

Aptima® HIV-1 Quant Dx Assay

Upute za uporabu
Za *in vitro* dijagnostičku uporabu
Samo za izvoz iz SAD-a

Općenite informacije	3
Predviđena uporaba	3
Sažetak i objašnjenje testa	3
Načela postupka	4
Sažetak o sigurnosti i učinkovitosti	5
Upozorenja i mjere opreza	5
Zahtjevi za skladištenje reagensa i rukovanje njima	9
Prikupljanje i skladištenje ispitaka	10
Uzorci na sustavu Panther	13
Prenošenje ispitka	13
Sustav Panther	14
Isporučeni reagensi i materijali	14
Potrebni materijali koji su dostupni odvojeno	16
Opcionalni materijali	17
Postupak testiranja na sustavu Panther	17
Napomene o postupku	21
Kontrola kvalitete	23
Kalibracija testa	23
Negativne i pozitivne kontrole	23
Interni kalibrator / interna kontrola	23
Tumačenje rezultata	24
Ograničenja	26
Analitička učinkovitost	27
Granica detekcije (LoD) primjenom 3. međunarodnog standarda SZO-a za HIV-1	27
Granica detekcije za podtipove i skupine virusa HIV-1	28
Linearni raspon	29
Linearnost među podtipovima i skupinama virusa HIV-1	30
Određivanje donje granice kvantifikacije s pomoću 3. međunarodnog standarda SZO-a za HIV-1	31
Potvrda LLoQ-a za sve podtipove i skupine virusa HIV-1	32
Preciznost	33
Potencijalno interferirajuće endogene i egzogene tvari	34
Učinkovitost s ispitcima negativnima na HIV-1	36
Potencijalno interferirajuća kontaminacija mikroorganizmima	36
Ponovljivost kliničkih ispitaka	38
Razrjeđivanje uzorka s pomoću razrjeđivača za ispitke	39
Prijenos	39
Serokonverzijski panel	40
Studija ekvivalentnosti seruma i plazme	41
Studije obnovljivosti	41

Klinička učinkovitost	44
Potvrda kvantifikacije virusnog opterećenja	44
Studije kliničke specifičnosti	45
Studije kliničke osjetljivosti	45
Pozitivnost u serodiskordantnim uzorcima	46
Bibliografija	47
Kontaktne podaci i povijest revizija	49

Općenite informacije

Predviđena uporaba

Test Aptima® HIV-1 Quant Dx assay jest in vitro test amplifikacije nukleinske kiseline za detekciju i kvantifikaciju RNK virusa humane imunodeficijencije tipa 1 (HIV-1) skupina M, N i O na potpuno automatiziranom sustavu Panther™. Namijenjen je za uporabu kao pomoć pri dijagnosticiranju infekcije virusom HIV-1, potvrđivanju infekcije virusom HIV-1 te kao pomoć pri kliničkom vođenju liječenja pacijenata zaraženih virusom HIV-1.

Test Aptima HIV-1 Quant Dx assay može se upotrijebiti kao pomoć pri dijagnosticiranju infekcije virusom HIV-1, uključujući akutnu ili primarnu infekciju. Prisutnost RNK virusa HIV-1 u plazmi ili serumu pacijenata bez protutijela na HIV-1 ukazuje na akutnu ili primarnu infekciju virusom HIV-1. Test Aptima HIV-1 Quant Dx assay može se upotrijebiti kao dodatni test za ispitke koji imaju ponovljene reaktivne rezultate s odobrenim imunotestovima na HIV. Ako je ispitak reaktivan na testu Aptima HIV-1 Quant Dx assay, infekcija virusom HIV-1 je potvrđena.

Test Aptima HIV-1 Quant Dx assay također se može upotrijebiti zajedno s kliničkom prezentacijom i drugim laboratorijskim markerima za donošenje prognoze bolesti u pojedinaca zaraženih virusom HIV-1. Test Aptima HIV-1 Quant Dx assay može se upotrijebiti kao pomoć pri praćenju učinka antiretrovirusnog liječenja mjerenjem promjena u koncentraciji RNK virusa HIV-1 u plazmi.

Kada se test Aptima HIV-1 Quant Dx assay upotrebljava kao pomoć pri dijagnosticiranju infekcije virusom HIV-1, učinkovitost kvalitativnih rezultata utvrđena je na temelju ispitaka plazme i seruma.* Kada se upotrebljava kao pomoć pri praćenju učinka antiretrovirusne terapije, učinkovitost kvantitativnih rezultata utvrđena je samo na temelju ispitaka plazme. Ispitci seruma ne smiju se upotrebljavati za kvantitativne rezultate.

Ovaj test nije namijenjen za uporabu pri probiru darivatelja krvi ili plazme.

**Ispitci suhe krvne mrlje (engl. dried blood spot, DBS) također se mogu upotrebljavati s testom Aptima HIV-1 Quant Dx assay. Potpuni opis predviđene uporabe i informacije o ispitcima DBS potražite u Dodatku za suhe krvne mrlje u uputi u pakiranju testa Aptima HIV-1 Quant Dx Assay.*

Sažetak i objašnjenje testa

Epidemiološkim studijama virus humane imunodeficijencije tipa 1 (HIV-1) identificiran je kao etiološki agens sindroma stečene imunodeficijencije (AIDS-a) (1-7). HIV se može prenijeti spolnim kontaktom, izloženošću zaraženoj krvi ili krvnim pripravcima ili prijenosom s majke na dijete (8). Unutar 3 do 6 tjedana od izlaganja HIV-u zaražene osobe obično razviju kratak akutni sindrom za koji su karakteristični simptomi slični gripi, a povezan je s visokim razinama viremije u perifernoj krvi (9-12). Kod većine zaraženih osoba ovu ranu fazu prati imunološki odgovor specifičan za HIV i snižavanje viremije u plazmi, obično unutar 4 do 6 tjedana od pojave simptoma (13-14). Nakon serokonverzije zaražene osobe obično ulaze u klinički stabilnu, asimptomatsku fazu koja može trajati godinama (15-17). Za asimptomatsko razdoblje karakteristična je trajna viremija niske razine u plazmi (18) i postupno smanjenje broja T-limfocita CD4+. Takvo smanjenje dovodi do teške imunodeficijencije, višestrukih oportunističkih infekcija, malignih bolesti i smrti (19). Iako su razine virusa u perifernoj krvi relativno niske tijekom asimptomatske faze infekcije, replikacija i uklanjanje virusa dinamički su procesi u kojima su visoke stope proizvodnje virusa i infekcije stanica CD4+ uravnotežene jednako visokim stopama uklanjanja virusa, smrti zaraženih stanica i obnavljanja stanica CD4+, što rezultira relativno stabilnim razinama viremije u plazmi i stanica CD4+. (20-22).

Kvantitativna mjerenja HIV-a u perifernoj krvi pokazala su da više razine virusa mogu biti povezane s povećanim rizikom od kliničke progresije bolesti povezane s HIV-om te da smanjenja razina virusa u plazmi mogu biti povezana sa smanjenim rizikom od kliničke progresije. (23-25). Razine virusa u perifernoj krvi mogu se kvantificirati mjerenjem HIV antigena p24 u serumu, kvantitativnom kulturom HIV-a iz plazme ili izravnim mjerenjem virusne RNK u plazmi primjenom tehnologije amplifikacije nukleinske kiseline ili amplifikacije signala. (26-30).

Molekularne tehnike poput amplifikacije posredovane transkripcijom (engl. transcription mediated amplification, TMA) često se upotrebljavaju za amplifikaciju nukleinskih kiselina (31). TMA obuhvaća specifično hvatanje ciljne sekvence i izotermalnu amplifikaciju za detekciju nukleinskih kiselina u više zaraznih bolesti, uključujući CT, NG, HPV, TV i HIV/HCV/HBV za testiranje darivatelja krvi (32).

U testu Aptima HIV-1 Quant Dx assay, s pomoću tehnike TMA, upotrebljavaju se višestruke duge početnice koje ciljaju nekoliko regija genoma virusa HIV-1 kako bi kompenzirale visoku stopu mutacija virusa HIV-1. Test uključuje dvostruke sustave amplifikacije i detekcije ciljne sekvence, što znači da neovisno cilja dvije regije genoma virusa HIV-1 (pol i LTR). Softver za analizu ne uprosječuje signale iz tih dvaju sustava.

Sustav Aptima s dvostrukim ciljem dizajniran je kako bi povećao izgleda za točno otkrivanje i kvantificiranje uzoraka.

Načela postupka

Test Aptima HIV-1 Quant Dx assay obuhvaća tri glavna koraka koji se svi odvijaju u jednoj epruveti na sustavu Panther: hvatanje ciljne sekvence, amplifikacija ciljne sekvence s pomoću amplifikacije posredovane transkripcijom (Transcription-Mediated Amplification, TMA) i otkrivanje produkata amplifikacije (amplikon) s pomoću fluorescentno obilježenih sonda (izvora svjetlosti).

Tijekom hvatanja ciljne sekvence virusne nukleinske kiseline izoliraju se iz ispitaka. Ispitak se tretira deterdžentom kako bi se solubilizirala virusna ovojnica, denaturirali proteini i oslobodila virusna genomska RNK. Uhvaćeni oligonukleotidi hibridiziraju se s visoko očuvanim regijama genoma virusa HIV-1, ako su prisutne, u testnom ispitku. Hibridizirana ciljna sekvenca zatim se hvata na magnetske mikročestice koje se od ispitka odvajaju u magnetskom polju. Koraci pranja uklanjaju nepripadajuće komponente iz reakcijske epruvete.

Amplifikacija ciljne sekvence odvija se s pomoću tehnike TMA, metode amplifikacije nukleinske kiseline posredovane transkripcijom u kojoj se primjenjuju dva enzima, reverzna transkriptaza Moloneyjevog virusa mišje leukemije (engl. *Moloney murine leukemia virus*, MMLV) i T7 RNK polimeraza. Reverznom transkriptazom generira se kopija DNK (koja sadržava promotorsku sekvencu za T7 RNK polimerazu) ciljne sekvence. T7 RNK polimeraza proizvodi više kopija amplikona RNK iz DNK predloška za kopiranje. U testu Aptima HIV-1 Quant Dx assay upotrebljava se metoda TMA za amplifikaciju dviju regija RNK virusa HIV-1 (pol i LTR). Neovisni signal generira se amplifikacijom svake regije primjenom specifičnih početnica koje su osmišljene za amplifikaciju skupina M, N i O virusa HIV-1.

Detekcija se postiže uporabom izvora svjetlosti u obliku jednolančanih nukleinskih kiselina koji su prisutni tijekom amplifikacije svake ciljne sekvence i koji se specifično hibridiziraju s amplikonima u stvarnom vremenu. Svaki izvor svjetlosti sadržava fluorofor i gasitelj. Kada izvor svjetlosti nije hibridiziran s amplikomom, gasitelj se nalazi u neposrednoj blizini fluorofora i potiskuje fluorescenciju. Kada se izvor svjetlosti veže za amplikon, gasitelj se udaljava od fluorofora i emitirat će signal na određenoj valnoj duljini kada ga pobudi izvor svjetlosti. Kako se više izvora svjetlosti hibridizira s amplikomom, generira se jači fluorescentni signal. Vrijeme potrebno da fluorescentni signal svake ciljne sekvence dosegne određeni prag („tTime” (tVrijeme))

proporcionalno je početnoj koncentraciji virusa HIV-1. Svaka reakcija ima interni kalibrator / internu kontrolu (engl. *internal calibrator/internal control*, IC) za kontrolu mogućih varijacija u obradi, amplifikaciji i detekciji ispitka. Koncentracija uzorka zatim se izračunava u softveru sustava Panther s pomoću tvorena za amplifikaciju regija pol i LTR. S pomoću svog algoritma i usporedbe s pohranjenim informacijama o kalibraciji softver sustava Panther vraća jedan klinički potvrđeni rezultat za svaki uzorak.

Sažetak o sigurnosti i učinkovitosti

SSP (Sažetak o sigurnosti i učinkovitosti, engl. Summary of Safety and Performance) dostupan je u europskoj bazi podataka o medicinskim uređajima (Eudamed), gdje je povezan s identifikatorima uređaja (Osnovni UDI-DI). Kako biste pronašli SSP za test Aptima HIV-1 Quant Dx assay, poslužite se Osnovnim jedinstvenim identifikatorom proizvoda (BUDI): 54200455DIAGAPTHIV1XB

Upozorenja i mjere opreza

- A. Za *in vitro* dijagnostičku uporabu.
- B. Za profesionalnu uporabu.
- C. Test Aptima HIV-1 Quant Dx assay nije namijenjen za uporabu kao test probira na prisutnost virusa HIV-1 u darovanoj krvi.
- D. Kako biste smanjili rizik od nevažjećih rezultata, prije izvođenja ovog testa pažljivo pročitajte cijelu uputu u pakiranju i *Priručnik za rukovatelja sustavom Panther / Panther Fusion™ System*.

U vezi s laboratorijem

- E.  OPREZ: Kontrole za ovaj test sadržavaju ljudsku plazmu. Plazma je negativna na površinski antigen hepatitisa B (HBsAg), protutijela na HCV, protutijela na HIV-1 i HIV-2 te HIV antigen kada se testira putem postupaka koje je odobrila Američka agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA). Osim toga, plazma ne reagira na RNK HCV-a i RNK virusa HIV-1 kada se testira licenciranim testovima nukleinskih kiselina primjenom skupnih uzoraka. Sav materijal dobiven iz ljudske krvi treba smatrati potencijalno zaraznim i s njim treba postupati uz pridržavanje univerzalnih mjera opreza (33-35).
- F. Samo osoblje koje je adekvatno osposobljeno za uporabu testa Aptima HIV-1 Quant Dx assay i za rukovanje potencijalno zaraznim materijalima smije provoditi ovaj postupak. Ako dođe do izlivanja, odmah na licu mjesta dezinficirajte odgovarajućim postupcima.
- G. Upotrebljavajte samo isporučene ili određene jednokratne laboratorijske proizvode.
- H. Pridržavajte se rutinskih laboratorijskih mjera opreza. Nemojte pipetirati ustima. Nemojte jesti, piti ili pušiti u označenim radnim područjima. Prilikom rukovanja ispitcima i reagensima iz kompleta nosite jednokratne rukavice bez pudera, zaštitne naočale i laboratorijsku kutu. Nakon rukovanja ispitcima i reagensima iz kompleta temeljito operite ruke.
- I. Radne površine, pipete i drugu opremu potrebno je redovito dekontaminirati otopinom natrijeva hipoklorita od 2,5 % do 3,5 % (0,35 M do 0,5 M).
- J. Sve materijale koji su došli u kontakt s ispitcima i reagensima odložite u otpad u skladu s regionalnim propisima (33-36). Temeljito očistite i dezinficirajte sve radne površine.

- K. Kontrole sadržavaju natrijev azid kao konzervans. Nemojte upotrebljavati metalne cijevi za prijenos reagensa. Ako se otopine koje sadržavaju spojeve natrijevog azida odlažu u vodovodni sustav, treba ih razrijediti i isprati obilnom količinom tekuće vode. Ove mjere opreza preporučuju se kako bi se izbjeglo nakupljanje naslaga u metalnim cijevima u kojima bi se mogli razviti eksplozivni uvjeti.
- L. Dobre standardne prakse za molekularne laboratorije uključuju praćenje stanja okoliša. Za praćenje laboratorijskog okruženja predlaže se postupak naveden u nastavku.
1. Uzmite vateni štapić i uparite ga s epruvetom za alikvot ispitka (engl. *Specimen Aliquot Tube*, SAT) Aptima®.
 2. Označite svaki SAT na odgovarajući način.
 3. Napunite svaku epruvetu SAT s 1 mL razrjeđivača za ispitke Aptima®.
 4. Za prikupljanje površinskih uzoraka lagano navlažite štapić deioniziranom vodom bez nukleaze.
 5. Prikupite bris s površine od interesa okomitim pokretima od vrha prema dnu. Dok uzimate bris, štapić zakrećite za otprilike pola okreta.
 6. Uzorak brisa odmah stavite u epruvetu i lagano zavrtite štapić u razrjeđivaču kako biste izvukli potencijalne materijale iz brisa. Pritisnite štapić o bočnu stranu epruvete za prijenos kako biste istisnuli što je više tekućine moguće. Odložite štapić u otpad i začepite epruvetu.
 7. Ponovite korake za preostale uzorke brisa.
 8. Ispitajte bris molekularnim testom.

U vezi s ispitkom

- M. Ispitci mogu biti infektivni. Prilikom izvođenja ispitivanja pridržavajte se univerzalnih mjera opreza (33-35). Metode propisnog rukovanja i odlaganja treba utvrditi u skladu s lokalnim propisima (36). Samo osoblje koje je adekvatno osposobljeno za uporabu testa Aptima HIV-1 Quant Dx assay i za rukovanje zaraznim materijalima smije provoditi ovaj postupak.
- N. Tijekom prijevoza ispitka održavajte odgovarajuće uvjete skladištenja kako biste osigurali cjelovitost ispitka. Stabilnost ispitka u uvjetima prijevoza drugačijim od preporučenih nije procijenjena.
- O. Izbjegavajte unakrsnu kontaminaciju prilikom izvođenja koraka rukovanja ispitcima. Budite posebno oprezni kako biste izbjegli kontaminaciju širenjem aerosola prilikom otpuštanja ili otvaranja ispitaka. Ispitci mogu sadržavati ekstremno visoke razine organizama. Pobrinite se da se spremnici ispitaka međusobno ne dodiruju, a iskorišteni materijal odložite pazeći da ga ne prenosite preko otvorenih spremnika. Zamijenite rukavice ako dođu u kontakt s ispitkom.

U vezi s testom

- P. Kvantitativni rezultati testa Aptima HIV-1 Quant Dx assay procijenjeni su na temelju plazme. Serum se ne smije upotrebljavati za dobivanje kvantitativnih rezultata. Kvalitativni rezultati procijenjeni su i za plazmu i za serum. Uporaba ovog kompleta testa s ispitcima koji nisu oni posebno odobreni za uporabu s tim kompletom testa može dovesti do netočnih rezultata testiranja.

- Q. Test Aptima HIV-1 Quant Dx assay klinički je potvrđen s pomoću algoritma u softveru sustava Panther. Potvrđeni rezultat koji treba prijaviti pruža softver sustava Panther na zaslону Results (Rezultati) i u izvješću Results (Rezultati).
- R. Nemojte upotrebljavati komplet reagensa, kalibrator ili kontrole nakon isteka roka valjanosti.
- S. Nemojte zamjenjivati, miješati ili kombinirati analitičke reagense iz kompleta s drugim brojevima osnovne serije. Tekućine za ispitivanje mogu biti iz serija s različitim brojevima. Kontrole i kalibrator mogu biti iz serija s različitim brojevima.
- T. Izbjegavajte kontaminaciju reagensa mikroorganizmima i nukleazom.
- U. Zatvorite i pohranite sve analitičke reagense na propisanim temperaturama. Nepravilno pohranjeni analitički reagensi mogu utjecati na učinkovitost testa. Pogledajte *Zahtjevi za skladištenje reagensa i rukovanje njima* i *Opcionalni materijali* za više informacija.
- V. Nemojte kombinirati nikakve analitičke reagense ili tekućine bez posebnih uputa. Reagense ili tekućine nemojte puniti do vrha. Sustav Panther provjerava razine reagensa.
- W. Neki reagensi u ovom kompletu nose oznake s informacijama o opasnostima.

Napomena: Informiranje o opasnostima odražava klasifikaciju iz sigurnosno-tehničkih listova (engl. Safety Data Sheets, SDS) EU-a. Informacije o opasnostima specifične za svoju regiju potražite u SDS-u specifičnom za regiju u Biblioteci sigurnosno-tehničkih listova (engl. Safety Data Sheet Library) na web-mjestu www.hologicsds.com. Za više informacija o simbolima pogledajte legendu simbola na web-mjestu www.hologic.com/package-inserts.

Informacije o opasnostima za EU	
—	Amplifikacijski reagens Magnezijev klorid 60 – 65 % — H412 – Štetno za vodeni okoliš s dugotrajnim učincima. P273 – Izbjegavati ispuštanje u okoliš. P501 – Odložiti sadržaj/spremnik u odobreni pogon za odlaganje otpada.
—	Enzimski reagens HEPES 1 – 5 % Triton X-100 1 – 5 % — H412 – Štetno za vodeni okoliš s dugotrajnim učincima. P273 – Izbjegavati ispuštanje u okoliš. P501 – Odložiti sadržaj/spremnik u odobreni pogon za odlaganje otpada.
—	Reagens za rekonstituciju enzima Glicerol 20 – 25 % Triton X-100 5 – 10 % HEPES 1 – 5 % — H412 – Štetno za vodeni okoliš s dugotrajnim učincima. P273 – Izbjegavati ispuštanje u okoliš. P501 – Odložiti sadržaj/spremnik u odobreni pogon za odlaganje otpada.

—	Promotorski reagens Magnezijev klorid 60 – 65 % — H412 – Štetno za vodeni okoliš s dugotrajnim učincima. P273 – Izbjegavati ispuštanje u okoliš. P501 – Odložiti sadržaj/spremnik u odobreni pogon za odlaganje otpada.
—	Reagens za hvatanje ciljne sekvence HEPES 15 – 20 % Lauril sulfat litijeva sol 5 – 10 % Litij hidroksid, monohidrat 1 – 5 % Jantarna kiselina 1 – 5 % — H412 – Štetno za vodeni okoliš s dugotrajnim učincima. P273 – Izbjegavati ispuštanje u okoliš. P501 – Odložiti sadržaj/spremnik u odobreni pogon za odlaganje otpada.
  	Kontrole kompleta HIV VL Kit Ljudski serum / ljudska plazma 95 – 100 % Natrij-azid < 1 % OPASNOST H300 – Smrtonosno ako se proguta. H410 – Vrlo otrovno za vodeni okoliš, s dugotrajnim učincima. P264 – Nakon uporabe temeljito oprati lice, ruke i sve izložene površine kože. P273 – Izbjegavati ispuštanje u okoliš. P301 + P310 – KO SE PROGUTA: odmah nazvati CENTAR ZA KONTROLU OTROVANJA/liječnika. P321 – Potrebna je posebna liječnička obrada (vidi dopunske upute o mjerama prve pomoći na ovoj naljepnici). P330 – Isprati usta. P391 – Sakupiti proliveno/rasuto.
—	Kalibratori kompleta HIV VL Kit HEPES 15 – 20 % Lauryl Sulfate Lithium Salt 5 – 10 % Lithium Hydroxide, Monohydrate 1 – 5 % Succinic Acid 1 – 5 % — H412 – Štetno za vodeni okoliš s dugotrajnim učincima. P273 – Izbjegavati ispuštanje u okoliš. P501 – Odložiti sadržaj/spremnik u odobreni pogon za odlaganje otpada.

Zahtjevi za skladištenje reagensa i rukovanje njima

- A. U tablici u nastavku prikazani su uvjeti skladištenja i stabilnost reagensa, kontrola i kalibratora.

Reagens	Skladištenje neotvorenih proizvoda	Otvoreni komplet (rekonstituiran)	
		Skladištenje	Stabilnost
qHIV-1 Amplification Reagent	od 2 °C do 8 °C		
qHIV-1 Amplification Reconstitution Solution	od 2 °C do 8 °C	od 2 °C do 8 °C	30 dana ^a
qHIV-1 Enzyme Reagent	od 2 °C do 8 °C		
qHIV-1 Enzyme Reconstitution Solution	od 2 °C do 8 °C	od 2 °C do 8 °C	30 dana ^a
qHIV-1 Promoter Reagent	od 2 °C do 8 °C		
qHIV-1 Promoter Reconstitution Solution	od 2 °C do 8 °C	od 2 °C do 8 °C	30 dana ^a
qHIV-1 Target Capture Reagent	od 2 °C do 8 °C	od 2 °C do 8 °C	30 dana ^a
qHIV-1 NC CONTROL – (negativna kontrola)	od -15 °C do -35 °C	od 15 °C do 30 °C	Bočica za jednokratnu upotrebu Upotrijebiti unutar 20 sati
qHIV-1 LPC CONTROL + (nisko pozitivna kontrola)	od -15 °C do -35 °C	od 15 °C do 30 °C	Bočica za jednokratnu upotrebu Upotrijebiti unutar 20 sati
qHIV-1 HPC CONTROL + (visoko pozitivna kontrola)	od -15 °C do -35 °C	od 15 °C do 30 °C	Bočica za jednokratnu upotrebu Upotrijebiti unutar 20 sati
qHIV-1 PCAL (pozitivni kalibrator)	od -15 °C do -35 °C	od 15 °C do 30 °C	Bočica za jednokratnu upotrebu Upotrijebiti unutar 20 sati

^a Kada se reagensi uklone iz sustava Panther, potrebno ih je odmah vratiti na njihovu odgovarajuću temperaturu skladištenja.

- B. Neiskorištene rekonstituirane reagense i reagense za hvatanje ciljne sekvence (engl. *target capture reagent*, TCR) odložite u otpad nakon 30 dana ili nakon isteka roka valjanosti osnovne serije, ovisno o tome što nastupi ranije.
- C. Reagensi pohranjeni u sustavu Panther stabilni su 72 sata. Reagensi se mogu postaviti u sustav Panther do 8 puta. Sustav Panther bilježi svako postavljanje reagensa.
- D. Nakon odmrzavanja kalibratora otopina mora biti bistra, tj. ne smije biti mutna ni sadržavati talog.
- E. ⚠ Promotorski reagens i rekonstituirani promotorski reagens fotosenzitivni su. Zaštitite te reagense od svjetlosti tijekom skladištenja i pripreme za upotrebu.

Prikupljanje i skladištenje ispitaka

Napomena: Rukujte svim ispitcima kao da sadržavaju potencijalno zarazne agense. Primjenjujte univerzalne mjere opreza.

Napomena: Pazite da izbjegnute unakrsnu kontaminaciju tijekom koraka rukovanja uzorkom. Na primjer, odložite rabljeni materijal u otpad bez prelaska preko otvorenih epruveta.

Napomena: Za skladištenje se preporučuju samo plastične sekundarne epruvete.

Mogu se upotrebljavati ispitci pune krvi prikupljeni u sljedećim staklenim ili plastičnim epruvetama:

Za kvantitativna mjerenja:

- epruvete koje sadržavaju antikoagulanse EDTA ili acid-citrat-dekstroza (ACD) ili
- epruvete za pripremu plazme (engl. *plasma preparation tube*, PPT).

Za kvalitativno određivanje:

- epruvete koje sadržavaju antikoagulanse EDTA ili ACD ili
- PPT-ovi ili
- epruvete sa serumom ili
- epruvete za odvajanje seruma (engl. *serum separator tube*, SST).

Za serum pustite da se formira ugrušak prije daljnje obrade.

A. Prikupljanje ispitka

Puna krv može se čuvati na temperaturi od 2 °C do 30 °C i mora se centrifugirati unutar 24 sata od prikupljanja ispitka. Odvojite plazmu ili serum od nataloženih eritrocita slijedeći upute proizvođača za epruvetu koja se upotrebljava. Plazma ili serum mogu se testirati na sustavu Panther u primarnoj epruveti ili prenijeti u sekundarnu epruvetu. Za dobivanje reakcijskog volumena od 500 µL minimalni volumen plazme ili seruma za primarne epruvete za prikupljanje iznosi do 1200 µL, a za sekundarne epruvete minimalni volumen iznosi 700 µL. U tablici u nastavku navedeni su zahtjevi za mrtvi volumen za svaku vrstu primarne i sekundarne epruvete:

Epruveta (veličina i vrsta)	Mrtvi volumen na sustavu Panther
Epruveta za alikvot uzorka (SAT) Aptima	0,2 mL
12 x 75 mm	0,5 mL
13 x 100 mm	0,5 mL
13 x 100 mm s gelom	0,3 mL
16 x 100 mm s gelom	0,7 mL

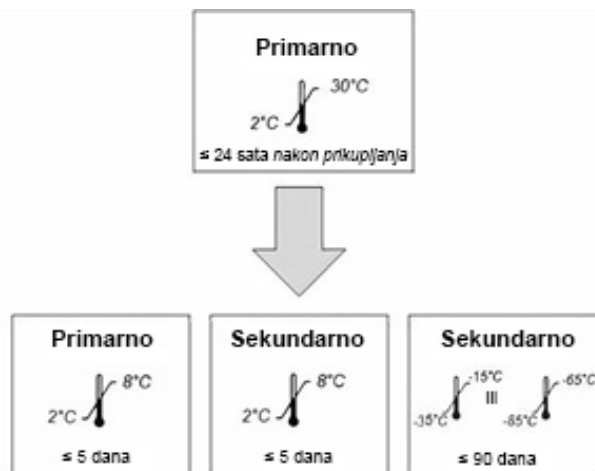
Ako se ne testiraju odmah, plazma ili serum mogu se skladištiti u skladu sa specifikacijama navedenima u nastavku. Ako se prenosi u sekundarnu epruvetu, plazma se može zamrznuti na -20 °C ili -70 °C, a serum se može zamrznuti na -20 °C. Nemojte izvesti više od tri ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja kako to ne bi utjecalo na rezultat. Ne zamrzavajte ispitke u epruvetama s antikoagulansom EDTA ili ACD niti u primarnim epruvetama za prikupljanje seruma.

B. Uvjeti za skladištenje ispitaka

1. Ispitci plazme s antikoagulansima EDTA i ACD

Primarne epruvete koje sadržavaju centrifugiranu plazmu mogu se čuvati na temperaturi od 2 °C do 30 °C do 24 sata nakon prikupljanja ispitka (Slika 1, gornji okvir). Nakon 24 sata plazma se može pohraniti na duže razdoblje pod jednim od sljedećih uvjeta (Slika 1, donji okviri):

- u primarnoj epruveti za prikupljanje na temperaturi od 2 °C do 8 °C do 3 dana
- u sekundarnoj epruveti na temperaturi od 2 °C do 8 °C do 5 dana ili
- u sekundarnoj epruveti na -20 °C ili -70 °C do 90 dana.

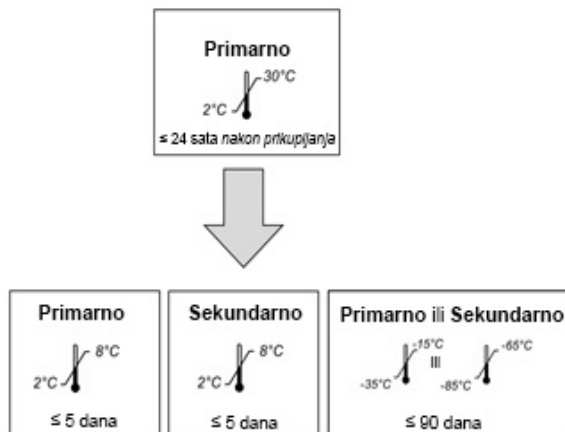


Slika 1. Uvjeti skladištenja za EDTA/ACD epruvete

2. Ispitci u PPT-u

PPT-ovi koji sadržavaju centrifugiranu plazmu mogu se čuvati na temperaturi od 2 °C do 30 °C do 24 sata nakon prikupljanja ispitka (Slika 2, gornji okvir). Nakon 24 sata plazma se može pohraniti na duže razdoblje pod jednim od sljedećih uvjeta (Slika 2, donji okviri):

- u PPT-u na temperaturi od 2 °C do 8 °C do 3 dana
- u sekundarnoj epruveti na temperaturi od 2 °C do 8 °C do 5 dana ili
- u PPT-u ili sekundarnoj epruveti na -20 °C ili -70 °C do 90 dana.

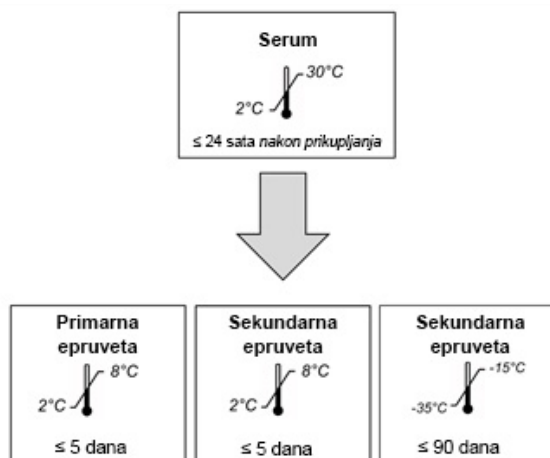


Slika 2. Uvjeti skladištenja za PPT-ove

3. Ispitci u epruveti za serum

Epruvete za serum koje sadržavaju centrifugirani serum mogu se čuvati na temperaturi od 2 °C do 30 °C do 24 sata nakon prikupljanja ispitka (Slika 3, gornji okvir). Nakon 24 sata serum se može pohraniti na duže razdoblje pod jednim od sljedećih uvjeta (Slika 3, donji okviri):

- u epruveti za serum na temperaturi od 2 °C do 8 °C do 5 dana
- u sekundarnoj epruveti na temperaturi od 2 °C do 8 °C do 5 dana ili
- u sekundarnoj epruveti na -20 °C do 90 dana.

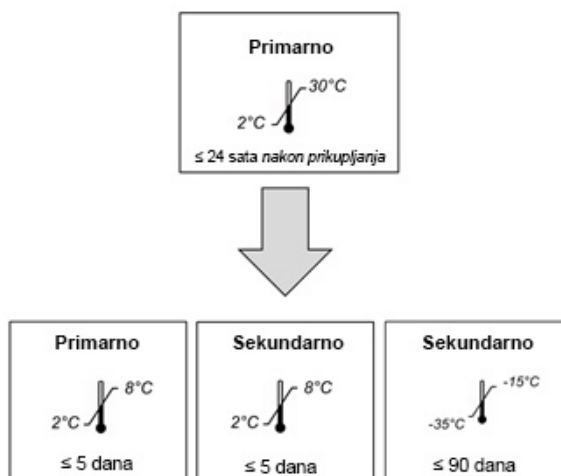


Slika 3. Uvjeti skladištenja za epruvete za serum

4. Ispitci u SST-u

Epruvete za odvajanje seruma (SST) koje sadržavaju centrifugirani serum mogu se čuvati na temperaturi od 2 °C do 30 °C do 24 sata nakon prikupljanja ispitka (Slika 4, gornji okvir). Nakon 24 sata serum se može pohraniti na duže razdoblje pod jednim od sljedećih uvjeta (Slika 4, donji okviri):

- u SST-u na temperaturi od 2 °C do 8 °C do 5 dana
- u sekundarnoj epruveti na temperaturi od 2 °C do 8 °C do 5 dana ili
- u sekundarnoj epruveti na -20 °C do 90 dana.



Slika 4. Uvjeti skladištenja za SST-ove

C. Razrjeđivanje ispitaka plazme

Napomena: Ispitak plazme može se razrijediti u SAT-u ili sekundarnoj epruveti za testiranje na sustavu Panther. Pogledajte Postupak testiranja na sustavu Panther, korak E.4 za više informacija.

Napomena: Ako je ispitak razrijeđen, treba ga testirati odmah nakon razrjeđivanja. Ne zamrzavajte razrijeđeni ispitak.



Napomena: Razrjeđivanje ispitaka plazme smije se upotrebljavati samo za kvantitativne rezultate. Ne razrjeđujte uzorke plazme za dijagnostičke rezultate.

Uzorci na sustavu Panther

Nezačepljeni uzorci mogu se ostaviti na sustavu Panther do ukupno 8 sati. Uzorci se mogu izvaditi iz sustava Panther i testirati sve dok ukupno vrijeme provedeno na sustavu ne prelazi 8 sati prije nego što sustav Panther pipetira uzorak.

Prenošenje ispitka

Održavajte uvjete skladištenja uzorka kako je opisano u *Prikupljanje i skladištenje ispitaka*.

Napomena: Ispitci se moraju transportirati u skladu s primjenjivim nacionalnim, međunarodnim i regionalnim propisima o transportu.

Sustav Panther

Reagensi za test Aptima HIV-1 Quant Dx assay za sustav Panther navedeni su u nastavku. Pored naziva reagensa navedeni su i identifikacijski simboli reagensa.

Isporučeni reagensi i materijali

Komplet za test Aptima HIV-1 Quant Dx Assay

100 testova (1 komplet testa, 1 komplet kalibratora i 1 komplet kontrola) (kat. br. PRD-03000)

Dodatni kalibratori i kontrole mogu se naručiti zasebno. Pripadajuće kataloške brojeve potražite u nastavku.

Komplet za test Aptima HIV-1 Quant Dx Assay

(nakon primitka čuvajte na 2 °C do 8 °C)

Simbol	Komponenta	Količina
A	qHIV-1 Amplification Reagent <i>Neinfektivne nukleinske kiseline osušene u puferiranoj otopini.</i>	1 bočica
E	qHIV-1 Enzyme Reagent <i>Reverzna transkriptaza i RNK polimeraza osušene u otopini tretiranoj puferom HEPES.</i>	1 bočica
PRO	qHIV-1 Promoter Reagent <i>Neinfektivne nukleinske kiseline osušene u puferiranoj otopini.</i>	1 bočica
AR	qHIV-1 Amplification Reconstitution Solution <i>Vodena otopina koja sadržava glicerol i konzervanse.</i>	1 x 7,2 mL
ER	qHIV-1 Enzyme Reconstitution Solution <i>Otopina tretirana puferom HEPES koja sadržava površinski aktivnu tvar i glicerol.</i>	1 x 5,8 mL
PROR	qHIV-1 Promoter Reconstitution Solution <i>Vodena otopina koja sadržava glicerol i konzervanse.</i>	1 x 4,5 mL
TCR	qHIV-1 Target Capture Reagent <i>Nukleinske kiseline u puferiranoj otopini soli koja sadržava krutu fazu, neinfektivne nukleinske kiseline i interni kalibrator.</i>	1 x 72,0 mL
	Prstenovi za rekonstituciju	3
	List s crtičnim kodovima osnovne serije	1 list

Komplet kalibratora Aptima HIV-1 Quant Dx Calibrator (kat. br. PRD-03001)
(nakon primitka čuvajte na -15 °C do -35 °C)

Simbol	Komponenta	Količina
PCAL	qHIV-1 Positive Calibrator <i>Transkript u puferiranoj otopini.</i>	5 x 2,5 mL
Naljepnica s crtičnim kodom kalibratora		—

Komplet kontrola Aptima HIV-1 Quant Dx Controls (kat. br. PRD-03002)
(nakon primitka čuvajte na -15 °C do -35 °C)

Simbol	Komponenta	Količina
NC	qHIV-1 Negative Control <i>Defibrinirana ljudska plazma negativna na HIV-1 koja sadržava gentamicin i 0,2 % natrijevog azida kao konzervanse.</i>	5 x 1,5 mL
LPC	qHIV-1 Low Positive Control <i>Neinfektivni Armored RNA („oklopljeni RNK“) virusa HIV-1 u defibriniranoj ljudskoj plazmi koja sadržava gentamicin i 0,2 % natrijevog azida kao konzervanse.</i>	5 x 1,5 mL
HPC	qHIV-1 High Positive Control <i>Neinfektivni Armored RNA („oklopljeni RNK“) virusa HIV-1 u defibriniranoj ljudskoj plazmi koja sadržava gentamicin i 0,2 % natrijevog azida kao konzervanse.</i>	5 x 1,5 mL
Naljepnica s crtičnim kodom kontrole		—

Potrebni materijali koji su dostupni odvojeno

Napomena: Materijali dostupni kod tvrtke Hologic imaju navedene kataloške brojeve, osim ako je drugačije naznačeno.

Materijal	Kat. br.
Sustav Panther	303095
Sustav Panther Fusion System	PRD-04172
Panther System Continuous Fluids and Waste (Panther Plus)	PRD-06067
Aptima® HIV-1 Quant Dx Calibrator Kit	PRD-03001
Aptima® HIV-1 Quant Dx Controls Kit	PRD-03002
Panther™ Run Kit for Real Time Assays (samo za testove u stvarnom vremenu)	PRD-03455 (5000 testova)
Aptima® Assay Fluids Kit (naziva se i univerzalnim kompletom tekućina) <i>sadržava otopinu za pranje Aptima®, pufer za deaktivacijsku tekućinu Aptima® i uljni reagens Aptima®</i>	303014 (1000 testova)
<i>Jedinice za više epruveta (engl. multi-tube units, MTU)</i>	104772-02
<i>Komplet vrećica za otpad Panther™</i>	902731
<i>Poklopac koša za otpad Panther™</i>	504405
ili Panther™ System Run Kit <i>(kada se TMA testovi koji nisu u stvarnom vremenu izvode istovremeno s TMA testovima u stvarnom vremenu) sadržava MTU-ove, vreće za otpad, poklopce za kante za otpad, sustav za automatsko otkrivanje i tekućine za ispitivanje</i>	303096 (5000 testova)
Vrhovi, volumena 1000 µL, filtrirani, provodni, s mogućnosti mjerenja razine tekućine i za jednokratnu upotrebu <i>Nisu svi proizvodi dostupni u svim regijama. Obratite se svom predstavniku za informacije specifične za regiju.</i>	901121 (10612513 Tecan) 903031 (10612513 Tecan) MME-04134 (30180117 Tecan) MME-04128
Izbjeljivač, 5 % do 8,25 % (0,7 M do 1,16 M) otopine natrijeva hipoklorita	—
Rukavice bez pudera za jednokratnu upotrebu	—
Zamjenski čepovi za reagense <i>Bočice za rekonstituciju reagensa za amplifikaciju, enzimskog reagensa i promotorskog reagensa</i> <i>Bočica za TCR</i>	CL0041 (100 čepova) CL0040 (100 čepova)
Pokrovi s plastičnom poledinom za radne površine u laboratoriju	—
Maramice koje ne ostavljaju dlačice	—
Pipetor	—
Vrhovi	—
Opcije za primarne epruvete za prikupljanje (EDTA, ACD, PPT, SST, serum): <i>13 mm x 100 mm</i> <i>13 mm x 75 mm</i> <i>16 mm x 100 mm</i>	— — —
Centrifuga	—
Vorteks miješalica	—

Opcionalni materijali

Materijal	Kat. br.
Opcije za sekundarne epruvete:	
12 mm x 75 mm	—
13 mm x 100 mm	—
16 mm x 100 mm	—
Epruvete za alikvote ispitaka (SAT) Aptima (pakiranje od 100 komada)	FAB-18184
Čep za epruvetu za prijenos (pakiranje od 100 komada) čep za SAT	504415
Razrjeđivač za ispitke Aptima	PRD-03003
Komplet razrjeđivača za ispitke Aptima sadržava razrjeđivač za ispitke, 100 SAT-ova i 100 čepova	PRD-03478
Pipete za prijenos	—
Komercijalno dostupni paneli, na primjer: <i>HIV-1 organizacije Quality Control for Molecular Diagnostics (QCMD) ili panel za istraživanje virusnog opterećenja HIV-om organizacije College of American Pathologists (CAP) ili paneli za HIV ACCURUN tvrtke SeraCare</i>	—
Vatani štapići	—
Klackalica epruvete	PRD-03488

Postupak testiranja na sustavu Panther

Napomena: Dodatne informacije o postupku pogledajte u Priručniku za rukovatelja sustavom Panther / Panther Fusion System.

A. Priprema radnog prostora

- Očistite radne površine na kojima će se pripremati reagensi. Prebrišite radne površine otopinom natrijeva hipoklorita od 2,5 % do 3,5 % (0,35 M do 0,5 M). Ostavite otopinu natrijeva hipoklorita na površinama najmanje 1 minutu, a zatim je isperite deioniziranom (DI) vodom. Nemojte ostaviti otopinu natrijeva hipoklorita da se osuši. Površinu radnog stola na kojoj će se pripremati reagensi i uzorci prekrijte čistim apsorpcijskim pokrovima s plastičnom poledinom za radne površine u laboratoriju.
- Očistite zasebnu radnu površinu na kojoj će se pripremati uzorci. Primjenjujte prethodno opisani postupak (Korak A.1).
- Očistite sve pipetore. Primjenjujte prethodno opisani postupak (Korak A.1).

B. Priprema kalibratora i kontrola

Dopustite da kalibrator i kontrole dosegnu temperaturu od 15 °C do 30 °C prije obrade na sljedeći način:

1. Izvadite kalibrator i kontrole iz skladišta (od -15 °C do -35 °C) i stavite ih na temperaturu od 15 °C do 30 °C. Tijekom procesa odmrzavanja lagano okrećite svaku epruvetu kako biste ih dobro promiješali. Prije uporabe potvrdite da je sadržaj epruvete u potpunosti odmrznut.

Opcija. Epruvete kontrole i kalibratora mogu se postaviti na klackalicu epruvete kako bi se temeljito promiješale. Prije uporabe potvrdite da je sadržaj epruvete u potpunosti odmrznut.

Napomena: Izbjegavajte stvaranje prekomjerne pjene prilikom preokretanja kalibratora i kontrola. Pjena ugrožava mjerenje razine sustavom Panther.

2. Kada se sadržaj epruvete odmrzne, osušite vanjski dio epruvete čistom suhom maramicom za jednokratnu uporabu.
3. U tom trenutku nemojte otvarati epruvete kako ne bi došlo do kontaminacije.

C. Rekonstitucija reagensa / priprema novog kompleta

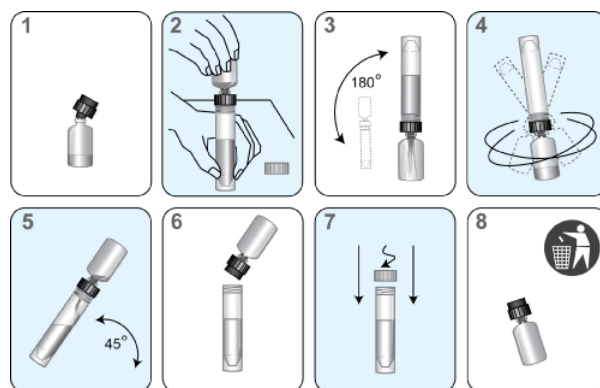
Napomena: Rekonstituciju reagensa potrebno je provesti prije početka rada na sustavu Panther.

1. Za pripremu reagensa za hvatanje ciljne sekvence (TCR) učinite sljedeće:
 - a. Izvadite TCR iz skladišta (od 2 °C do 8 °C). Provjerite broj serije na bočici TCR-a kako biste bili sigurni da odgovara broju serije na listu s crtičnim kodovima osnovne serije.
 - b. Odmah snažno protresite bočicu TCR-a 10 puta. Ostavite bočicu TCR-a da se zagrije na temperaturi od 15 °C do 30 °C najmanje 45 minuta. Tijekom tog razdoblja zavrtite i preokrenite bočicu TCR-a najmanje svakih 10 minuta.

Opcija. Bočica TCR-a može se pripremiti na klackalici epruvete sljedeći upute u nastavku: Izvadite TCR iz skladišta (od 2 °C do 8 °C) i odmah snažno protresite 10 puta. Stavite bočicu TCR-a u klackalicu epruvete i ostavite TCR da se zagrije na temperaturi od 15 °C do 30 °C najmanje 45 minuta.
 - c. Prije upotrebe provjerite je li sav talog u otopini i jesu li magnetske čestice suspendirane.
2. Za rekonstituciju reagensa za amplifikaciju, enzimskog reagensa i promotorskog reagensa izvedite sljedeće:
 - a. Izvadite liofilizirane reagense i odgovarajuće otopine za rekonstituciju iz skladišta (od 2 °C do 8 °C). Svaku otopinu za rekonstituciju uparite s njenim liofiliziranim reagensom.
 - b. Provjerite podudaraju li se boje oznaka na otopini za rekonstituciju i liofiliziranom reagensu. Provjerite brojeve serija na listu crtičnih kodova osnovne serije kako biste se uvjerali da ste uparili odgovarajuće reagense.
 - i. Otvorite bočicu s liofiliziranim reagensom uklanjanjem metalne brtve i gumenog čepa.
 - ii. Kraj prstena za rekonstituciju s urezima (crni) čvrsto umetnite na bočicu (Slika 5, korak 1).

- iii. Otvorite odgovarajuću bočicu otopine za rekonstituciju i čep stavite na čistu, prekrivenu radnu površinu.
- iv. Bočicu s otopinom za rekonstituciju postavite na stabilnu površinu (npr. stol). Zatim preokrenite bočicu s liofiliziranim reagensom iznad bočice s otopinom za rekonstituciju i čvrsto pričvrstite prsten na bočicu s otopinom za rekonstituciju (Slika 5, korak 2).
- v. Polako preokrenite sastavljene bočice (bočicu pričvršćenu na bočicu s otopinom) kako biste omogućili da se otopina iscijedi u staklenu bočicu (Slika 5, korak 3).
- vi. Podignite sastavljene bočice i miješajte ih kružnim pokretima najmanje 10 sekundi (Slika 5, korak 4).
- vii. Pričekajte najmanje 30 minuta da liofilizirani reagens prijeđe u otopinu.
- viii. Nakon što liofilizirani reagens prijeđe u otopinu, miješajte sastavljene bočice kružnim pokretima najmanje 10 sekundi, a zatim lagano protresite otopinu unutar staklene bočice naprijed-natrag kako biste je dobro promiješali.
- c. Polako ponovno nagnite sastavljene bočice kako biste omogućili da se sva otopina iscijedi natrag u bočicu s otopinom za rekonstituciju (Slika 5, korak 5).
- d. Pažljivo uklonite prsten za rekonstituciju i staklenu bočicu (Slika 5, korak 6).
- e. Ponovno začepite bocu. Zabilježite inicijale rukovatelja i datum rekonstitucije na naljepnici (Slika 5, korak 7).
- f. Odložite prsten za rekonstituciju i staklenu bočicu u otpad (Slika 5, korak 8).

Upozorenje: Izbjegavajte stvaranje prekomjerne pjene prilikom rekonstitucije reagensa. Pjena ugrožava mjerenje razine sustavom Panther.



Slika 5. Postupak rekonstitucije reagensa

D. Priprema reagensa za prethodno pripremljene reagense

1. Izvadite prethodno pripremljene reagense iz skladišta (od 2 °C do 8 °C).
2. Prije početka testa prethodno pripremljeni reagens za amplifikaciju, enzimski reagens i promotorski reagens te TCR trebaju dosegnuti temperaturu od 15 °C do 30 °C.
3. Za prethodno pripremljeni TCR izvedite prethodno navedeni korak C.1 prije postavljanja na sustav.
4. Miješajte kružnim pokretima i preokrećite reagens za amplifikaciju, enzimski reagens i promotorski reagens kako bi se dobro promiješali prije postavljanja na sustav. Izbjegavajte stvaranje prekomjerne pjene prilikom preokretanja reagensa.

Opcija: Prethodno pripremljeni reagensi mogu se pripremiti na klackalici epruvete slijedeći ove upute: Izvadite reagentse iz skladišta (od 2 °C do 8 °C). Stavite reagentse u klackalicu epruvete i ostavite da se zagriju na temperaturi od 15 °C do 30 °C najmanje 30 minuta.

5. Bočice s reagensom nemojte puniti do vrha. Sustav Panther prepoznat će i odbiti bočice koje su napunjene do vrha.

E. Rukovanje ispitkom

1. Pravilno pohranite obrađene ispitke u primarnim epruvetama ili nerazrijeđene ispitke u sekundarnim epruvetama u skladu s *Prikupljanje i skladištenje ispitaka*.
2. Pazite da zamrznuti ispitci budu potpuno odmrznuti. Odmrznute ispitke miješajte u vorteks miješalici 3 do 5 sekundi kako biste ih dobro promiješali.
3. Dopustite da ispitci dosegnu temperaturu od 15 °C do 30 °C prije obrade. Pogledajte *Uzorci na sustavu Panther* za dodatne informacije o postavljanju na sustav.
4. Osigurajte da svaka primarna epruveta za prikupljanje sadržava do 1200 µL ispitka ili da svaki SAT sadržava najmanje 700 µL ispitka. Pogledajte tablicu u *Prikupljanje i skladištenje ispitaka* kako biste utvrdili zahtjeve za mrtvi volumen za svaku vrstu primarne i sekundarne epruvete. Ako je potrebno razrijediti ispitak, dodatne informacije potražite u koraku E.5 u nastavku.
5. Razrijedite ispitak plazme u omjeru 1:3 u SAT-u ili 1:100 u sekundarnoj epruveti.

Ispitak plazme može se razrijediti u sekundarnoj epruveti za testiranje na sustavu Panther.



Napomena: Razrjeđivanje ispitaka plazme smije se upotrebljavati samo za kvantitativne rezultate. Ne razrjeđujte uzorke plazme za dijagnostičke rezultate.

Napomena: Ako je ispitak razrijeđen, mora se testirati odmah nakon razrjeđivanja.

a. Razrjeđivanje ispitaka s malim volumenom

Volumen ispitaka plazme može se povećati na minimalni potrebni volumen (700 µL) s pomoću razrjeđivača za ispitke Aptima. Ispitci s najmanje 240 µL plazme mogu se razrijediti s dva dijela razrjeđivača za ispitke (1:3) na sljedeći način:

- i. Stavite 240 µL ispitka u SAT.
- ii. Dodajte 480 µL razrjeđivača za ispitke Aptima.
- iii. Začepite epruvetu.
- iv. Lagano preokrenite 5 puta da biste promiješali.

Uzorci razrijeđeni u omjeru 1:3 mogu se testirati primjenom opcije 1:3 na sustavu Panther (pogledajte *Priručnik za rukovatelja sustavom Panther / Panther Fusion System* za više informacija). Softver će automatski prijaviti rezultat nerazrijeđenog uzorka primjenom faktora razrjeđivanja. Ti ispitci bit će označeni kao razrijeđeni ispitci.

b. Razrjeđivanje ispitaka visokog titra

Ako je rezultat ispitka iznad gornje granice kvantifikacije, može se razrijediti s 99 dijelova razrjeđivača za ispitke Aptima (1:100) na sljedeći način:

- i. Stavite 30 µL ispitka u SAT ili sekundarnu epruvetu.
- ii. Dodajte 2970 µL razrjeđivača za ispitke Aptima.
- iii. Začepite epruvetu.
- iv. Lagano preokrenite 5 puta da biste promiješali.

Uzorci razrijeđeni u omjeru 1:100 mogu se testirati primjenom opcije 1:100 na sustavu Panther (pogledajte *Priručnik za rukovatelja sustavom Panther / Panther Fusion System* za više informacija). Softver će automatski prijaviti rezultat nerazrijeđenog uzorka primjenom faktora razrjeđivanja. Ti ispitci bit će označeni kao razrijeđeni ispitci.

Napomena: Za razrijeđene ispitke čije su nerazrijeđene koncentracije veće od gornje granice kvantifikacije (engl. upper limit of quantitation, ULoQ) rezultati će biti prikazani u znanstvenom zapisu.

6. Neposredno prije postavljanja ispitaka na stalak za uzorke centrifugirajte svaki ispitak na 1000 do 3000 g 10 minuta. Ne skidajte čepove. Mjehurići u epruveti mogu ugroziti mjerenje razine sustavom Panther.

Pogledajte *Priprema sustava*, korak F.2 u nastavku za informacije o postavljanju na stalak i uklanjanju čepova.

F. Priprema sustava

1. Sustav postavite u skladu s uputama u *Priručniku za rukovatelja sustavom Panther / Panther Fusion System* i *Napomene o postupku*. Pobrinite se da se upotrebljavaju stalci za reagense i adapteri za TCR odgovarajuće veličine.
2. Postavite uzorke u stalak za uzorke. Izvršite sljedeće korake za svaku epruvetu s uzorkom (ispitak i, kada je potrebno, kalibrator i kontrole):

- a. Otpustite jedan čep epruvete za uzorak, ali ga još nemojte uklanjati.

Napomena: Budite posebno oprezni kako biste izbjegli kontaminaciju širenjem aerosola. Lagano otpustite čepove na uzorcima.

- b. Stavite epruvetu s uzorkom u stalak za uzorke.
- c. Ponovite korake a i b za svaki preostali uzorak.
- d. Nakon što se uzorci postave u stalak za uzorke, uklonite i bacite svaki čep epruvete s uzorkom u jednom stalku za uzorke. Kako biste izbjegli kontaminaciju, nemojte prenositi čep preko drugih stalaka za uzorke ili epruveta za uzorke.
- e. Ako je potrebno, upotrijebite novu pipetu za prijenos za jednokratnu uporabu kako biste uklonili mjehuriće ili pjenu.
- f. Kada se ukloni posljednji čep, umetnite stalak za uzorke u odjeljak za uzorke.

Napomena: Ako istovremeno obrađujete druge testove i vrste uzoraka, pričvrstite držač uzorka prije nego što stalak za uzorke postavite u odjeljak za uzorke.

- g. Ponovite korake od a do f za sljedeći stalak za uzorke.

Napomene o postupku

A. Kalibratori i kontrole

1. Epruvete s qHIV-1 pozitivnim kalibratorom, qHIV-1 nisko pozitivnom kontrolom, qHIV-1 visoko pozitivnom kontrolom i qHIV-1 negativnom kontrolom mogu se umetnuti u bilo koji položaj na stalku za uzorke i u bilo koji utor odjeljka za uzorke na sustavu Panther. Pipetiranje uzoraka započet će kada je zadovoljen jedan od sljedećih dvaju uvjeta:
 - a. Sustav trenutačno obrađuje kalibrator i kontrole.
 - b. U sustavu su registrirani važeći rezultati za kalibrator i kontrole.

2. Kada se epruveta s kalibratorom i kontrolne epruvete pipetiraju i obrađuju za komplet reagensa testa Aptima HIV-1 Quant Dx assay, ispitci se mogu testirati s pomoću pridruženog rekonstituiranog kompleta do 24 sata, **osim u sljedećim slučajevima:**
 - a. Rezultati kalibratora ili kontrola nisu valjani.
 - b. Pridruženi komplet analitičkog reagensa uklanja se iz sustava.
 - c. Pridruženi komplet analitičkog reagensa premašio je granice stabilnosti.
 3. Epruvetu kalibratora i svaku kontrolnu epruvetu moguće je upotrijebiti samo jednom. Pokušaji uporabe epruvete više od jednom mogu dovesti do pogrešaka pri obradi.
- B. Puder iz rukavica
- Kao i kod svakog drugog sustava reagensa, višak pudera na nekim rukavicama može uzrokovati kontaminaciju otvorenih epruveta. Preporučuje se uporaba rukavica bez pudera.

Kontrola kvalitete

Rezultat ciklusa ili ispitka može poništiti rukovatelj ako tijekom provođenja ispitivanja uoči tehničke poteškoće, poteškoće pri rukovanju ili poteškoće vezane uz instrument te ih dokumentira. U tom slučaju potrebno je ponovno testirati ispitke.

Kalibracija testa

Za generiranje valjanih rezultata potrebno je dovršiti kalibraciju testa. Jedan pozitivni kalibrator izvodi se u tri ponavljanja svaki put kada se komplet reagensa umetne u sustav Panther. Nakon uspostavljanja kalibracija je valjana do 24 sata. Softver na sustavu Panther upozorava rukovatelja kada je potrebna kalibracija. Rukovatelj skenira koeficijent kalibracije koji se nalazi na listu s crtičnim kodovima osnovne serije, koji se isporučuje sa svakim kompletom reagensa.

Tijekom obrade softver sustava Panther automatski provjerava kriterije za prihvaćanje kalibratora. Ako su valjana manje od dva replikata kalibratora, softver automatski poništava ciklus. Uzorci u poništenom ciklusu moraju se ponovno testirati primjenom svježe pripremljenog kalibratora i svježe pripremljenih kontrola.

Negativne i pozitivne kontrole

Za dobivanje valjanih rezultata mora se testirati skup kontrola testa. Jedan replikat negativne kontrole, nisko pozitivne kontrole i visoko pozitivne kontrole mora se testirati svaki put kada se komplet reagensa postavi u sustav Panther. Nakon što se uspostave, kontrole su valjane do 24 sata. Softver sustava Panther upozorava rukovatelja kada su potrebne kontrole.

Tijekom obrade softver sustava Panther automatski provjerava kriterije za prihvaćanje kontrola. Za generiranje valjanih rezultata negativna kontrola mora dati rezultat „Not Detected” (Nije otkriveno), a pozitivne kontrole moraju dati rezultate unutar unaprijed definiranih parametara (ciljna vrijednost za LPC: $\sim 3 \text{ Log}_{10}$ kopija/mL, ciljna vrijednost za HPC: $\sim 5 \text{ Log}_{10}$ kopija/mL). Ako bilo koja od kontrola ima nevaljani rezultat, softver automatski poništava ciklus. Uzorci u poništenom ciklusu moraju se ponovno testirati primjenom svježe pripremljenog kalibratora i svježe pripremljenih kontrola.

Interni kalibrator / interna kontrola

Svaki uzorak sadržava interni kalibrator / internu kontrolu (IC). Tijekom obrade kriteriji prihvatljivosti IC-a automatski se provjeravaju u softveru sustava Panther. Ako je rezultat IC-a nevažeći, rezultat uzorka poništava se. Svaki uzorak s nevažećim rezultatom IC-a mora se ponovno testirati kako bi se dobio valjan rezultat. Softver sustava Panther osmišljen je za preciznu provjeru obrada kada se postupci izvode slijedeći upute iz ove upute u pakiranju i *Priručnika za rukovatelja sustavom Panther / Panther Fusion System*.

Tumačenje rezultata

Napomena: Kvantitativni rezultati testa Aptima HIV-1 Quant Dx assay procijenjeni su na temelju plazme. Serum se ne smije upotrebljavati za dobivanje kvantitativnih rezultata. Kvalitativni rezultati procijenjeni su i za plazmu i za serum.

Sustav Panther automatski određuje koncentraciju RNK virusa HIV-1 za ispitke i kontrole usporedbom rezultata s kalibracijskom krivuljom. Koncentracije RNK virusa HIV-1 prikazane su u kopijama/mL i $\log_{10}$ kopija/mL. Tumačenje rezultata navedeno je u Tablica 1. Test Aptima HIV-1 Quant Dx assay uključuje dvostruke sustave amplifikacije i detekcije ciljne sekvence, što znači da neovisno cilja regije pol i LTR. Rezultat koji sustav prijavljuje temeljit će se na primarnom sustavu, pol, osim ako pol nije pojačan. U tim slučajevima sustav će prijaviti rezultat iz sekundarnog sustava, LTR.

Ako se za razrijeđene ispitke upotrebljava razrjeđenje 1:3 ili 1:100, sustav Panther automatski izračunava koncentraciju virusa HIV-1 za nerazrijeđeni ispitak množenjem razrijeđene koncentracije s faktorom razrjeđivanja, a razrijeđeni uzorci označavaju se kao razrijeđeni.

Napomena: Za razrijeđene ispitke rezultati navedeni kao „Not Detected” (Nije otkriveno) ili „<30 detected” (< 30 otkriveno) mogu se dobiti razrjeđivanjem ispitka s prethodno navedenom koncentracijom, ali blizu LoD (granice detekcije, engl. limit of detection) ili LLoQ (donje granice kvantifikacije, engl. lower limit of quantitation). Preporučuje se prikupljanje i testiranje drugog nerazrijeđenog ispitka ako se ne dobije kvantitativni rezultat.

Sustav Panther ne daje kvalitativni rezultat (tj. „Reactive” (Reaktivno) ili „Non-reactive” (Nereaktivno)) za dijagnostičku upotrebu. Rukovatelj mora protumačiti prijavljenu koncentraciju RNK virusa HIV-1 kao kvalitativni rezultat (Tablica 1). Ispitci čiji su rezultati navedeni kao „Not Detected” (Nije otkriveno) nisu reaktivni na RNK virusa HIV-1. Ispitci čiji su rezultati navedeni kao „<30 detected” (< 30 otkriveno) ili ispitci čiji su rezultati navedeni unutar i iznad linearnog raspona označavaju da je RNK virusa HIV-1 otkrivena i da su ti ispitci reaktivni na RNK virusa HIV-1.

Tablica 1: Tumačenje rezultata

Zabilježeni rezultat testa Aptima HIV-1 Quant Dx Assay		Koncentracija RNK virusa HIV-1 Tumačenje	Korisničko dijagnostičko kvalitativno tumačenje ^c
Kopija/mL ^a	Vrijednost $\log_{10}$ ^b		
Nije otkriveno	Nije otkriveno	RNK virusa HIV-1 nije otkrivena.	Nije reaktivno na RNK virusa HIV-1
< 30 otkriveno	< 1,47	RNK virusa HIV-1 otkrivena je, ali na razini ispod LLoQ-a.	Reaktivno na RNK virusa HIV-1
od 30 do 10.000.000	od 1,47 do 7,00	Koncentracija RNK virusa HIV-1 jest unutar linearnog raspona od 30 do 10.000.000 kopija/mL.	Reaktivno na RNK virusa HIV-1
> 10.000.000	> 7,00	Koncentracija RNK virusa HIV-1 iznad je gornje granice kvantifikacije (ULoQ).	Reaktivno na RNK virusa HIV-1
Nevaljano ^d	Nevaljano ^d	Došlo je do pogreške u generiranju rezultata. Potrebno je ponovo testirati ispitak.	Nevaljano ^d

^a Faktor pretvorbe iz kopija u međunarodne jedinice (engl. *International Units*, IU) za 3. međunarodni standard za RNK virusa HIV-1 (10/152) iznosi 0,35 kopija/IU.

^b Vrijednost se skraćuje na dvije decimale.

^c Dijagnostičko tumačenje ne bi trebalo provoditi na temelju rezultata „non-reactive” (nereaktivno) za razrijeđene ispitke. Uzmite novi nerazrijeđeni ispitak i ponovno testirajte.

^d Nevaljani rezultati prikazani su fontom u plavoj boji.

Kada rezultati postanu dostupni na zaslonu Results (Rezultati), vrijednosti kvantifikacije za svaku ciljnu sekvencu može se pristupiti putem značajke Sample Curve Report (Izvešće o krivulji uzorka) u softveru sustava Panther. Za pregled vrijednosti i krivulja amplifikacije odaberite Sample ID (ID uzorka) za uzorak na zaslonu Results (Rezultati) softvera sustava Panther. Zatim odaberite gumb „Curve Data” (Podaci krivulje). Otvara se prozor sa Sample Curve Report (Izvešće o krivulji uzorka), koje uključuje profile fluorescencije i vrijednosti kvantifikacije za uzorak.

Napomena: Podaci dobiveni iz Sample Curve Report (Izvešće o krivulji uzorka) navode se samo u informativne svrhe (npr. za rješavanje problema i provjeru krivulje). Potvrđeni rezultat koji treba prijaviti za uzorak softver sustava Panther prikazuje na zaslonu Results (Rezultati) i u izvješću Results (Rezultati).

Napomena: Za dodatne upute za rad sa sustavom Panther pogledajte Priručnik za rukovatelja sustavom Panther / Panther Fusion System.

Kriteriji prihvatljivosti za svaku od kontrola testa Aptima HIV-1 Quant Dx assay navedeni su u Tablica 2.

Napomena: Raspon iskoristivosti naveden u nastavku mijenja se na temelju dodijeljene vrijednosti svake određene serije. Pogledajte dodijeljenu koncentraciju navedenu na listu s kontrolnim crtičnim kodovima koji se isporučuje sa svakom kutijom kontrola.

Tablica 2: Kriteriji prihvatljivosti za raspon iskoristivosti testa Aptima HIV-1 Quant Dx Assay

Komponenta	Raspon iskoristivosti za valjane cikle
Negativna kontrola	N/D
Nisko pozitivna kontrola	+/- 0,5 log ₁₀ kopija/mL
Visoko pozitivna kontrola	+/- 0,5 log ₁₀ kopija/mL

Ograničenja

- A. Uporaba ovog testa ograničena je na osoblje koje je obučeno za postupak. Neuspješno praćenje uputa navedenih u ovoj uputi u pakiranju može rezultirati pogrešnim rezultatima.
- B. Pouzdani rezultati ovise o primjerenom prikupljanju, prijenosu, skladištenju i obradi ispitaka.
- C. Ovaj je test potvrđen za uporabu kao kvantitativni test samo s ljudskom plazmom s EDTA-om i ACD-om.
- D. Ovaj je test potvrđen za uporabu kao kvalitativni test s ljudskom plazmom i serumom s EDTA-om i ACD-om.
- E. Iako su rijetke, mutacije unutar visoko očuvanih regija virusnog genoma pokrivenih početnicama i/ili sondama u testu Aptima HIV-1 Quant Dx assay mogu rezultirati nedovoljnom kvantifikacijom ili neuspjehom u otkrivanju virusa.
- F. Ovaj test nije potvrđen za upotrebu u pacijenata koji se podvrgavaju terapijama temeljenima na lentivirusnim vektorima, kao što je CAR-T stanična terapija. Moguće regije preklapanja virusnog genoma pokrivene početnicama i/ili sondama u testu Aptima HIV-1 Quant Dx assay mogu rezultirati amplifikacijom lentivirusnih vektora koji se upotrebljavaju u terapijama temeljenima na lentivirusnim vektorima.

Analitička učinkovitost

Granica detekcije (LoD) primjenom 3. međunarodnog standarda SZO-a za HIV-1

Granica detekcije (LoD) definirana je kao koncentracija RNK virusa HIV-1 koja se otkriva s vjerojatnošću od 95 % ili većom prema dokumentu EP17-A2 instituta CLSI (37). LoD je određen testiranjem panela koji su se sastojali od razrjeđenja 3. međunarodnog standarda SZO-a za HIV-1 (podtip B, NIBSC kod: 10/152) u EDTA plazmi i serumu negativnima na HIV-1. Trideset replikata svakog razrjeđenja izvedeno je na trima sustavima Panther upotrebom triju serija reagensa, što je ukupno 90 replikata za svako razrjeđenje. Prema dokumentu EP17-A2 instituta CLSI LoD-ovi su definirani na temelju rezultata iz serije reagensa s najvišom koncentracijom za predviđenu granicu detekcije (LoD) i prikazani su u Tablica 3. Probit analizom predviđena granica detekcije od 95 % za LoD za test Aptima HIV-1 Quant Dx assay iznosi 12 kopija/mL (35 IU/mL) u plazmi i 8,9 kopija/mL (25 IU/mL) u serumu (0,35 kopija = 1 IU).

Tablica 3: Granica detekcije testa Aptima HIV-1 Quant Dx Assay primjenom 3. međunarodnog standarda SZO-a za HIV-1

Predviđena granica detekcije	Plazma		Serum	
	Koncentracija (kopija/mL)	Koncentracija (IU/mL)	Koncentracija (kopija/mL)	Koncentracija (IU/mL)
10 %	1,2	3,3	0,8	2,2
20 %	1,6	4,6	1,1	3,1
30 %	2,0	5,7	1,4	4,0
40 %	2,5	7,2	1,7	4,9
50 %	3,1	8,8	2,1	5,9
60 %	3,8	11	2,5	7,2
70 %	4,8	14	3,1	8,9
80 %	6,2	18	4,0	11
90 %	9,0	26	5,8	17
95 %	12,1	35	8,9	26

Granica detekcije za podtipove i skupine virusa HIV-1

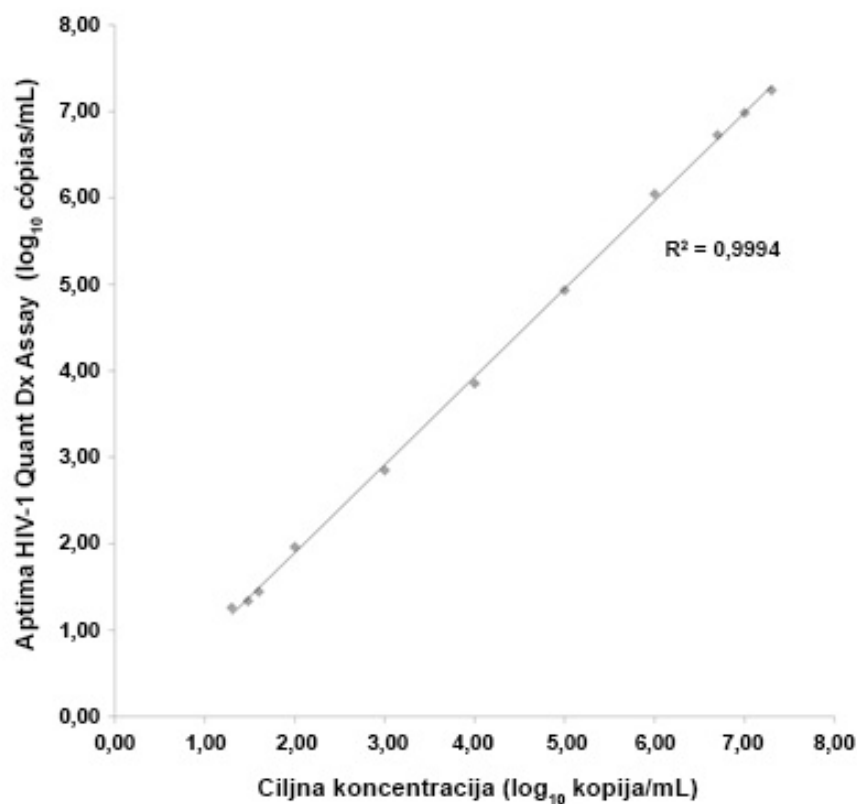
Za HIV-1 skupine M (podtipovi A, C, D, F, G, CRF01_AE, CRF02_AG) te skupine N i O izrađeno je šest pozitivnih panela i jedan negativni panel dodavanjem kultiviranog virusa HIV-1 ili pozitivnih kliničkih ispitaka u ljudsku EDTA plazmu i serum negativne na HIV-1 (od 0 do 40 kopija/mL). Svaki član panela testiran je u 30 replikata s dvjema serijama reagensa, što je ukupno 60 replikata po članu panela. Dodjeljivanje koncentracije za kliničke ispitke ili kultivirane zalihe virusa određeno je s pomoću usporednog testa. Probit analiza provedena je kako bi se generirale predviđene granice detekcije od 50 % i 95 %. Prema dokumentu EP17-A2 instituta CLSI (37) LoD-ovi su definirani na temelju rezultata iz serije reagensa s najvišom koncentracijom za predviđenu granicu detekcije definiranu kao LoD kako je prikazano u Tablica 4.

Tablica 4: Granica detekcije za podtipove i skupine virusa HIV-1

Podtip/skupina	Predviđena granica detekcije	Plazma	Serum
		Koncentracija (kopija/mL)	Koncentracija (kopija/mL)
A	50 %	3,0	4,0
	95 %	11,5	14,5
CRF01_AE	50 %	1,5	4,5
	95 %	4,5	15,7
CRF02_AG	50 %	3,8	4,3
	95 %	15,1	14,3
C	50 %	2,0	4,1
	95 %	9,8	16,7
D	50 %	4,2	3,7
	95 %	13,8	15,2
F	50 %	2,4	4,9
	95 %	8,9	15,0
G	50 %	3,5	2,5
	95 %	15,7	6,5
N	50 %	1,4	2,1
	95 %	6,1	5,9
O	50 %	1,9	6,5
	95 %	6,5	27,2

Linearni raspon

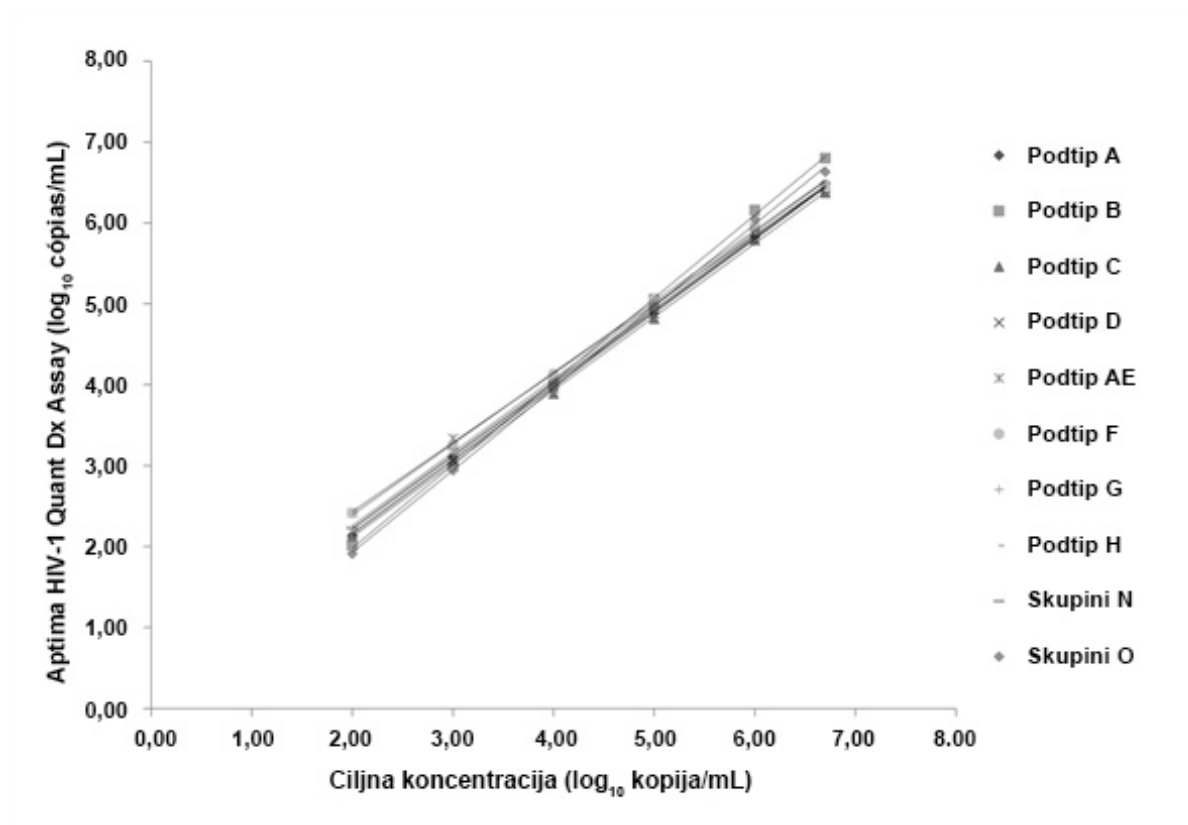
Linearni raspon testa Aptima HIV-1 Quant Dx assay utvrđen je testiranjem panela koji su se sastojali od kultiviranog virusa HIV-1 podtipa B razrijeđenog u ljudskoj EDTA plazmi negativnoj na HIV-1 u skladu s dokumentom EP06-A instituta CLSI (38). Koncentracija panela bila je u rasponu od 1,30 do 7,30 $\log_{10}$ kopija/mL. Testiranje je provedeno na sedam sustava Panther s dvjema serijama reagensa. Kao što je prikazano u Slika 6, za test Aptima HIV-1 Quant Dx assay dokazana je linearnost u cijelom testiranom rasponu.



Slika 6. Linearnost testa Aptima HIV-1 Quant Dx Assay

Linearnost među podtipovima i skupinama virusa HIV-1

Linearni odgovor testa Aptima HIV-1 Quant Dx assay u skupini M (podtipovi A, B, C, D, F, G, H, CRF01_AE) i skupinama N i O potvrđen je testiranjem panela koji su se sastojali od transkripta virusa HIV-1 razrijeđenog u puferu u koncentracijama u rasponu od 2,00 do 6,70 $\log_{10}$ kopija/mL. Testiranje je provedeno na četirima sustavima Panther i u šest ciklusa. Linearnost je dokazana u cijelom testiranom rasponu (Slika 7).



Slika 7. Linearnost u skupini M (podtipovi A, B, C, D, F, G, H, CRF01_AE) i skupinama N i O

Određivanje donje granice kvantifikacije s pomoću 3. međunarodnog standarda SZO-a za HIV-1

Donja granica kvantifikacije (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) definirana je kao najniža koncentracija pri kojoj se RNK virusa HIV-1 pouzdano kvantificira unutar ukupne pogreške (TE), prema dokumentu EP17-A2 instituta CLSI (37). TE je izračunat s pomoću Westgardovog modela ($TE = |\text{odstupanje}| + 2SD$). Kako bi se osigurala točnost i preciznost mjerenja, TE testa Aptima HIV-1 Quant Dx assay postavljen je na $1 \log_{10}$ kopija/mL (tj. pri LLoQ-u, razlika između dvaju mjerenja veća od $1 \log_{10}$ kopija/mL statistički je značajna).

LLoQ je određen testiranjem panela koji su se sastojali od razrjeđenja 3. međunarodnog standarda SZO-a za HIV-1 (podtip B, NIBSC kod: 10/152) u ljudskoj EDTA plazmi negativnoj na HIV-1. Prema dokumentu EP17-A2 instituta CLSI, paneli su testirani s trima serijama reagensa u replikatima od 30 za svaku seriju iz 23 ciklusa. Rezultati su prikazani u Tablica 5. Najviši LLoQ u trima serijama testiranim testom Aptima HIV-1 Quant Dx assay primjenom 3. međunarodnog standarda SZO-a za HIV-1 jest 15 kopija/mL ($1,17 \log_{10}$ kopija/mL) (Tablica 6).

Tablica 5: Određivanje LLoQ-a testa Aptima HIV-1 Quant Dx Assay primjenom 3. međunarodnog standarda SZO-a za HIV-1

Serija reagensa	Ciljna koncentracija ($\log_{10}$ kopija/mL)	Aptima HIV-1 Quant Dx ($\log_{10}$ kopija/mL)	SD ($\log_{10}$ kopija/mL)	Odstupanje ($\log_{10}$ kopija/mL)	Izračunati TE ($\log_{10}$ kopija/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

SD = standardno odstupanje TE = ukupna pogreška.

Tablica 6: Sažetak LLoQ-a primjenom 3. međunarodnog standarda SZO-a za HIV-1 (3 serije reagensa)

Serijski broj reagensa	LLoQ (log ₁₀ kopija/mL)	LLoQ (kopija/mL)
1	0,94	8,7
2	1,17	15
3	0,98	9,5

Potvrda LLoQ-a za sve podtipove i skupine virusa HIV-1

LLoQ za sve podtipove i skupine virusa HIV-1 potvrđen je prema dokumentu EP17-A2 instituta CLSI (37). Paneli su izrađeni za svaku skupinu HIV-1 M (podtipovi A, B, C, D, F, G, CRF01_AE, CRF02_AG) te skupine N i O dodavanjem prirodno zaraženih kliničkih uzoraka ili kliničkih izolata u skupne uzorke ljudske EDTA plazme negativne na HIV-1. Testiranje se sastojalo od ukupno 30 replikata po članu panela. Podaci u Tablica 7 prikazuju najnižu koncentraciju za svaki podtip ili skupinu pri kojoj je TE bio manji od 1 log₁₀ kopija/mL. Najviši LLoQ za sve testirane podtipove i skupine bio je 30 kopija/mL; stoga je ova viša vrijednost odabrana kao LLoQ za test Aptima HIV-1 Quant Dx assay (Tablica 7).

Tablica 7: Potvrda LLoQ-a prema podtipu ili skupini virusa HIV-1

Panel	LLoQ (kopija/mL)
Podtip A	30
Podtip CRF01_AE	10
Podtip CRF02_AG	30
Podtip B	10
Podtip C	30
Podtip D	15
Podtip F	15
Podtip G	30
Skupina N	10
Skupina O	15

Preciznost

Kako bi se procijenila preciznost testa Aptima HIV-1 Quant Dx assay, panel koji je izrađen dodavanjem kultiviranog virusa HIV-1 podtipa B u EDTA plazmu negativnu na HIV-1 testirala su tri rukovatelja koji su upotrebljavali tri serije reagensa na trima sustavima Panther tijekom 20 dana (Tablica 8). Panel se sastojao od jednog člana panela negativnog na HIV-1 i osam članova panela pozitivnih na HIV-1. Dodjeljivanje koncentracije za kliničke ispitke ili kultivirane zalihe virusa određeno je s pomoću usporednog testa.

Tablica 8: Preciznost testa Aptima HIV-1 Quant Dx Assay

Broj valjanih replikata	Srednja koncentracija (log ₁₀ kopija/mL)	Među instrumentima		Među rukovateljima		Među serijama		Među ciklusima		Unutar ciklusa		Ukupno	
		SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	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 = koeficijent varijacije, SD = standardno odstupanje.

^a Ovaj član panela razrijeđen je u omjeru 1:3 razrjeđivačem za ispitke i testiran kako bi se procijenila preciznost razrijeđenog uzorka.

Napomena: Varijabilnost nekih čimbenika može biti brojčano negativna, što se može dogoditi ako je varijabilnost zbog tih čimbenika vrlo mala. Kada se to dogodi, SD = 0 i CV = 0 %. Ukupan broj testiranih replikata iznosio je 162 za svaki panel; analizirani su samo replikati s brojčanom vrijednošću.

Potencijalno interferirajuće endogene i egzogene tvari

Procijenjena je osjetljivost testa Aptima HIV-1 Quant Dx assay na interferenciju uzrokovanu povišenim razinama endogenih tvari i lijekovima koji se obično propisuju osobama zaraženima virusom HIV-1. Testirani su uzorci ljudske EDTA plazme negativni na HIV-1 i uzorci obogaćeni virusom HIV-1 do koncentracije od $3 \log_{10}$ kopija/mL RNK virusa HIV-1.

Nije uočena interferencija u učinkovitosti testa Aptima HIV-1 Quant Dx assay u prisutnosti albumina (90 mg/mL), hemoglobina (5 mg/mL), triglicerida (30 mg/mL) ili nekonjugiranog bilirubina (0,2 mg/mL).

Nije uočena interferencija u učinkovitosti testa Aptima HIV-1 Quant Dx assay u prisutnosti egzogenih tvari navedenih u Tablica 9 pri koncentracijama najmanje tri puta većim od $C_{\max}$ (ljudska plazma).

Tablica 9: Egzogene tvari

Skupni uzorak egzogenih tvari	Testirane egzogene tvari
1	Lopinavir, indinavir, sakvinavir, ritonavir, nelfinavir mezilat, darunavir, amprenavir, atazanavir
2	Nevirapin, efavirenz, rilpivirin, klaritromicin, amfotericin B
3	Tenofovir dizoproksil fumarat, adefovir dipivoksil, ribavirin, enfuvirtid, maravirok, raltegravir, dolutegravir
4	Abakavir sulfat, didanozin, zidovudin, lamivudin, stavudin, entekavir, telbivudin, emtricitabin
5	Paroksetin hidroklorid, fluoksetin, sertralin
6	Ganciklovir, valaciklovir, aciklovir, rifampin/rifampicin, etambutol
7	Ciprofloksacin, azitromicin, amoksicilin, cefaleksin, ampicilin, trimetoprim
8	Valganciklovir hidroklorid, boceprevir, telaprevir, simeprevir, sofosbuvir
9	Pegilirani interferon alfa-2b, interferon alfa-2a, interferon alfa-2b
10	Heparin, EDTA, natrijev citrat
11	Tipranavir
12	Izoniazid

Klinički ispiti EDTA plazme navedeni u Tablica 10 od pacijenata s povišenim razinama definiranih tvari ili od pacijenata s navedenim bolestima testirani su testom Aptima HIV-1 Quant Dx assay uz prisutnost i bez prisutnosti 3 log₁₀ kopija RNK virusa HIV-1. Nije uočena nikakva interferencija s učinkovitosti.

Tablica 10: Testirane vrste kliničkih ispita

Vrste kliničkih ispita	
1	Reumatoidni faktor (RF)
2	Antinuklearna protutijela (ANA)
3	Anti-Jo-1 protutijelo (JO-1)
4	Sistemska eritematozni lupus (SLE)
5	Rheumatoid arthritis (RA) (Reumatoidni artritis)
6	Multipla skleroza (MS)
7	Hiperglobulinemija
8	Povišena alanin aminotransferaza (ALT)
9	Alkoholna ciroza (AC)
10	Multipli mijelom (MM)
11	Lipemični (povišeni lipidi)
12	Ikterični (povišeni bilirubin)
13	Hemoliziran (povišeni hemoglobin)
14	Povišeni proteinski albumin
15	Protutijela na HCV
16	Protutijela na HBV
17	Protutijela na HIV-2

Učinkovitost s ispiscima negativnima na HIV-1

Specifičnost testa Aptima HIV-1 Quant Dx assay određena je s pomoću 120 svježih i 510 zamrznutih ispitaka EDTA plazme negativne na HIV-1. RNK virusa HIV-1 nije otkrivena ni u jednom od 630 uzoraka (specifičnost od 100 %; 95 % CI: 99,4 – 100 %) (Tablica 11).

Tablica 11: Specifičnost u ispiscima plazme

	Svježa plazma	Zamrznuta plazma	Sve
Valjani replikati (n)	120	510	630
Nereaktivno	120	510	630
Specifičnost (95 % CI)	100 % (97,0 – 100)	100 % (99,3 – 100)	100 % (99,4 – 100)

CI = interval pouzdanosti

Potencijalno interferirajuća kontaminacija mikroorganizmima

Potencijalna unakrsna reaktivnost s patogenima (Tablica 12) procijenjena je testom Aptima HIV-1 Quant Dx assay u prisutnosti ili odsutnosti 3 log₁₀ kopija/mL RNK virusa HIV-1 u ljudskoj EDTA plazmi negativnoj na HIV-1. U prisutnosti patogena nije uočena interferencija s učinkovitosti testa.

Tablica 12: Patogeni testirani na unakrsnu reaktivnost

Patogen	Koncentracija
Virus hepatitisa A	100.000 PFU/mL ^a
Virus hepatitisa B	100.000 IU/mL ^b
Virus hepatitisa C	100.000 IU/mL
Virus hepatitisa G	100.000 kopija/mL
Virus herpes simplex 1 (HSV-1)	100.000 PFU/mL
Virus herpes simplex 2 (HSV-2)	75.000 PFU/mL
Virus humanog herpesa 6	100.000 kopija/mL
Virus humanog herpesa 8	42.000 PFU/mL
HIV-2	5.500 PFU/mL
Limfotropni virus humanih T-stanica (HTLV)	100.000 vp/mL ^c
Virus Zapadnog Nila	100.000 kopija/mL
Parvovirus B19	100.000 IU/mL
Citomegalovirus	100.000 kopija/mL
Epstein-Barrov virus	100.000 kopija/mL
Adenovirus tipa 5	100.000 PFU/mL
Virus denge	100.000 kopija/mL
Virus gripe 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 = jedinice koje tvore plak po mL.^b IU/mL = međunarodne jedinice po mL.^c vp/mL = virusne čestice po mL.^d CFU/mL = jedinice koje tvore kolonije po mL.^e IFU/mL = jedinice koje tvore inkluzije po mL.

Ponovljivost kliničkih ispitaka

Deset kliničkih uzoraka EDTA plazme i deset uzoraka seruma testirano je u trima replikatima s pomoću testa Aptima HIV-1 Quant Dx assay. Prosječna koncentracija i standardno odstupanje (SD) prikazani su u Tablica 13 i Tablica 14.

Tablica 13: Ponovljivost kliničkih ispitaka plazme

Ispitak	Plazma	
	Prosječna koncentracija (log ₁₀ kopija/mL)	SD
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

SD = standardno odstupanje

Tablica 14: Ponovljivost kliničkih ispitaka seruma

Ispitak	Serum	
	Prosječna koncentracija (log ₁₀ kopija/mL)	SD
1	1,68	0,10
2	2,44	0,19
3	3,08	0,03
4	3,37	0,06
5	4,05	0,04
6	4,55	0,06
7	5,06	0,04
8	5,49	0,05
9	6,28	0,02
10	6,79	0,04

SD = standardno odstupanje

Razrjeđivanje uzorka s pomoću razrjeđivača za ispitke

Panel koji se sastojao od 11 uzoraka s koncentracijama koje su obuhvaćale linearni raspon testa Aptima HIV-1 Quant Dx assay i od dvaju uzoraka iznad ULoQ-a testa testiran je nerazrijeđen i razrijeđen (1:3 ili 1:100 u razrjeđivaču za ispitke) u tri primjerka kako bi se procijenilo razrjeđivanje uzorka (Tablica 15).

Tablica 15: Razrjeđivanje uzorka

Razrjeđivanje	Prosječna nerazrijeđena koncentracija (log ₁₀ kopija/mL)	Prosječna zabilježena koncentracija ^a (log ₁₀ kopija/mL)	Razlika
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 Zabilježena koncentracija je vrijednost o kojoj izvještava sustav Panther nakon primjene faktora razrjeđivanja.

^b Obogaćeni ispitak.

^c Svi rezultati > 7,00 log₁₀ kopija/mL procijenjeni su dodatnom analizom.

Prijenos

Kako bi se utvrdilo da sustav Panther umanjuje rizik od lažno pozitivnih rezultata koji proizlaze iz prijenosne kontaminacije, provedena je višestruka analitička studija s pomoću obogaćenih panela na dvama sustavima Panther. Prijenos je procijenjen s pomoću uzoraka obogaćenih virusom HIV-1 s visokim titrom (7 log₁₀ kopija/mL) raspoređenih između uzoraka negativnih na HIV-1 u uzorku šahovske ploče. Testiranje je provedeno u pet ciklusa. Ukupna stopa prijenosa bila je 0 % (n = 469).

Serokonverzijski panel

Devetnaest skupova panela za serokonverziju HIV-1, koji su se sastojali od 204 uzorka, testirani su s pomoću testa Aptima HIV-1 Quant Dx assay. Detekcija RNK virusa HIV-1 uspoređena je s detekcijom testovima na antigen p24 i testovima na protutijela na HIV-1/2. Broj dana do prvog reaktivnog rezultata dobivenog testovima na antigen p24, testovima na protutijela anti-HIV 1/2 i testom Aptima HIV-1 Quant Dx assay naveden je u Tablica 16. Testom Aptima HIV-1 Quant Dx assay otkrivena je RNK virusa HIV-1 u prosjeku 5,58 i 11,16 dana prije nego testovima na antigen p24 i protutijela anti-HIV 1/2.

Tablica 16: Sažetak podataka za serokonverzijski panel

ID panela	Broj testiranih članova panela	Broj reaktivnih članova panela			Dani do prvog reaktivnog rezultata			Razlika u danima do prvog reaktivnog rezultata (na temelju datuma uzimanja krvi)	
		Aptima HIV-1 Quant Dx	HIV antigen p24	Protutijelo anti-HIV 1/2	Aptima HIV-1 Quant Dx	HIV antigen p24	Protutijelo anti-HIV 1/2	Ranije otkrivanje u odnosu na HIV antigen p24 u danima	Ranije otkrivanje u odnosu na protutijela anti-HIV 1/2 u danima
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
Ukupno	204	82	51	20			Srednja vrijednost Medijan	5,58 7	11,16 12

^a Nijedan uzorak krvi u ovom panelu nije bio reaktivan na protutijela anti-HIV 1/2. Posljednji dan uzimanja uzorka krvi upotrijebljen je kao „Dani do prvog reaktivnog rezultata”.

Testiranje na protutijela anti-HIV-1/2 izvedeno je testom Abbot Anti-HIV 1/2, uz sljedeće iznimke:

^b Paneli PRB974, PRB975 i PRB978 testirani su testom Siemens Anti-HIV 1/2.

Testiranje na HIV-1 antigen p24 izvedeno je testom Coulter HIV-1 p24 Ag, uz sljedeće iznimke:

^b Paneli PRB974, PRB975 i PRB978 testirani su testom BioMerieux p24 Ag.

Studija ekvivalentnosti seruma i plazme

Za procjenu ekvivalentnosti usklađeni skupovi seruma i plazme (25 pozitivnih na HIV-1 i 25 negativnih na HIV-1) i 40 uzoraka koji su obogaćeni kultiviranim virusom HIV-1 (50 – 1.000.000 kopija/mL u plazmi i serumu negativnima na HIV-1) testirani su testom Aptima HIV-1 Quant Dx assay. Negativno slaganje iznosilo je 100,0 % (95 % CI: 97,0 % – 100,0 %). Pozitivno slaganje iznosilo je 98,4 % (95 % CI: 95,4 % – 99,5 %).

Studije obnovljivosti

Obnovljivost u uzorcima plazme

Obnovljivost testa Aptima HIV-1 Quant Dx assay u uzorcima plazme procijenjena je na 3 vanjske lokacije. Dva rukovatelja provodila su testiranje na svakoj lokaciji. Svaki je rukovatelj izvodio 2 ciklusa dnevno tijekom 3 dana, uporabom 3 serije reagensa tijekom testiranja. U svakom ciklusu bila su 3 replikata svakog člana panela.

Obnovljivost je testirana s pomoću članova panela koji su se sastojali od EDTA plazme negativne na HIV-1. Pozitivni članovi panela stvoreni su dodavanjem kultiviranog virusa (HIV-1 podtip B) u negativnu plazmu u koncentracijama koje su obuhvaćale linearni raspon testa Aptima HIV-1 Quant Dx assay.

Tablica 17 prikazuje obnovljivost i preciznost rezultata ispitivanja za svakog pozitivnog člana panela između lokacija, između rukovatelja, između serija, između dana, između ciklusa, unutar ciklusa i ukupno. Kada su uključeni samo uzorci s rezultatima iznad donje granice kvantifikacije (LLOQ) (uzorci s rezultatima ispod LLOQ-a isključeni su), ukupni SD iznosio je $\leq 0,2 \log_{10}$ kopija/mL za sve članove panela. Kada su uključeni svi uzorci u kojima je bilo moguće otkriti RNK virusa HIV-1, ukupne vrijednosti SD-a ostale su nepromijenjene osim za člana panela 1, koji je imao ukupni SD od $0,3 \log_{10}$ kopija/mL.

Za sve članove panela pozitivne na HIV-1 vrijednosti slaganja bile su 100 %. Za člana panela negativnog na HIV-1 testirano je 108 replikata i RNK virusa HIV-1 nije otkrivena ni u jednom od 108 replikata (negativno slaganje = 100 %, 95 %-tni CI rezultata: od 96,6 % do 100 %).

Tablica 17: Obnovljivost i preciznost testa Aptima HIV-1 Quant Dx Assay na sustavu Panther u članovima panela sastavljenima od pozitivne plazme

Panel	N ^a	Srednja vrijednost log ₁₀ kopija/mL	Između lokacija		Između rukovatelja		Između serija		Između dana		Između ciklusa		Unutar ciklusa		Ukupno	
			SD	% CV	SD	% CV	SD	% CV	SD	% CV	SD	% CV	SD	% CV	SD	% CV
1	107	1,71 ^b	0,05	2,66	0,07	4,10	0,07	4,09	0,00	0,00	0,17	9,90	0,25	14,62	0,32	18,77
	85 ^c	1,84	0,07	3,51	0,00	0,00	0,02	0,97	0,00	0,00	0,06	3,07	0,17	8,98	0,19	10,17
2	108	2,94	0,08	2,74	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	1,49	0,00	0,00	0,11	3,69	0,14	4,83
3	108	3,84	0,07	1,75	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	0,95	0,04	0,98	0,06	1,62	0,11	2,75
4	108	4,94	0,08	1,52	0,00	0,00	0,03	0,57	0,03	0,50	0,05	1,01	0,06	1,18	0,11	2,30
5	108	5,71	0,07	1,26	0,00	0,00	0,01	0,22	0,05	0,85	0,04	0,77	0,07	1,23	0,12	2,11
6	108 ^d	6,71	0,05	0,80	0,00	0,00	0,02	0,32	0,03	0,43	0,07	1,03	0,06	0,85	0,11	1,65

CV = koeficijent varijacije, SD = standardno odstupanje

^a Broj valjanih rezultata testova s RNK virusa HIV-1 koja se može otkriti.

^b Uključuje 22 replikata zabilježena kao < 1,47 log₁₀ kopija/mL. Ovom uzorku dodijeljena je vrijednost od 1,176 log₁₀ kopija/mL.

^c Broj valjanih rezultata unutar linearnog raspona testa.

^d Uključuje jedan replikat zabilježen kao > 7 log₁₀ kopija/mL. Ovom uzorku dodijeljena je vrijednost od 7,18 log₁₀ kopija/mL.

Napomena: Varijabilnost nekih čimbenika može biti brojčano negativna. To se može dogoditi ako je varijabilnost zbog tih čimbenika vrlo mala (manja od 0,01). U tim se slučajevima SD i CV prikazuju kao 0.

Obnovljivost u uzorcima seruma

Obnovljivost testa Aptima HIV-1 Quant Dx assay u uzorcima seruma procijenjena je na 3 vanjske lokacije. Dva rukovatelja provodila su testiranje na svakoj lokaciji. Svaki je rukovatelj izvodio 1 ciklus dnevno tijekom 5 dana, uporabom 1 serije reagensa tijekom testiranja. U svakom ciklusu bila su 3 replikata svakog člana panela.

Obnovljivost je testirana s pomoću članova panela pripremljenih sa serumom negativnim na HIV-1. Dva pozitivna člana panela stvorena su dodavanjem kultiviranog virusa (HIV-1 podtip B) u koncentracijama od 3X – 5X LoD i 10X LoD u negativnu matricu seruma.

Tablica 18 prikazuje obnovljivost i preciznost rezultata ispitivanja za svakog pozitivnog člana panela između lokacija, između rukovatelja, između dana, između ciklusa, unutar ciklusa i ukupno.

Za sve članove panela pozitivne na HIV-1 vrijednosti slaganja bile su 100 %. Za člana panela negativnog na HIV-1 testirano je 90 replikata i RNK virusa HIV-1 nije otkrivena u 89/90 replikata (negativno slaganje = 98,9 %, 95 %-tni CI rezultata: od 94,0 % do 99,8 %).

Tablica 18: Obnovljivost i preciznost testa Aptima HIV-1 Quant Dx Assay na sustavu Panther u članovima panela sastavljenim od pozitivnog seruma

Panel	N	Srednja vrijednost u Log ₁₀ kopija/ mL	Između lokacija		Između rukovatelja		Između dana		Između ciklusa		Unutar ciklusa		Ukupno	
			SD	% CV	SD	% CV	SD	% CV	SD	% CV	SD	% CV	SD	% CV
1	90	1,34	0,07	5,41	0,00	0,00	0,04	2,63	0,00	0,00	0,22	16,26	0,23	17,34
2	89	1,95	0,05	2,41	0,02	0,97	0,00	0,00	0,00	0,00	0,19	9,67	0,20	10,01

CV = logaritamski normalni koeficijent varijacije, SD = standardno odstupanje (log₁₀ kopija/mL).

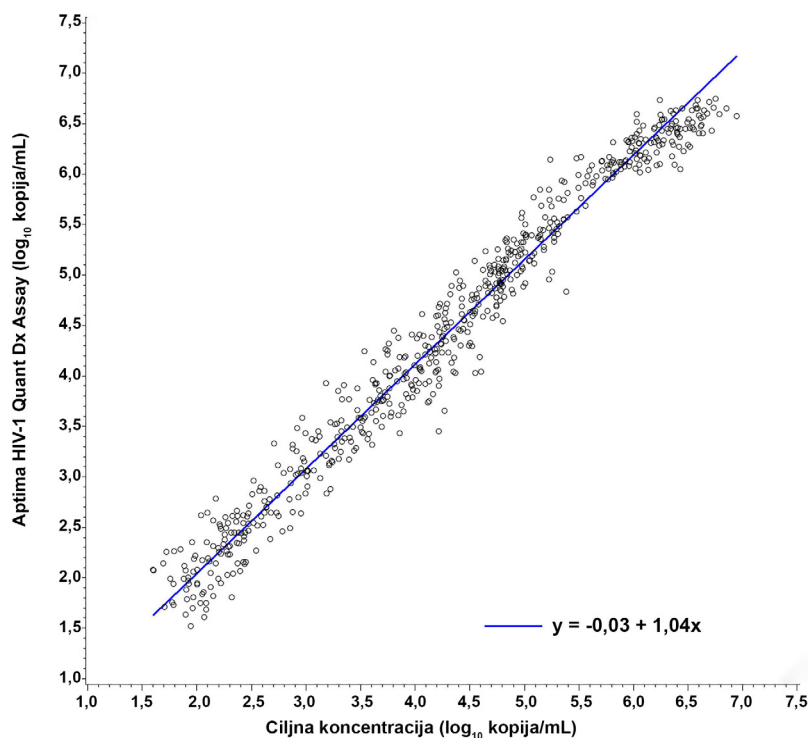
Napomena: Varijabilnost nekih čimbenika može biti brojčano negativna. To se može dogoditi ako je varijabilnost zbog tih čimbenika vrlo mala. U tim se slučajevima SD i CV prikazuju kao 0,00.

Klinička učinkovitost

Potvrda kvantifikacije virusnog opterećenja

Kvantifikacija RNK virusa HIV-1 uspoređena je između testa Aptima HIV-1 Quant Dx assay i usporednog testa. Studija je uključivala testiranje kliničkih uzoraka EDTA plazme (pohranjenih svježih ili zamrznutih) i umjetno dobivenih uzoraka (kultivirani virus dodan u negativne kliničke uzorke plazme). Svaki uzorak testiran je u duplikatu testom Aptima HIV-1 Quant Dx assay i usporednim testom. Testiranje testom Aptima HIV-1 Quant Dx assay provedeno je na 3 vanjske lokacije, pri čemu su se na svakoj lokaciji upotrebljavale 3 serije kompleta reagensa; testiranje usporednim testom provedeno je u 1 vanjskom laboratoriju.

Testom Aptima HIV-1 Quant Dx assay i usporednim testom testirano je 628 usklađenih skupova uzoraka (unutar linearnog raspona obaju testova) dobivenih od 484 uključena ispitanika i 144 umjetno dobivena uzorka. Slika 8 prikazuje rezultate Demingove regresijske analize ($y = -0,03 + 1,04x$).



Slika 8. Korelacija između testa Aptima HIV-1 Quant Dx Assay i usporednog testa

Studije kliničke specifičnosti

Klinička specifičnost u uzorcima negativnima na HIV-1

Prethodno zamrznuti uzorci EDTA plazme negativni na HIV-1 dobiveni od dobrovoljnih darivatelja pune krvi testirani su testom Aptima HIV-1 Quant Dx assay. Testiranje je provedeno s 3 serije kompleta reagensa na 3 vanjske lokacije. Klinička specifičnost izračunata je kao postotak uzoraka negativnih na HIV-1 s rezultatom „Not Detected” (Nije otkriveno). Testirano je šest stotina (600) uzoraka plazme negativnih na HIV-1, a RNK virusa HIV-1 nije otkrivena ni u jednom od 600 uzoraka. Specifičnost u negativnim uzorcima plazme iznosila je 100 % (600/600, 95 %-tni CI rezultata: od 99,4 % do 100 %).

Klinička specifičnost u populaciji niskog rizika

Prethodno zamrznuti uzorci dobiveni od darivatelja krvi koji su to činili prvi puta i osoba koje nisu darivatelji krvi, koje imaju niski rizik od infekcije virusom HIV-1, testirani su testom Aptima HIV-1 Quant Dx assay. Testiranje je provedeno s 1 serijom kompleta reagensa na 1 vanjskoj lokaciji. Klinička specifičnost izračunata je usporedbom rezultata testa Aptima HIV-1 Quant Dx assay s rezultatima testa NAT.

Tablica 19 prikazuje specifičnost testa Aptima HIV-1 Quant Dx assay u populaciji niskog rizika prema vrsti uzorka.

Tablica 19: Klinička specifičnost testa Aptima HIV-1 Quant Dx Assay u populaciji niskog rizika prema vrsti uzorka

Vrsta uzorka	n	TP	FP	TN	FN	Specifičnost % (95 % CI) ^a
Sve	911	4	3	902	2	99,7 (99,0, 99,9)
Serum	304	1	2 ^b	300	1	99,3 (97,6, 99,9)
Plazma	607	3	1	602	1	99,8 (99,1, 100)

CI = interval pouzdanosti, FN = lažno negativno, FP = lažno pozitivno, TN = stvarno negativno, TP = stvarno pozitivno.

^a Clopper-Pearson CI.

^b 1 od 2 uzorka seruma s lažno pozitivnim ishodom bio je pozitivan kada je testiran kombiniranim imunotestom na antigen/protutijelo HIV-1/HIV-2 4. generacije.

Studije kliničke osjetljivosti

Klinička osjetljivost u uzorcima pozitivnima na HIV-1

Prethodno zamrznuti uzorci pozitivni na HIV-1 testirani su testom Aptima HIV-1 Quant Dx assay. Testiranje je provedeno s 2 serije kompleta reagensa na 3 lokacije, uključujući 2 vanjske lokacije.

Tablica 20 prikazuje osjetljivost testa Aptima HIV 1 Quant Dx assay u pozitivnim uzorcima prema vrsti uzorka.

Tablica 20: Klinička osjetljivost testa Aptima HIV-1 Quant Dx Assay u uzorcima pozitivnima na HIV-1 prema vrsti uzorka

Vrsta uzorka	n	TP	FN	Osjetljivost % (95 % CI) ^a
Sve	1572	1565	7	99,6 (99,1, 99,8)
Serum	524	520	4	99,2 (98,1, 99,8)
Plazma	1048	1045	3	99,7 (99,2, 99,9)

CI = interval pouzdanosti, FN = lažno negativno, TP = stvarno pozitivno.

^a Clopper-Pearson CI.

Klinička osjetljivost u populaciji visokog rizika

Prospektivno prikupljeni uzorci od osoba s visokim rizikom od infekcije virusom HIV-1 testirani su testom Aptima HIV-1 Quant Dx assay. Testiranje je provedeno s 1 serijom kompleta reagensa na 3 lokacije, uključujući 2 vanjske lokacije. Klinička osjetljivost izračunata je usporedbom rezultata testa Aptima HIV-1 Quant Dx assay s rezultatima testa NAT.

Od 498 uzoraka koji su se mogli procijeniti, 332 bili su uzorci plazme, a 166 uzorci seruma. Klinička osjetljivost iznosila je 100 % (1/1, 95 %-tni CI: od 20,7 % do 100 %) u uzorcima seruma. Osjetljivost nije mogla biti procijenjena u uzorcima plazme jer nisu uočeni uzorci sa stvarno pozitivnim ili lažno negativnim rezultatima testa.

Pozitivnost u serodiskordantnim uzorcima

Prethodno zamrznuti serodiskordantni uzorci (tj. oni koji su ponovljeno reaktivni na početnom imunotestu na HIV i neodređeni ili negativni na dodatnom imunotestu) dobiveni su od darivatelja krvi, a osobe koje nisu darivatelji krvi testirane su testom Aptima HIV-1 Quant Dx assay. Od 473 uzorka koji su se mogli procijeniti 76 ih je odabrano iz serokonverzijskih panela. Testiranje je provedeno s 2 serije kompleta reagensa na 1 internoj lokaciji. Pozitivnost je izračunata za serodiskordantne uzorke testirane testom Aptima HIV-1 Quant Dx assay.

Tablica 21 prikazuje pozitivnost testa Aptima HIV-1 Quant Dx assay u serodiskordantnim uzorcima prema skupini uzoraka, vrsti dodatnog testa na HIV i rezultatu dodatnog testa na HIV.

Tablica 21: Pozitivnost testa Aptima HIV-1 Quant Dx Assay u serodiskordantnim uzorcima

Vrsta dodatnog testa	Rezultat dodatnog testa	Pozitivnost % (n/N) 95 % CI ^a		
		Skupina panela bez serokonverzije		Skupina serokonverzijskih panela
		3. gen.	4. gen.	4. gen.
HIV-1/2 imunokromatografski	Negativan	N/D	0,0 (0/11) 0,0 – 25,9	100 (6/6) 61,0 – 100
HIV-1/2 imunokromatografski	Neodređeni	N/D	100 (1/1) 20,7 – 100	100 (1/1) 20,7 – 100
HIV-1/2 brzi	Negativan	N/D	0,0 (0/11) 0,0 – 25,9	100 (24/24) 86,2 – 100
HIV-1/2 brzi	Neodređeni	N/D	0,0 (0/2) 0,0 – 65,8	N/D
HIV-1 WB ili IFA	Negativan	0,4 (1/239) 0,1 – 2,3	100 (4/4) 51,0 – 100	100 (35/35) 90,1 – 100
HIV-1 WB ili IFA	Neodređeni	0,0 (0/128) 0,0 – 2,9	100 (1/1) 20,7 – 100	100 (10/10) 72,2 – 100

3. gen. = imunotest treće generacije, 4. gen. = imunotest četvrte generacije, CI = interval pouzdanosti, IFA = indirektni imunofluorescentni test, N/D = nije dostupno, WB = Western blot.

^a CI rezultata.

Bibliografija

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. Rouzioux, 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. DeCock, K.M., Jaffe, H.W., Curran, J.W. The evolving epidemiology of HIV/AIDS. *AIDS*, 2012.
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. Esinhart, 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. Schukkink, 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. **Gill, P. and Ghaemi, A.** 2008. Nucleic acid isothermal amplification technologies: a review. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* **27**(3):224–43.
32. **Hill, C.** 2001. Molecular diagnostic testing for infectious diseases using TMA technology. *Expert Reve. Mol. Diagn.* **1**(4): 445–455.
33. **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.
34. **29 CFR Part 1910.1030.** Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens; current version.
35. **Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health.** Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL); current version.
36. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2002. *Clinical Laboratory Waste Management.* CLSI Document GP5-A2. Villanova, PA.
37. **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.
38. **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.

Kontaktни podaci i povijest revizija



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



Hologic BV
Da Vinci laan 5
1930 Zaventem
Belgium

Australski naručitelj
Hologic (Australia &
New Zealand) Pty Ltd.
Macquarie Park NSW 2113

Za adresu e-pošte i telefonski broj za tehničku podršku te korisničku službu za određenu zemlju posjetite web-mjesto www.hologic.com/support.

Ozbiljne štetne događaje do kojih je došlo u vezi s proizvodom u Europskoj uniji potrebno je prijaviti proizvođaču i nadležnom tijelu države članice u kojoj se korisnik i/ili pacijent nalazi.

Hologic, Aptima, Panther, Panther Fusion i pridruženi logotipi zaštitni su znakovi ili registrirani zaštitni znakovi tvrtke Hologic, Inc. i/ili njezinih podružnica u SAD-u i/ili drugim zemljama.

Armored RNA zaštitni je znak tvrtke Asuragen, Inc.

Svi drugi zaštitni znakovi koji se mogu pojaviti u ovoj uputi vlasništvo su svojih vlasnika.

Ovaj proizvod može biti obuhvaćen jednim ili više patenata u SAD-u koji su identificirani na www.hologic.com/patents.

© 2020. – 2025. Hologic, Inc. Sva prava pridržana.

AW-28214-2501 Rev. 002

2025-10

Povijest revizija	Datum	Opis
AW-28214-2501 Rev. 001	Travanj 2025.	• Prvo izdanje radi ispunjavanja zahtjeva Uredbe IVDR.
AW-28214-2501 Rev. 002	Listopad 2025.	• Ova verzija je usklađena s AW-28214-001 Rev. 002 i Rev. 003 (This version aligns with AW-28214-001 Rev. 002 & Rev. 003).