote. Un'aliquota è stata corretta con plasma positivo al virus ZIKV a 18 copie/ml. Sia le aliquote corrette e non corrette sono state analizzate con il test Aptima Zika Virus Assay.

Per le aliquote non corrette, tutti i 70 campioni sono risultati negativi nel test Aptima Zika Virus Assay. I rapporti di S/CO del CI medi erano compresi tra 1,83 e 1,90 con %CV tra il 2% e il

3% per ciascun tipo di provetta (Tabella 7). Per le aliquote corrette, tutti i 70 campioni sono risultati positivi nel test Aptima Zika Virus Assay. Il rapporto del S/CO dell'analita medio per ciascuno dei sette tipi di provetta era compreso tra 31,90 e 34,20 con %CV tra il 3% e il 4% (Tabella 8). Non è stata osservata alcuna interferenza di anticoagulanti e dispositivo di raccolta.

Tabella 7: Risultati del test Aptima Zika Virus Assay per campioni di plasma e siero non corretti raccolti in vari tipi di provette

Provetta di raccolta	N	#P	%P	S/CO CI			Indice S/CO analita		
				Media	DS	CV	Media	DS	CV
K2EDTA	10	0	0%	1,89	0,06	3%	0,00	0,01	N/D
K3EDTA	10	0	0%	1,87	0,04	2%	0,00	0,00	N/D
ACD-A	10	0	0%	1,87	0,04	2%	0,00	0,00	N/D
PPT	10	0	0%	1,83	0,04	2%	0,00	0,00	N/D
NAC	10	0	0%	1,84	0,06	3%	0,00	0,00	N/D
Siero	10	0	0%	1,85	0,06	3%	0,00	0,00	N/D
SST	10	0	0%	1,90	0,05	3%	0,00	0,00	N/D

N = numero di campioni biologici; #P = numero di positivi; %P = percentuale di positivi; CI = controllo interno; S/CO = rapporto segnale/cutoff; DS = deviazione standard; CV = coefficiente di variazione; N/D = non disponibile.

Tabella 8: Risultati del test Aptima Zika Virus Assay per campioni di plasma e siero corretti raccolti in vari tipi di provette

Provetta di raccolta	N	#P	%P	S/CO CI			Indice S/CO analita		
				Media	DS	CV	Media	DS	CV
K2EDTA	10	10	100%	2,05	0,45	22%	32,77	1,23	4%
K3EDTA	10	10	100%	1,99	0,39	20%	32,63	0,82	3%
ACD-A	10	10	100%	1,88	0,44	23%	32,02	1,32	4%
PPT	10	10	100%	1,92	0,25	13%	32,32	1,24	4%
NAC	10	10	100%	1,91	0,50	26%	31,90	1,31	4%
Siero	10	10	100%	1,78	0,31	18%	34,20	1,34	4%
SST	10	10	100%	1,77	0,51	29%	32,52	1,32	4%

N = numero di campioni biologici; #P = numero di positivi; %P = percentuale di positivi; CI = controllo interno; S/CO = rapporto segnale/cutoff; DS = deviazione standard; CV = coefficiente di variazione; N/D = non disponibile.

Sostanze interferenti per campioni di urina

Per testare gli effetti dei metaboliti nell'urina, KOVA-Trol I High Abnormal con controllo dell'urobilinogeno nell'esame delle urine è stato diluito nel terreno di trasporto per le urine (UTM) al posto dell'urina. Questo materiale di controllo dell'esame delle urine basato sull'urina umana contiene potenziali interferenti quali proteine (albumina), glucosio, chetoni, bilirubina, globuli rossi, nitriti, urobilinogeni e leucociti. Inoltre, l'urina contenente sangue intero è stata analizzata a una concentrazione di 5% volume/volume. Non è stata osservata alcuna interferenza con altre sostanze quando corrette con virus ZIKV a una concentrazione finale di 18 copie/ml o non corrette con virus ZIKV, e analizzate nel test Aptima Zika Virus Assay.

Reattività crociata

Reattività crociata per campioni di sangue

Altri patogeni trasmissibili tramite il sangue per campioni di sangue sono stati analizzati per reattività crociata e interferenza. La reattività crociata del test Aptima Zika Virus Assay è stata valutata analizzando campioni clinici di 10 pazienti con ognuna delle seguenti infezioni virali: virus Dengue, virus dell'epatite A (HAV), virus dell'epatite B (HBV), virus dell'epatite C (HCV), virus dell'immunodeficienza umana 1 e 2 (HIV-1/2), Parvovirus B19 e virus del Nilo Occidentale (WNV). Sono stati analizzati anche i campioni biologici di 10 soggetti che avevano ricevuto il vaccino per l'HBV. I campioni biologici sono stati ottenuti da una fonte commerciale e caratterizzati da fornitori che utilizzano metodi convalidati. Inoltre, sono stati valutati il plasma negativo in pool corretto con il virus dell'epatite E (HEV) a 1×10^5 copie/ml e il plasma negativo in pool corretto con il virus della Chikungunya a 1×10^5 U/ml. Ciascun campione descritto in precedenza è stato suddiviso in due aliquote. Un'aliquota è stata utilizzata per la valutazione della reattività crociata, mentre l'altra aliquota è stata corretta con il plasma positivo al virus ZIKV e utilizzata come campione artificiale nella valutazione clinica. Per la reattività crociata, le aliquote di campioni di donatori con infezioni insorte naturalmente o che erano stati vaccinati contro l'HBV sono state analizzate una volta. I campioni corretti con HEV e Chikungunya sono stati analizzati in replicati di 10.

I risultati del test Aptima Zika Virus Assay erano negativi per tutti i campioni. Non è stata osservata alcuna reattività crociata nei campioni biologici di soggetti infetti da altri patogeni trasmissibili tramite il sangue o campioni biologici di individui che erano stati vaccinati contro HBV o campioni corretti con virus. Il potenziale di interferenza è stato analizzato utilizzando un'aliquota di ciascun campione biologico, corretto con virus ZIKV a 18 copie/ml e tutti i risultati erano positivi. Non è stata osservata alcuna reattività crociata o interferenza nei campioni biologici contenenti altri patogeni trasmissibili tramite il sangue.

Ulteriori microrganismi sono stati analizzati per reattività crociata e interferenza. Il plasma negativo è stato utilizzato per preparare campioni biologici corretti a 1×10^6 unità formanti colonie (CFU/ml) o unità formanti inclusioni per ml (IFU/ml) con ognuno dei seguenti microrganismi: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Propionibacterium acnes*, *Candida albicans*, *Neisseria gonorrhoeae* o *Chlamydia trachomatis*. La reattività crociata è stata analizzata utilizzando campioni biologici non corretti con virus ZIKV e tutti i risultati erano negativi. Il potenziale di interferenza microbica è stato analizzato utilizzando un'aliquota di ciascun campione biologico, corretto con virus ZIKV a 18 copie/ml e tutti i risultati erano positivi. Non è stata osservata alcuna reattività crociata o interferenza nei campioni biologici contenenti batteri o funghi.

Reattività crociata per campioni di urina

La reattività crociata e l'interferenza di microrganismi presenti nell'urina sono state analizzate per il test Aptima Zika Virus Assay. L'urina negativa in pool è stata utilizzata per preparare campioni biologici corretti a 1×10^6 unità formanti colonie (CFU/ml) o unità formanti inclusioni per ml (IFU/ml) con ognuno dei seguenti microrganismi: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Chlamydia trachomatis* (5×10^5 IFU/ml), *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma genitalium*, *Gardnerella vaginalis*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensenii* o *Proteus mirabilis* (1×10^6 rRNA/ml). La reattività crociata è stata analizzata utilizzando campioni biologici non corretti con virus ZIKV e tutti i risultati erano negativi. Il potenziale di interferenza microbica è stato analizzato utilizzando un'aliquota di ciascun campione biologico, corretto con virus ZIKV a 18 copie/ml e tutti i risultati erano positivi. Non è stata osservata alcuna reattività crociata o interferenza nei campioni biologici contenenti tali microrganismi.

Valutazione clinica

Valutazione clinica per campioni di sangue

Ventisei (26) campioni di plasma sono stati ottenuti da tre risorse commerciali. I 26 campioni sono stati determinati dai fornitori per essere positivi per il virus ZIKV in base ai risultati del test CDC TrioPlex Assay (due fornitori) o un test RT-PCR convalidato in tempo reale. I campioni biologici sono stati rianalizzati utilizzando un test RT-PCR convalidato in tempo reale differente e 24 campioni su 26 sono stati confermati come positivi. I due campioni che sono risultati negativi durante la nuova analisi sono considerati negativi per il risultato di riferimento nelle analisi seguenti. Il test Aptima Zika Virus Assay è risultato positivo per tutti i 26 campioni clinici. La Tabella 9 mostra i risultati dei 24 campioni positivi di riferimento.

Tabella 9: Risultati del test Aptima Zika Virus Assay di 24 campioni clinici positivi al virus ZIKV

ID campione	Paese di origine	Riferimento Ct/Cp	Risultato Aptima	S/CO Aptima
08847156	Colombia	34,14	Positivo	30,5
08847163	Colombia	34,90	Positivo	31,3
08847229	Colombia	31,43	Positivo	31,3
08847260	Colombia	32,75	Positivo	32,5
08847264	Colombia	36,32	Positivo	32,8
08847284	Colombia	33,14	Positivo	32,5
08847325	Colombia	36,22	Positivo	31,2
08847716	Colombia	31,76	Positivo	29,8
1043-TDS-0112	Repubblica Dominicana	31,80	Positivo	30,9
1043-TDS-0114	Repubblica Dominicana	35,20	Positivo	31,8
1043-TDS-0115	Repubblica Dominicana	24,74	Positivo	32,3
1043-TDS-0119	Repubblica Dominicana	30,69	Positivo	32,1
1043-TDS-0122	Repubblica Dominicana	35,05	Positivo	30,6
1043-TDS-0129	Repubblica Dominicana	37,24	Positivo	31,8
1043-TDS-0130	Repubblica Dominicana	34,23	Positivo	33,4
1043-TDS-0131	Repubblica Dominicana	29,66	Positivo	30,3
1043-TDS-0134	Repubblica Dominicana	37,30	Positivo	31,0
1043-TDS-0135	Repubblica Dominicana	34,07	Positivo	32,1
1043-TDS-0137	Repubblica Dominicana	29,54	Positivo	31,7
1043-TDS-0141	Repubblica Dominicana	30,71	Positivo	32,0
1043-TDS-0143	Repubblica Dominicana	28,73	Positivo	29,6
1043-TDS-0144	Repubblica Dominicana	34,19	Positivo	29,8
1043023924	Colombia	34,69	Positivo	30,3
8798593	Colombia	22,75	Positivo	31,7

È stato preparato un totale di 90 campioni artificiali mediante correzione del plasma positivo al virus ZIKV in singoli campioni di plasma a una concentrazione di 18 copie/ml. I 90 campioni biologici includono 10 campioni di plasma singoli di pazienti risultati positivi a Parvovirus B19, Dengue, HAV, HBV, HCV, HIV o WNV; 10 campioni di plasma di un donatore vaccinato contro l'HBV; 10 campioni di plasma di donatori normali.

È stato utilizzato un totale di 72 campioni di plasma singoli come campioni negativi al virus ZIKV. Settanta (70) campioni includono 10 campioni di plasma singoli, ciascuno di essi

positivo ad anticorpo antinucleare, emolizzati (emoglobina elevata), itterici (bilirubina elevata), lipemici (lipidi elevati), mieloma multiplo, artrite reumatoide o lupus eritematoso sistemico. Sono stati inclusi anche due campioni positivi mediante analisi di riferimento iniziale ma negativi durante una nuova analisi. Questi due campioni sono risultati positivi con il test Aptima Zika Virus Assay. I risultati della valutazione clinica sono riassunti nella Tabella 10.

Tabella 10: Risultati della valutazione clinica per il test Aptima Zika Virus Assay

Categoria di campione	Aptima Zika Virus Assay		
	Numero analizzato	Positivo al virus ZIKV	Negativo al virus ZIKV
Campioni positivi al virus Zika naturale	24	24/24	0/24
Campioni clinici positivi al virus Zika artificiale (3 x LoD)	90 ^a	90/90	0/90
Campioni clinici negativi al virus Zika atteso	72 ^b	2/72	70/72
Percentuale concordanza positiva	100% (114/114) IC 95%: dal 96,7% al 100%		
Percentuale concordanza negativa	97,2% (70/72) ^b IC 95%: dal 90,4% al 99,2%		

IC = intervallo di confidenza.

^a Include le aliquote corrette con virus ZIKV dei 90 campioni di plasma valutati durante gli studi sull'interferenza.

^b Include i campioni di due pazienti risultati positivi durante l'analisi di riferimento iniziale e negativi durante la nuova analisi mediante un metodo PCR alternativo e sono stati considerati un falso positivo.

Valutazione clinica per campioni di urina

Sono stati ottenuti dieci (10) campioni abbinati (campioni abbinati di plasma/siero/urina raccolti da 10 pazienti sintomatici) da una risorsa commerciale. I 10 pazienti sintomatici sono stati determinati dal fornitore per essere positivi per il virus ZIKV in base ai risultati dei campioni di siero analizzati con un test RT-PCR convalidato in tempo reale. I campioni di urina sono stati analizzati prima dell'analisi. I dieci campioni di urina trattati sono stati analizzati insieme ai campioni di plasma e siero da ognuno dei 10 pazienti utilizzando il test Aptima Zika Virus Assay. Tutti i campioni biologici sono risultati positivi al momento dell'analisi iniziale. La Tabella 11 mostra i risultati dei 10 campioni abbinati.

Tabella 11: Risultati del test Aptima Zika Virus Assay di 10 campioni clinici positivi al virus ZIKV abbinati

ID campione	Paese di origine	Cp riferimento (siero)	Plasma		Siero		Urina trattata	
			Risultato	S/CO	Risultato	S/CO	Risultato	S/CO
1043-TDS-0159	Repubblica Dominicana	36,31	Positivo	33,1	Positivo	31,7	Positivo	32,9
1043-TDS-0163	Repubblica Dominicana	32,54	Positivo	33,4	Positivo	33,4	Positivo	17,0
1043-TDS-0165	Repubblica Dominicana	40,38	Positivo	32,8	Positivo	32,6	Positivo	33,7
1043-TDS-0173	Repubblica Dominicana	33,15	Positivo	32,6	Positivo	32,8	Positivo	34,1
1043-TDS-0206	Repubblica Dominicana	36,62	Positivo	31,6	Positivo	30,8	Positivo	32,4
1043-TDS-0221	Repubblica Dominicana	38,11	Positivo	17,8	Positivo	33,5	Positivo	32,8
1043-TDS-0223	Repubblica Dominicana	32,50	Positivo	34,0	Positivo	33,4	Positivo	31,9

Tabella 11: Risultati del test Aptima Zika Virus Assay di 10 campioni clinici positivi al virus ZIKV

ID campione	Paese di origine	Cp riferimento (siero)	Plasma		Siero		Urina trattata	
			Risultato	S/CO	Risultato	S/CO	Risultato	S/CO
1043-TDS-0224	Repubblica Dominicana	31,81	Positivo	33,8	Positivo	31,6	Positivo	33,6
1043-TDS-0230	Repubblica Dominicana	30,51	Positivo	33,8	Positivo	33,7	Positivo	34,7
1043-TDS-0231	Repubblica Dominicana	35,63	Positivo	31,6	Positivo	33,8	Positivo	34,4

È stato preparato un totale di 99 campioni di urina artificiali mediante correzione di plasma positivo al virus ZIKV in campioni di urina singoli: 33 campioni sono stati corretti a 20 copie/ml, 33 campioni sono stati corretti a 36 copie/ml e 33 campioni sono stati corretti a 100 copie/ml. Ciascun campione di urina corretto è stato trattato prima dell'analisi con il test Aptima Zika Virus Assay. Tutti i campioni di urina trattata artificiali analizzati sono risultati positivi.

È stato utilizzato un totale di 123 campioni di urina singoli come campioni negativi all'RNA del virus ZIKV. Di questi, 87 campioni di urina erano stati raccolti da una popolazione normale: 36 campioni di urina femminile singoli sono stati raccolti da una popolazione di pazienti (7 pazienti con cancro alla mammella, 6 pazienti con malattie renali croniche, 6 pazienti con lupus eritematoso sistemico, 4 pazienti con pneumonia, 8 pazienti con diabete e 5 pazienti con infezioni delle vie urinarie). Ciascun campione di urina è stato trattato prima dell'analisi con il test Aptima Zika Virus Assay. Tutti i campioni biologici analizzati sono risultati negativi. I risultati della valutazione clinica sono riassunti nella Tabella 12.

Tabella 12: Risultati della valutazione clinica per campioni di urina trattata

Categoria di campione	Aptima Zika Virus Assay		
	Numero analizzato	Positivo al virus ZIKV	Negativo al virus ZIKV
Campioni positivi al virus Zika naturale	10	10/10	0/10
Campioni clinici positivi al virus Zika artificiale	99	99/99	0/99
Campioni clinici negativi al virus Zika atteso	123	0/123	123/123
Percentuale concordanza positiva		100% (109/109) IC 95%: dal 96,6% al 100%	
Percentuale concordanza negativa		100% (123/123) IC 95%: dal 97,0% al 100%	

IC = Intervallo di confidenza

Bibliografia

1. International Committee on Taxonomy of Viruses. <http://www.ictvonline.org/>
2. Musso D, Gubler DJ. 2016. Zika virus. Clin Microbiol Rev. Jul;29(3):487-524.
3. Kitchen SF, Haddock AJ. 1952. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. Trans R Soc Trop Med Hyg. 46:509-520.
4. Duffy MR, Chen TH, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, Pretrick M, Marfel M, Holzbauer S, Dubray C, Guillaumot L, Griggs A, Bel M, Lambert AJ, Laven J, Kosoy O, Panella A, Biggerstaff BJ, Fischer M, Hayes EB. 2009. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. N Engl J Med 360:2536-2543. doi: 10.1056/NEJMoa0805715.
5. Cao-Lormeau VM, Roche C, Teissier A, Robin E, Berry AL, Mallet HP, Sall AA, Musso D. 2014. Zika virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. Emerg Infect Dis 20:1085-1086.
6. Campos GS, Bandeira AC, Sardi SI. 2015. Zika virus outbreak, Bahia, Brazil. Emerg Infect Dis 21:1885-1886. doi: 10.3201/eid2110.150847.
7. Zanoluca C, Melo VC, Mosimann AL, Santos GI, Santos CN, Luz K. 2015. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 110:569-572.

8. **World Health Organization.** 2016. Situation report: Zika virus, microcephaly, Guillain-Barré syndrome. 8 December 2016.
9. **Cao-Lormeau V-M et al.** Guillain–Barré syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case–control study. *Lancet* [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00562-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00562-6).
10. **Rasmussen SA, Jamieson DJ, Honein MA, Petersen LR.** 2016. Zika virus and birth defects — reviewing the evidence for causality. *N Engl J Med.* 2016 May 19;374(20):1981-1987. doi: 10.1056/NEJMs1604338. PubMed PMID: 27074377.
11. **Musso D, Roche C, Robin E, Nhan T, Teissier A, Cao-Lormeau VM.** 2015. Potential sexual transmission of Zika virus. *Emerg Infect Dis* 21: 359-361.
12. **U.S. Centers for Disease Control and Prevention.** <http://www.cdc.gov/zika/transmission/blood-transfusion.html>
13. **Kacian DL, Fultz TJ** 1995. Nucleic acid sequence amplification methods. U.S. Patent 5,399,491.
14. **Arnold LJ, Hammond PW, Wiese WA, Nelson NC.** 1989. Assay formats involving acridinium-ester-labeled DNA probes. *Clin Chem* 35:1588-1594.
15. **Nelson NC, Cheikh A, Matsuda E, Becker M.** 1996. Simultaneous detection of multiple nucleic acid targets in a homogeneous format. *Biochem.* 35:8429-8438.
16. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2005. *Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods; Approved Guideline.* CLSI Document MM13-A. Wayne, PA.
17. **29 CFR Part 1910.1030.** *Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens*; current version.
18. **Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health.** *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL)*; current version.
19. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2002. *Clinical Laboratory Waste Management.* CLSI Document GP5-A2. Villanova, PA.
20. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2012. *Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline.* 2nd ed. CLSI Document EP17-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.



Hologic N.V.
Da Vincilaan 5
1930 Zaventem
Belgium

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

Informazioni per contattarci negli U.S.A. e nel resto del mondo:

Assistenza clienti: +1 800 442 9892
customersupport@hologic.com
Assistenza tecnica: +1 888 484 4747
molecularsupport@hologic.com

Per altre informazioni di contatto, visitare www.hologic.com.

Hologic, Aptima, Panther, SB100 e i relativi logo sono marchi commerciali e/o marchi commerciali registrati di Hologic, Inc. e/o delle aziende consociate negli Stati Uniti e/o in altri Paesi.

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 USA identificati nel sito www.hologic.com/patents.

© 2017-2018 Hologic, Inc. Tutti i diritti riservati.

AW-15988-701 Rev. 003
2018-04