Aptima® HCV Quant Dx Assay

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

Informazioni generali 2
Uso previsto 2
Riepilogo e spiegazione dell'analisi 2
Principi della procedura 3
Sintesi relativa alla sicurezza e alla prestazione 4
Avvertenze e precauzioni 4
Requisiti di conservazione e manipolazione dei reagenti 8
Raccolta e conservazione dei campioni biologici 9
Campioni caricati sul Panther System 12
Trasporto dei campioni biologici 12
Panther System 13
Reagenti e materiali forniti 13
Materiali richiesti ma disponibili separatamente 15
Materiali opzionali 16
Procedura di analisi del Panther System 16
Note procedurali 21
Controllo della qualità 22
Calibrazione del test 22
Controlli positivi e negativi 22
Calibratore interno/Controllo interno 22
Interpretazione dei risultati 23
Limiti 24
Prestazioni analitiche 25
Limite di rilevamento (LoD) utilizzando il secondo standard internazionale dell'OMS 25
Limite di rilevamento nei genotipi dell'HCV 25
Intervallo lineare 26
Linearità nei genotipi dell'HCV 27
Limite inferiore di quantificazione utilizzando il secondo standard internazionale dell'OMS 28
Determinazione del limite inferiore di quantificazione (LLoQ) nei genotipi dell'HCV 29
Riconducibilità allo standard internazionale dell'OMS 31
Precisione 32
Sostanze potenzialmente interferenti 32
Prestazioni con campioni negativi all'HCV 34
Specificità analitica 35
Campioni clinici contenenti virus diversi dall'HCV 36
Equivalenza di matrice 36
Diluizione (1:3) dei campioni con il diluente dei campioni Aptima 37
Diluizione (1:100) dei campioni con il diluente dei campioni Aptima 38
Verifica del LLoQ nei campioni clinici diluiti nel diluente dei campioni 39
Precisione dei campioni diluiti 40
Contaminazione crociata 40
Pannello di sieroconversione 40
Studio sulla riproducibilità 41
Prestazioni cliniche 43
Correlazione fra metodi 43
Studio sull'utilità clinica 44
Risposta alla terapia antivirale 47
Studio sull'utilità diagnostica 50
Reattività crociata in soggetti con epatopatia non correlata all'HCV 52
Bibliografia 54
Recapiti e cronologia delle revisioni 55

Informazioni generali

Uso previsto

Il test Aptima® HCV Quant Dx Assay è un test di amplificazione mediata da trascrizione in tempo reale. Questo test viene utilizzato per il rilevamento e la quantificazione dell'RNA del virus dell'epatite C (HCV) presente nel siero e nel plasma umani freschi e congelati di individui infettati dall'HCV.

Il plasma può essere preparato in acido etilendiamminotetraacetico (EDTA), in una soluzione di acido citrico-citrato-destrosio anticoagulante (ACD) e in provette di preparazione del plasma (PPT). Il siero può essere preparato in provette con siero e in provette con separatore di siero (SST). I campioni biologici vengono analizzati utilizzando il Panther™ System per il trattamento, l'amplificazione, il rilevamento e la quantificazione automatici degli stessi. I campioni biologici contenenti i genotipi 1-6 di HCV sono validati per il rilevamento e la quantificazione nel test.

Il test Aptima HCV Quant Dx Assay è indicato per l'utilizzo come ausilio nella diagnosi di infezione da HCV. Il test può essere utilizzato per confermare l'infezione da HCV attiva in pazienti con un risultato degli anticorpi anti-HCV positivo. Il rilevamento dell'RNA dell'HCV indica che il virus si sta replicando e, pertanto, è una prova di infezione in corso.

Il test Aptima HCV Quant Dx Assay è indicato per l'utilizzo come ausilio nella gestione dei pazienti infettati da HCV che si sottopongono a una terapia farmacologica antivirale per l'HCV. Il test misura i livelli di RNA dell'HCV al basale, durante il trattamento e dopo il trattamento per determinare la risposta virologica sostenuta (SVR). I risultati del test Aptima HCV Quant Dx Assay devono essere interpretati all'interno del contesto di tutti i risultati clinici e di laboratorio rilevanti.

Il test Aptima HCV Quant Dx Assay non è destinato all'uso come test di screening per rilevare la presenza dell'HCV nel sangue o nei prodotti ematici.

Riepilogo e spiegazione dell'analisi

L'HCV, un patogeno a diffusione ematogena, rappresenta un problema per la salute pubblica mondiale. Difatti, si contano un massimo di 170 milioni di persone infette in tutto il mondo e 350.000 decessi l'anno dovuti a patologie associate all'HCV, tra cui cirrosi e carcinoma epatico.[1,2] La trasmissione dell'HCV avviene attraverso l'esposizione al sangue, agli emoderivati o ad attività potenzialmente comportanti l'esposizione percutanea.[3,4] Sotto il profilo genetico, l'HCV contiene un genoma con RNA a filamento positivo costituito da 9500 nucleotidi che codificano proteine strutturali (nucleo, glicoproteine E1 e E2 e proteina del canale ionico p7) e proteine non strutturali (NS2, NS3, NS4A/B e NS5A/B), di cui le seconde sono proteine chiave di replicazione virale e target degli antivirali ad azione diretta.[4,5] Due regioni non tradotte (untranslated region, UTR) del genoma, 5'UTR e 3'UTR, hanno rispettivamente un ruolo nella traduzione genomica e un ruolo nella replicazione o nell'impacchettamento.[5] La regione 5'UTR è la regione genomica più altamente conservata nei sei principali genotipi dell'HCV.[6]

Sotto il profilo clinico, si registra un'alta prevalenza di infezione da HCV asintomatica; inoltre, l'infezione cronica da HCV si verifica fino al 75% dei pazienti.[2] Gli algoritmi di test di laboratorio per l'HCV prevedono la diagnosi di infezioni da HCV in corso in individui positivi agli anticorpi attraverso il rilevamento dell'RNA dell'HCV nel plasma o nel siero per consentire un appropriato collegamento alla cura.[7,8,9]

La quantificazione dell'RNA dell'HCV (carica virale) ha giocato un ruolo fondamentale nella definizione e nel monitoraggio del trattamento di successo dell'HCV. La risposta virologica sostenuta (sustained virological response, SVR), definita in termini di RNA dell'HCV non

rilevato a seguito di terapia efficace, è un marker chiave per una cura dell'HCV.[10,11] Nella terapia a base di interferone, una risposta virologica precoce (early virological response, EVR), definita in termini di una riduzione minima di 2 logaritmi della carica virale dell'HCV dopo 12 settimane di terapia, e una risposta virologica rapida (rapid virological response, RVR), definita in termini di livelli non rilevabili di RNA dell'HCV dopo 4 settimane di terapia, hanno dimostrato di essere predittrici positive della SVR.[10,12,13] Questi indicatori di cinetica virale sono utilizzati in approcci basati sulla risposta di personalizzazione delle alternative di trattamento allo scopo di interrompere o prolungare la terapia per ottenere l'SVR.[14] Gli studi di follow-up a lungo termine hanno altresì dimostrato la persistenza dell'SVR dopo un trattamento efficace e la prevenzione della progressione dell'epatopatia grazie all'eradicazione virale.[10]

Nell'era degli antivirali ad azione diretta (direct-acting antiviral, DAA), la quantificazione dell'RNA dell'HCV (carica virale) ha giocato un ruolo fondamentale nella definizione e nel monitoraggio dell'efficacia del trattamento dell'HCV. La risposta virologica sostenuta (sustained virological response, SVR) è definita in termini di RNA dell'HCV non rilevabile (mediante un test che ha un limite di rilevamento di <25 UI/mL) a seguito di terapia.[10,11] Le recenti linee guida dell'AASLD suggeriscono di eseguire test sull'RNA dell'HCV non solo al basale, ma anche periodicamente nel corso del trattamento (ossia a 4 settimane) e a 12 settimane dopo la fine del trattamento.[10,12,13]

Principi della procedura

Il test Aptima HCV Quant Dx Assay è un test di amplificazione degli acidi nucleici che si avvale della tecnologia di amplificazione mediata da trascrizione (TMA) in tempo reale per rilevare e quantificare l'RNA dell'HCV come ausilio per la diagnosi o per stabilire la carica virale al basale e valutare le risposte durante e dopo il trattamento. Il test si rivolge una regione conservata del genoma dell'HCV, rilevando e quantificando i genotipi 1, 2, 3, 4, 5 e 6. Il test è standardizzato sulla base del secondo standard internazionale dell'OMS per il virus dell'epatite C (codice NIBSC 96/798).[12]

Il test Aptima HCV Quant Dx Assay comprende tre fasi principali, svolte tutte all'interno di un'unica provetta sul Panther System; queste fasi sono: cattura del target, amplificazione del target mediante TMA e rilevamento dei prodotti di amplificazione (amplicone) mediante sonde fluorescenti (torce).

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

L'amplificazione del target avviene tramite TMA, che è un metodo di amplificazione degli acidi nucleici mediato da trascrizione che utilizza due enzimi, la trascriptasi inversa del virus della leucemia murina di Moloney (MMLV) e la polimerasi dell'RNA T7. La trascriptasi inversa viene usata per generare una copia di DNA (contenente una sequenza promotrice della polimerasi dell'RNA T7) della sequenza target. La polimerasi dell'RNA T7 produce copie multiple di amplicone di RNA dal modello della copia di DNA. Il test Aptima HCV Quant Dx Assay utilizza il metodo TMA per amplificare una porzione della regione 5'UTR del genoma dell'HCV. L'amplificazione di questa regione si ottiene utilizzando primer specifici progettati per amplificare i genotipi dell'HCV 1, 2, 3, 4, 5 e 6.

Il rilevamento si ottiene utilizzando torce di acido nucleico monofilamento presenti durante l'amplificazione del target e che ibridizzano specificamente con l'amplicone in tempo reale. Ogni torcia presenta un fluoroforo e uno smorzatore. Quando la torcia non si ibridizza con l'amplicone, lo smorzatore si trova in prossimità del fluoroforo e sopprime la fluorescenza.

Quando la torcia si lega all'amplicone, il quencher viene allontanato dal fluoroforo ed emetterà un segnale a una specifica lunghezza d'onda quando eccitato da una sorgente luminosa. Quando più torce ibridizzano con l'amplicone, viene generato un segnale fluorescente più elevato. Il tempo impiegato dal segnale fluorescente per raggiungere una soglia specificata è proporzionale alla concentrazione iniziale di HCV. Ogni reazione presenta un calibratore interno/controllo interno (CI) che controlla le variazioni nel trattamento, nell'amplificazione e nel rilevamento del campione biologico. La concentrazione di un campione viene determinata dal software del Panther System che utilizza i segnali dell'HCV e del CI per ogni reazione e che li mette a confronto con le informazioni di calibrazione.

Sintesi relativa alla sicurezza e alla prestazione

La SSP (Sintesi relativa alla sicurezza e alla prestazione) è disponibile nella banca dati europea dei dispositivi medici (Eudamed), dove è collegato agli identificativi del dispositivo (UDI-DI di base). L'identificazione unica del dispositivo di base (basic Unique Device Identifier, BUDI) è consultabile nella Sintesi relativa alla sicurezza e alla prestazione del test Aptima HCV Quant Dx Assay: 54200455DIAGAPTHCVAJ.

Avvertenze e precauzioni

A. Per uso diagnostico *in vitro*.

B. Per uso professionale.

C. Al fine di ridurre il rischio di risultati non validi, leggere attentamente l'intero foglietto illustrativo e il *Panther*/*Panther Fusion™ System Operator's Manual* (Manuale per l'operatore del Panther/Panther Fusion™) per informazioni sulla procedura prima di eseguire il test con il sistema Panther.

D. Per ulteriori specifiche avvertenze, precauzioni e procedure per controllare la contaminazione, consultare il *Panther/Panther Fusion System Operator's Manual (Manuale per l'operatore del Panther System).*

Informazioni pertinenti al laboratorio

E. ATTENZIONE: i controlli di questo test contengono plasma umano. Il plasma è non reattivo all'antigene di superficie dell'epatite B (HBsAg), agli anticorpi anti-HCV, agli anticorpi anti-HIV-1 e anti-HIV-2 e all'antigene dell'HIV quando analizzato con le procedure autorizzate dalla Food and Drug Administration degli Stati Uniti. Inoltre, il plasma non è reattivo all'RNA dell'HCV e all'RNA dell'HIV-1 quando analizzato con test degli acidi nucleici autorizzati che utilizzano campioni combinati in pool. Tutti i materiali provenienti da sangue umano devono essere considerati potenzialmente infettivi ed essere maneggiati nel rispetto delle Precauzioni universali[14,15,16].

F. Solo il personale adeguatamente formato nell'utilizzo del test Aptima HCV Quant Dx Assay e nella manipolazione di materiali potenzialmente infettivi deve eseguire questa procedura. Se si verifica un versamento, disinfettare immediatamente seguendo le procedure del centro appropriate.

G. Utilizzare solo contenitori da laboratorio monouso forniti o indicati in modo specifico come monouso.

H. Adottare le consuete precauzioni di laboratorio. Non pipettare con la bocca. Non mangiare, bere né fumare nelle aree di lavoro designate. Quando si maneggiano campioni biologici e reagenti del kit, indossare guanti monouso senza talco, occhiali protettivi e camici da laboratorio. Lavarsi accuratamente le mani dopo aver maneggiato campioni e reagenti del kit.

I. Le superfici di lavoro, le pipette e le altre apparecchiature devono essere decontaminate regolarmente con una soluzione di ipoclorito di sodio al 2,5-3,5% (da 0,35 M a 0,5 M).

J. Smaltire tutti i materiali che sono venuti a contatto con campioni biologici e reagenti in conformità alle normative locali, statali e federali[14,15,16,17]. Pulire e disinfettare accuratamente tutte le superfici di lavoro.

K. I controlli contengono azoturo di sodio come conservante. Non utilizzare tubi metallici per il trasferimento dei reagenti. Se soluzioni contenenti composti dell'azoturo di sodio vengono smaltite in un sistema idraulico, devono essere diluite e risciacquate con abbondanti quantità di acqua corrente. Queste precauzioni sono consigliate per evitare l'accumulo di depositi nelle tubazioni metalliche in cui potrebbero svilupparsi condizioni esplosive.

L. Le buone pratiche standard per i laboratori molecolari includono il monitoraggio ambientale. Per monitorare l'ambiente di un laboratorio, si consiglia la seguente procedura.

1. Munirsi di un bastoncino di ovatta e abbinarlo a una provetta per aliquota di campione Aptima (SAT) Aptima.
2. Etichettare in maniera appropriata ogni SAT.
3. Riempire ogni SAT con 1 mL di diluente dei campioni Aptima.
4. Per raccogliere i campioni dalle superfici, inumidire leggermente un bastoncino di ovatta con acqua deionizzata priva di nucleasi.
5. Passare il bastoncino di ovatta sulla superficie di interesse con un movimento verticale dall'alto verso il basso. Ruotare il bastoncino di ovatta di circa mezzo giro mentre lo si passa sulla superficie.
6. Collocare immediatamente nella provetta il bastoncino con il campione e roteare delicatamente il bastoncino nel diluente per estrarre gli eventuali materiali prelevati. Premere il bastoncino sul lato della provetta di trasporto per fare fuoriuscire quanto più liquido possibile. Gettare il bastoncino e tappare la provetta.
7. Ripetere queste fasi per i rimanenti bastoncini con i campioni.
8. Analizzare il bastoncino con il test molecolare.

Pertinenti ai campioni

M. I campioni biologici potrebbero essere infettivi. Nell'eseguire questo test, adottare le Precauzioni universali[14,15,16]. Definire metodi adeguati di manipolazione e smaltimento nel rispetto delle normative locali.[17] Solo il personale debitamente formato nell'utilizzo del test Aptima HCV Quant Dx e nella manipolazione di materiali infettivi deve eseguire questa procedura.

N. Mantenere le corrette condizioni di conservazione durante la spedizione del campione biologico per assicurarne l'integrità. La stabilità del campione biologico in condizioni di spedizione diverse da quelle raccomandate non è stata determinata.

O. Evitare la contaminazione crociata durante i procedimenti di manipolazione dei campioni biologici. Prestare particolare attenzione a evitare la contaminazione provocata dalla diffusione degli aerosol quando si allentano o si tolgono i tappi dei contenitori dei campioni biologici. I campioni possono contenere livelli di organismi estremamente alti. Assicurarsi che i contenitori dei campioni biologici non vengano in contatto tra di loro ed eliminare i materiali usati senza farli passare sopra i contenitori aperti. Cambiare i guanti se vengono a contatto con i campioni biologici.

Pertinenti al test

P. Non utilizzare il kit di reagenti, il calibratore o i controlli dopo la data di scadenza.

Q. Non scambiare, mescolare o combinare reagenti del test provenienti da kit con numeri di lotto master diversi. I liquidi dell'esame possono avere numeri di lotto diversi. I controlli e il calibratore possono avere numeri di lotto diversi.

R. Evitare la contaminazione microbica e da nucleasi dei reagenti.

S. Tappare e conservare tutti i reagenti dell'esame alle temperature specificate. Le prestazioni dell'esame possono essere compromesse dall'uso di reagenti di test conservati in modo inappropriato. Consultare *Requisiti di conservazione e manipolazione dei reagenti* e *Procedura di analisi del Panther System* per maggiori informazioni.

T. Non combinare reagenti o liquidi dell'esame senza istruzioni specifiche. Non rabboccare i flaconi di reagenti o liquidi. Il Panther System verifica i livelli dei reagenti.

U. Alcuni reagenti di questo kit riportano, sulle rispettive etichette, delle indicazioni di pericolo e dei simboli di sicurezza.

Nota: *le informazioni relative alle comunicazioni in merito alle indicazioni di pericolo utilizzano le classificazioni delle schede di sicurezza UE (SDS). Per informazioni relative alle indicazioni di pericolo specifiche della propria nazione, fare riferimento alla scheda SDS specifica nella*

Raccolta delle schede di sicurezza all'indirizzo www.hologicsds.com. Per ulteriori informazioni sui simboli, fare riferimento alla legenda dei simboli alla pagina www.hologic.com/package-inserts.

Informazioni sui rischi UE

—	**Reagente di amplificazione** *CLORURO DI MAGNESIO 60-65%* — H412 – Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata. P273 – Non disperdere nell'ambiente. P501 – Smaltire il prodotto/recipiente in un impianto di smaltimento approvato.
—	**Reagente promotore** *CLORURO DI MAGNESIO 60-65%* — H412 – Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata. P273 – Non disperdere nell'ambiente. P501 – Smaltire il prodotto/recipiente in un impianto di smaltimento approvato.
—	**Reagente enzimatico** *Triton X-100 1-5%* *HEPES 1-5%* — H412 – Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata. P273 – Non disperdere nell'ambiente. P501 – Smaltire il prodotto/recipiente in un impianto di smaltimento approvato.
	**Controlli del kit HCV VL** *AZOTURO DI SODIO < 1%* — **PERICOLO** H300 – Letale se ingerito. H410 – Molto tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata. P264 – Lavare accuratamente viso, mani ed eventuale superficie cutanea esposta dopo l'uso. P273 – Non disperdere nell'ambiente. P301 + P310 – IN CASO DI INGESTIONE: Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico. P321 – Trattamento specifico (vedere le istruzioni supplementari per il primo soccorso su questa etichetta). P330 – Sciacquare la bocca. P391 – Raccogliere il materiale fuoriuscito.
—	**Calibratori del kit HCV VL** *HEPES 15-20%* *Lauril solfato, sale di litio 5-10%* *Idrossido di Litio, Monoidrato 1-5%* *Acido succinico 1-5%* — H412 – Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata. P273 – Non disperdere nell'ambiente. P501 – Smaltire il prodotto/recipiente in un impianto di smaltimento approvato.
—	**Soluzione di ricostituzione enzimatica** *Glicerina 20-25%* *Triton X-100 5-10%* *HEPES 1-5%* — H412 – Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata. P273 – Non disperdere nell'ambiente. P501 – Smaltire il prodotto/recipiente in un impianto di smaltimento approvato.

—	**Reagente di cattura del target** *HEPES 15-20%* *Lauril solfato, sale di litio 5-10%* *Idrossido di Litio, Monoidrato 1-5%* *Acido succinico 1-5%* — H412 – Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata. P273 – Non disperdere nell'ambiente. P501 – Smaltire il prodotto/recipiente in un impianto di smaltimento approvato.

Requisiti di conservazione e manipolazione dei reagenti

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

Reagente	Conservazione a confezione chiusa	Kit aperto (ricostituito)	
		Conservazione	Stabilità
Reagente di amplificazione qHCV	Da 2 °C a 8 °C		
Soluzione di ricostituzione e amplificazione qHCV	Da 2 °C a 8 °C	Da 2 °C a 8 °C	30 giorni[a]
Reagente enzimatico qHCV	Da 2 °C a 8 °C		
Soluzione di ricostituzione enzimatica qHCV	Da 2 °C a 8 °C	Da 2 °C a 8 °C	30 giorni[a]
Reagente promotore qHCV	Da 2 °C a 8 °C		
Soluzione di ricostituzione promotore qHCV	Da 2 °C a 8 °C	Da 2 °C a 8 °C	30 giorni[a]
Reagente di cattura del target qHCV	Da 2 °C a 8 °C	Da 2 °C a 8 °C	30 giorni[a]
qHCV NC CONTROL – (Controllo negativo)	Da -15 °C a -35 °C	Da 15 °C a 30 °C	Fiala monouso Utilizzare entro 24 ore
qHCV LPC CONTROL + (Controllo positivo basso)	Da -15° C a -35° C	Da 15 °C a 30 °C	Fiala monouso Utilizzare entro 24 ore
qHCV HPC CONTROL + controllo fortemente positivo	Da -15 °C a -35 °C	Da 15 °C a 30 °C	Fiala monouso Utilizzare entro 24 ore
qHCV PCAL (Calibratore positivo)	Da -15 °C a -35 °C	Da 15 °C a 30 °C	Fiala monouso Utilizzare entro 24 ore

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

B. Smaltire qualsiasi reagente ricostituito inutilizzato e il reagente di cattura del target (TCR) dopo 30 giorni o dopo la data di scadenza del lotto master, a seconda di quale data cada per prima.

C. I reagenti conservati sul Panther System sono stabili per 72 ore quando sono conservati sullo strumento. I reagenti possono essere caricati nel Panther System fino a 8 volte. Il Panther System registra ogni volta che i reagenti vengono caricati.

D. Dopo lo scongelamento del calibratore, la soluzione deve essere trasparente, ossia non torbida o con precipitati.

E. Il reagente promotore e il reagente promotore ricostituito sono fotosensibili. Proteggere questi reagenti dalla luce durante la conservazione e la preparazione per l'uso.

Raccolta e conservazione dei campioni biologici

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

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

Nota: *Per la conservazione si raccomandano solo provette secondarie in plastica.*

È possibile utilizzare i campioni di sangue intero raccolti nelle seguenti provette di vetro o di plastica:

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

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

A. Raccolta dei campioni biologici

Il sangue intero può essere conservato a una temperatura compresa fra 2 °C e 30 °C e deve essere centrifugato entro 6 ore dalla raccolta del campione biologico. Separare il plasma o il siero dal pellet di globuli rossi seguendo le istruzioni del fabbricante della provetta utilizzata. Il plasma o il siero possono essere analizzati sul Panther System direttamente da provetta primaria o essere trasferiti in una provetta secondaria come la provetta per aliquota di campione Aptima. Per ottenere il volume di reazione di 500 µL, il volume minimo suggerito di siero o di plasma per le provette di raccolta primarie è 1.200 µL, mentre per le provette secondarie il volume minimo è 700 µL. La seguente tabella identifica i requisiti di volume morto per ciascun tipo di provetta primaria e secondaria.

Provetta (dimensioni e tipo)	Volume morto su Panther
Provetta per aliquota di campione (SAT) Aptima	0,2 mL
12x75 mm	0,5 mL
13 x 100 mm	0,5 mL
13x100 mm con Gel	0,3 mL
16 x 100 mm con gel	0,7 mL

Se non analizzati immediatamente, il plasma e il siero possono essere conservati in conformità alle specifiche riportate in basso. Se trasferito in una provetta secondaria, il plasma o il siero può essere congelato a una temperatura di -20 °C. Non superare 3 cicli di congelamento/scongelamento. Non congelare i campioni in provette di raccolta primarie contenenti EDTA, ACD o siero.

B. Condizioni di conservazione dei campioni biologici

1. Campioni di plasma con EDTA e ACD

   Il sangue intero può essere conservato a una temperatura compresa fra 2 °C e 30 °C e deve essere centrifugato entro 6 ore dalla raccolta del campione biologico. Il plasma può quindi essere conservato in una delle seguenti condizioni:

   - Nella provetta di raccolta primaria o nella provetta secondaria a 2-25 °C per un periodo massimo di 24 ore,
   - Nella provetta di raccolta primaria o nella provetta secondaria a 2-8 °C per un periodo massimo di 5 giorni oppure
   - Nella provetta secondaria a -20 °C per un periodo massimo di 60 giorni.

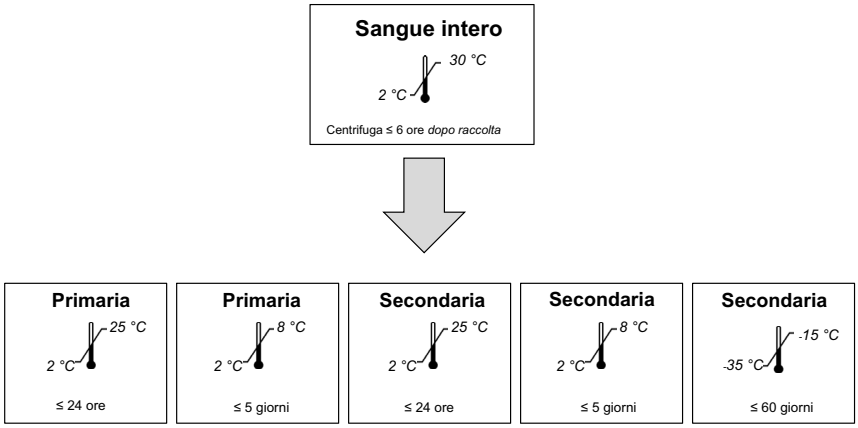


Figura 1. Condizioni di conservazione per le provette contenenti EDTA/ACD

2. Campioni nelle PPT

   Il sangue intero può essere conservato a una temperatura compresa fra 2 °C e 30 °C e deve essere centrifugato entro 6 ore dalla raccolta del campione biologico. Il plasma può quindi essere conservato in una delle seguenti condizioni:

   - Nella provetta di raccolta primaria o nella provetta secondaria a 2-25 °C per un periodo massimo di 24 ore,
   - Nella provetta di raccolta primaria o nella provetta secondaria a 2-8 °C per un periodo massimo di 5 giorni oppure
   - Nella provetta di raccolta primaria o nella provetta secondaria a -20 °C per un periodo massimo di 60 giorni.

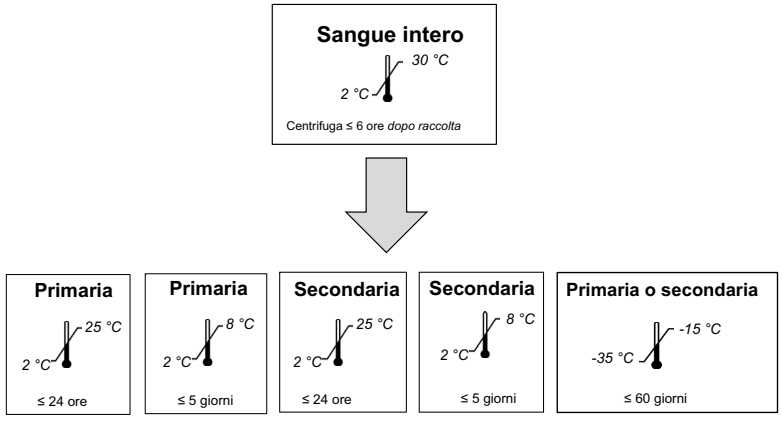


Figura 2. Condizioni di conservazione per le PPT

3. Campioni biologici in provette con siero

   Il sangue intero può essere conservato a una temperatura compresa fra 2 °C e 30 °C e deve essere centrifugato entro 6 ore dalla raccolta del campione biologico. Il siero può quindi essere conservato in una delle seguenti condizioni:

   - Nella provetta di raccolta primaria o nella provetta secondaria a 2-30 °C per un periodo massimo di 24 ore,
   - Nella provetta di raccolta primaria o nella provetta secondaria a 2-8 °C per un periodo massimo di 5 giorni oppure
   - Nella provetta secondaria a -20 °C per un periodo massimo di 60 giorni.

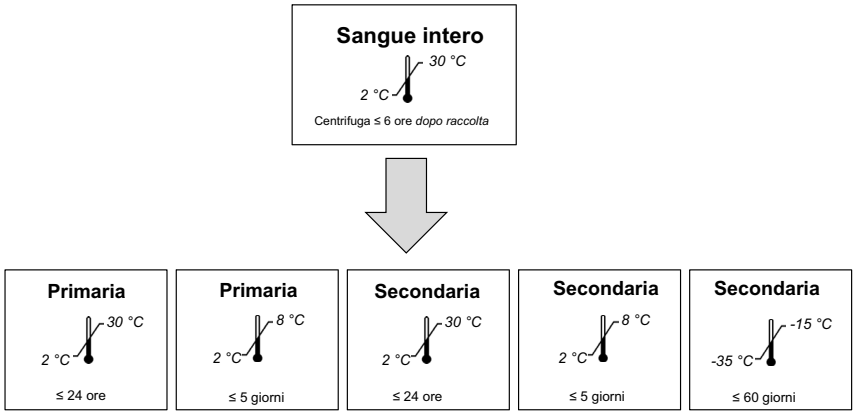


Figura 3. Condizioni di conservazione delle provette contenenti siero

4. Campioni biologici nelle SST

   Il sangue intero può essere conservato a una temperatura compresa fra 2 °C e 30 °C e deve essere centrifugato entro 6 ore dalla raccolta del campione biologico. Il siero può quindi essere conservato in una delle seguenti condizioni:

   - Nella provetta di raccolta primaria o nella provetta secondaria a 2-30 °C per un periodo massimo di 24 ore,
   - Nella provetta di raccolta primaria o nella provetta secondaria a 2-8 °C per un periodo massimo di 5 giorni oppure
   - Nella provetta di raccolta primaria o nella provetta secondaria a -20 °C per un periodo massimo di 60 giorni.

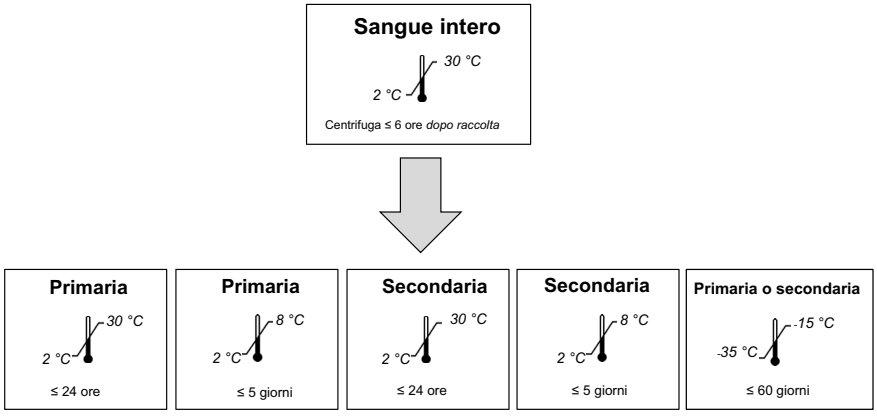


Figura 4. Condizioni di conservazione per le SST

C. Conservazione in congelatore a lungo termine

I campioni di plasma o siero possono essere conservati a una temperatura compresa tra -65 °C e -70 °C per un periodo massimo di 60 giorni nelle SAT.

D. Diluizione di campioni di plasma e siero

I campioni di plasma e di siero possono essere diluiti nella SAT o nella provetta secondaria per l'analisi con il Panther System. Consultare *Procedura di analisi del Panther System*, Passaggio E.5 in basso per maggiori informazioni.

⚠ *L'interpretazione diagnostica non deve essere effettuata sulla base di un risultato di mancato rilevamento in relazione a campioni di siero o plasma diluiti. In tal caso, procurarsi un nuovo campione non diluito e ripetere il test.*

Nota: *se un campione biologico viene diluito, deve essere analizzato subito dopo la diluizione. Non congelare un campione biologico diluito.*

Campioni caricati sul Panther System

I campioni possono essere lasciati sul Panther System senza tappo per un periodo massimo di 8 ore. I campioni possono essere rimossi dal Panther System ed essere analizzati a condizione che il tempo totale di permanenza sullo strumento non superi le 8 ore prima del pipettaggio del campione da parte del Panther System.

Trasporto dei campioni biologici

Mantenere le condizioni di conservazione dei campioni come descritto in *Raccolta e conservazione dei campioni biologici*.

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

Panther System

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

Reagenti e materiali forniti

Kit del test Aptima HCV Quant Dx Assay, 100 test, cod. prodotto PRD-03506
(1 confezione di test, 1 kit calibratore e 1 kit dei controlli)
Calibratori e controlli aggiuntivi possono essere ordinati separatamente. Consultare i relativi numeri di catalogo di seguito.

Scatola del test Aptima HCV Quant Dx Assay
(alla consegna, conservare a 2 °C – 8 °C)

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

Kit calibratore Aptima HCV Quant Dx (cod. prodotto PRD-03507)
(alla consegna, conservare a -15°C – -35°C)

Simbolo	Componente	Quantità
PCAL	**Calibratore positivo qHCV** *Trascritto in soluzione tamponata.*	5 x 2,5 mL
	Etichetta del codice a barre del calibratore	—

Kit dei controlli Aptima HCV Quant Dx (cod. prodotto PRD-03508)
(alla consegna, conservare a -15°C – -35°C)

Simbolo	Componente	Quantità
NC	**Controllo negativo qHCV** *Plasma umano defibrinato negativo all'HCV contenente gentamicina e azoturo di sodio allo 0,2% come conservanti.*	5 x 0,8 mL
LPC	**Controllo positivo basso qHCV** *Armored RNA dell'HCV non infettivo contenente gentamicina e azoturo di sodio allo 0,2% come conservanti.*	5 x 0,8 mL
HPC	**Controllo positivo alto qHCV** *Armored RNA dell'HCV non infettivo contenente gentamicina e azoturo di sodio allo 0,2% come conservanti.*	5 x 0,8 mL
	Etichetta dei codici a barre dei controlli	—

Materiali richiesti ma disponibili separatamente

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

Materiale	N. cat.
Panther™ System	303095
Panther Fusion™ System	PRD-04172
Panther™ System, Smaltimento continuo di liquidi e rifiuti (Panther Plus)	PRD-06067
Kit dei controlli Aptima® HCV Quant Dx	PRD-03508
Kit calibratore Aptima® HCV Quant Dx	PRD-03507
Kit sessione analitica Panther per test in tempo reale (esclusivamente per test in tempo reale)	PRD-03455 (5.000 test)
Kit di liquidi per test Aptima® Assay (noto anche come kit di liquidi universali) *contiene soluzione di lavaggio Aptima®, tampone per liquido di disattivazione Aptima® e reagente oleoso Aptima®*	303014 (1000 test)
Unità multiprovetta (MTU)	104772-02
Kit dei sacchetti di rifiuti Panther™	902731
Coperchio del contenitore di rifiuti Panther™	504405
Oppure Kit procedurale Panther™ System *(durante l'esecuzione di test TMA non in tempo reale in parallelo con test TMA in tempo reale) contiene MTU, sacchetti di rifiuti, coperchi del contenitore di rifiuti, rilevamento automatico e liquidi per test*	303096 (5.000 test)
Puntali, 1000 µL, con filtro, rilevatori di liquido, conduttivi e monouso *Non tutti i prodotti sono disponibili in tutte le regioni geografiche. Contattare il rappresentante per informazioni specifiche sulla regione.*	901121 (10612513 Tecan) 903031 (10612513 Tecan) MME-04134 (30180117 Tecan) MME-04128
Candeggina, soluzione di ipoclorito di sodio al 5% – 8,25% (0,7 M – 1,16 M)	—
Guanti monouso senza talco	—
Tappi non penetrabili di ricambio	103036A
Tappi di ricambio per reagenti *Flaconi di soluzione di ricostituzione e di reagenti di amplificazione, enzimatici e promotori* *Flacone TCR*	CL0041 (100 cappucci) CL0040 (100 tappi)
Teli da banco di laboratorio plastificati	—
Panni che non lasciano pelucchi	—
Pipettatore	—
Puntali	—
Opzioni provetta di raccolta primaria: *13 mm x 100 mm* *13 mm x 75 mm* *16 mm x 100 mm*	 — — —
Centrifuga	—
Miscelatore Vortex	—

Materiali opzionali

Materiale	N. cat.
Opzioni provetta secondaria:	
12 mm x 75 mm	—
13 mm x 100 mm	—
16 mm x 100 mm	—
Provette per aliquota di campione Aptima (SAT) (confezione da 100)	FAB-18184
Tappo per provette di trasporto (confezione da 100) *tappo per SAT*	504415
Diluente dei campioni Aptima®	PRD-03003
Kit diluente dei campioni Aptima® *contiene il diluente dei campioni, 100 SAT e 100 tappi*	PRD-03478
Pipette di trasferimento	—
Pannelli disponibili in commercio	—
Bastoncini con punta cotonata	—
Agitatore oscillante per provette	PRD-03488

Procedura di analisi del Panther System

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

A. Preparazione dell'area di lavoro

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

B. Preparazione del calibratore e dei controlli

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

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

   Opzione. Per una miscelazione accurata, il calibratore e le provette di controllo possono essere collocati su un agitatore oscillante per provette. Assicurarsi che il contenuto delle provette sia completamente scongelato prima di utilizzarlo.

   Nota: *non generare schiuma eccessiva quando si capovolgono calibratore e controlli. La schiuma pregiudica il rilevamento del livello di liquido nel Panther System.*

2. Quando il contenuto della provetta si è scongelato, asciugare l'esterno della provetta con un panno monouso pulito e asciutto.

3. Per prevenire la contaminazione, non aprire le provette.

C. Ricostituzione del reagente/Preparazione di un nuovo kit

Nota: *eseguire la ricostituzione dei reagenti prima di iniziare qualsiasi lavoro sul Panther System.*

1. Per preparare il reagente di cattura del target (TCR), procedere nel modo seguente:
   a. Rimuovere il TCR dal luogo in cui è conservato (a una temperatura compresa fra 2 °C e 8 °C). Controllare il numero di lotto sul flacone del TCR per assicurarsi che corrisponda al numero di lotto riportato sulla scheda del codice a barre del lotto master.
   b. Agitare immediatamente il flacone di TCR in modo vigoroso per 10 volte. Lasciare riscaldare il flacone di TCR a una temperatura compresa fra 15 °C e 30 °C per almeno 45 minuti. Durante questo periodo, roteare e capovolgere il flacone di TCR almeno ogni 10 minuti.

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

viii. Dopo che il reagente liofilizzato è andato in soluzione, roteare i flaconi assemblati per almeno 10 secondi, quindi fare oscillare leggermente avanti e indietro la soluzione all'interno della fiala di vetro per miscelare bene.

c. Inclinare di nuovo lentamente i flaconi assemblati per consentire a tutta la soluzione di drenare nuovamente nel flacone con la soluzione di ricostituzione (Figura 5, passaggio 5).

d. Rimuovere con cautela il collare di ricostituzione e la fiala di vetro (Figura 5, passaggio 6).

e. Rimettere il cappuccio sul flacone. Registrare sull'etichetta le iniziali dell'operatore e la data di ricostituzione (Figura 5, Procedimento 7).

f. Rimuovere il collare di ricostituzione e la fiala di vetro (Figura 5, Procedimento 8).

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

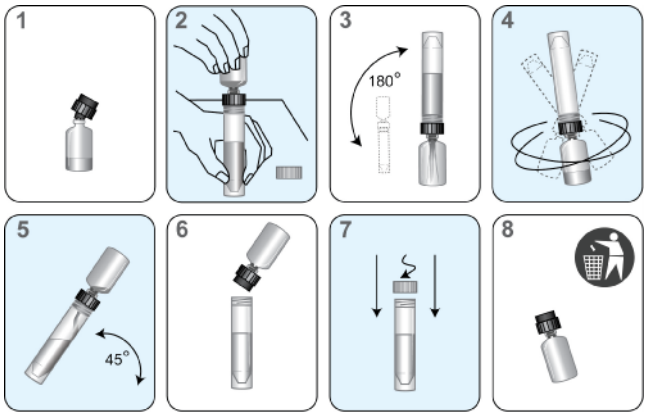


Figura 5. Processo di ricostituzione dei reagenti

D. Preparazione di reagenti per i reagenti precedentemente preparati

1. Rimuovere i reagenti precedentemente preparati. dal luogo in cui sono conservati (a una temperatura compresa fra 2 °C e 8 °C).
2. I reagenti TCR, di amplificazione, enzimatico e promotore precedentemente preparati devono raggiungere una temperatura compresa fra 15 °C e 30 °C prima dell'avvio del test.
3. Per il TCR precedentemente preparato, eseguire il passaggio C.1 descritto in precedenza, prima di caricarlo sul sistema.
4. Roteare e capovolgere i reagenti di amplificazione, enzimatico e promotore per miscelarli bene prima di caricarli sul sistema. Evitare la formazione di schiuma eccessiva quando si capovolgono i reagenti.

   Opzione: i reagenti preparati in precedenza possono essere preparati su un agitatore oscillante per provette attenendosi a queste istruzioni: Rimuovere i reagenti dal luogo di conservazione (a una temperatura compresa fra 2 °C e 8 °C). Collocare i reagenti su un agitatore oscillante per provette e lasciarli riscaldare a una temperatura compresa fra 15 °C e 30 °C per almeno 30 minuti.

5. Evitare di riempire i flaconi dei reagenti fino all'orlo. Il Panther System riconosce e rifiuta i flaconi rabboccati.

E. Manipolazione dei campioni biologici

1. Assicurarsi che i campioni lavorati nelle provette primarie o i campioni non diluiti nelle provette secondarie siano stati conservati correttamente secondo quando indicato in *Raccolta e conservazione dei campioni biologici*.
2. Assicurarsi che i campioni biologici congelati siano scongelati del tutto. Miscelare con vortex i campioni biologici scongelati da 3 a 5 secondi per ottenere un risultato adeguato.
3. Lasciare che i campioni biologici raggiungano una temperatura compresa fra 15 e 30 °C prima del trattamento. Per ulteriori informazioni sul caricamento dei campioni sullo strumento, vedere *Campioni caricati sul Panther System*.
4. Assicurarsi che ciascuna provetta di raccolta primaria contenga fino a un massimo di 1.200 µL di campione o che ciascuna SAT contenga almeno 700 µL di campione. Consultare la tabella fornita in *Raccolta dei campioni biologici* per identificare i requisiti di volume morto per ciascun tipo di provetta primaria e secondaria. Se si rende necessario diluire il campione biologico, per ulteriori informazioni vedere il passaggio E.5 di seguito.
5. Diluire un campione di plasma o siero 1:3 in una SAT o 1:100 in una provetta secondaria.

   Un campione può essere diluito in una provetta secondaria per l'analisi con il Panther System.

⚠ *L'interpretazione diagnostica non deve essere effettuata sulla base di un risultato di mancato rilevamento in relazione a campioni di siero o plasma diluiti. In tal caso, procurarsi un nuovo campione non diluito e ripetere il test.*

Nota: *se un campione biologico viene diluito, deve essere analizzato subito dopo la diluizione.*

a. Diluizione di campioni biologici con volume ridotto

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

   i. Trasferire 240 µL di campione biologico nella SAT.

   ii. Aggiungere 480 µL di diluente dei campioni Aptima.

   iii. Tappare la provetta.

   iv. Capovolgerla delicatamente 5 volte per miscelarla.

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

b. Diluizione di campioni biologici con alto titolo

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

   i. Trasferire 30 µL di campione nella SAT o in una provetta secondaria.

   ii. Aggiungere 2.970 µL di diluente dei campioni Aptima.

   iii. Tappare la provetta.

   iv. Capovolgerla delicatamente 5 volte per miscelarla.

I campioni biologici diluiti con un rapporto di 1:100 possono essere analizzati utilizzando l'opzione 1:100 sul Panther System (per ulteriori informazioni consultare il documento *Panther/Panther Fusion System Operator's Manual* (Manuale per l'operatore del Panther/Panther Fusion System)). Il software riporterà automaticamente il risultato per il campione non diluito applicando il fattore di diluizione. Questi campioni biologici saranno segnalati come campioni diluiti.

Nota: *per i campioni diluiti con concentrazioni pure superiori al limite superiore di quantificazione, i risultati saranno refertati utilizzando la notazione scientifica.*

6. Immediatamente prima di caricare i campioni biologici in una rastrelliera dei campioni, centrifugare ciascun campione a 1000 – 3.000 *g* per 10 minuti. Non togliere i tappi. La presenza di bolle nella provetta pregiudica il rilevamento del livello di liquido nel Panther System.

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

F. Preparazione del sistema

1. Impostare il sistema in base alle istruzioni fornite nel *Panther/Panther Fusion System Operator's Manual* (Manuale per l'operatore del Panther/Panther Fusion System) e nella sezione *Note procedurali.* Accertarsi che vengano utilizzate rastrelliere per reagenti e adattatori per TCR di dimensioni appropriate.
2. Caricare i campioni nella rastrelliera dei campioni. Eseguire i seguenti passaggi per ciascuna provetta di campione (campione biologico e, quando necessario, calibratore e controlli):
   a. Allentare il tappo di una delle provette del campione, senza però rimuoverlo.

      Nota: *prestare particolare attenzione a evitare la contaminazione provocata dalla diffusione degli aerosol. Allentare delicatamente i tappi dei campioni.*

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

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

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

Note procedurali

A. Calibratore e controlli

1. Le provette di calibratore positivo qHCV, di controllo debolmente positivo qHCV, di controllo fortemente positivo qHCV e di controllo negativo qHCV possono essere caricate sul Panther System in qualsiasi posizione nella rastrelliera dei campioni e in qualsiasi corsia dello scomparto campioni. Il pipettaggio dei campioni biologici inizierà una volta soddisfatte le due seguenti condizioni:
   a. Il calibratore e i controlli sono in fase di trattamento sul sistema.
   b. I risultati validi del calibratore e dei controlli sono stati registrati nel sistema.
2. Quando le provette del calibratore e dei controlli sono state pipettate e sono sottoposte a trattamento per il kit di reagenti del test Aptima HCV Quant Dx Assay, i campioni biologici possono essere analizzati con il kit ricostituito associato per un massimo di 24 ore, **a meno che:**
   a. Il risultato del calibratore o i risultati dei controlli risultino non validi.
   b. Il kit di reagenti del test associato viene rimosso dal sistema.
   c. Il kit di reagenti del test associato abbia superato i limiti di stabilità.
3. Ciascuna provetta di calibratore e controllo può essere analizzata solo una volta. Se si tenta di analizzare la provetta più di una volta, è possibile che si verifichino errori di trattamento.

B. Talco dei guanti

Come in qualsiasi sistema di reazione, il talco eccessivo in alcuni guanti può causare la contaminazione di provette aperte. Si consigliano guanti privi di talco.

Controllo della qualità

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

Calibrazione del test

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

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

Controlli positivi e negativi

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

Durante il trattamento, i criteri per l'accettazione dei controlli vengono verificati automaticamente dal software del Panther System. Per generare risultati validi, il controllo negativo deve dare un risultato di "Non rilevato" e i controlli positivi devono dare risultati entro i parametri predefiniti (target nominale LPC: 2,36 $\log_{10}$ UI/mL, target nominale HPC: 5,36 $\log_{10}$ UI/mL Se uno qualsiasi dei controlli genera risultati non validi, il software annulla automaticamente la sessione analitica. I campioni di una sessione analitica annullata devono essere rianalizzati utilizzando calibratore e controlli preparati al momento.

Calibratore interno/Controllo interno

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

Il software del Panther system è progettato per verificare in maniera accurata i processi quando le procedure vengono eseguite rispettando le istruzioni fornite nel presente foglietto illustrativo e nel documento *Panther/Panther Fusion System Operator's Manual* (Manuale per l'operatore del Panther/Panther Fusion System).

Interpretazione dei risultati

Il Panther System determina automaticamente la concentrazione di RNA dell'HCV nei campioni biologici e nei controlli mettendo a confronto i risultati con una curva di calibrazione. Le concentrazioni di RNA dell'HCV vengono riportate in UI/mL e log_{10} UI/mL. L'interpretazione dei risultati è inclusa nella Tabella 1. Se si usa la diluizione con rapporto 1:3 o 1:100 per i campioni biologici diluiti, il Panther System calcola automaticamente la concentrazione dell'RNA dell'HCV per il campione biologico puro moltiplicando la concentrazione diluita per il fattore di diluizione e i campioni biologici diluiti vengono contrassegnati come tali.

Nota: *per i campioni biologici diluiti, i risultati riportati come "Non rilevati" o "< 10 rilevati" possono essere generati diluendo un campione biologico con una concentrazione superiore, ma prossima al limite di rilevamento (limit of detection, LoD) o al limite inferiore di quantificazione (lower limit of quantitation, LLoQ). Se non si ottiene un risultato quantitativo, si consiglia di raccogliere e analizzare un altro campione biologico non diluito.*

Il Panther System non fornisce un risultato qualitativo (cioè, "Reattivo" oppure "Non reattivo") per uso diagnostico. L'operatore deve interpretare la concentrazione di RNA dell'HCV refertata in un risultato qualitativo (Tabella 1). I campioni biologici con risultati elencati come "Non rilevato" sono non reattivi per l'RNA dell'HCV. I campioni biologici con risultati riportati come "< 10 rilevati", rientranti nell'intervallo lineare e > 100.000.000 (limite superiore di quantificazione) indicano il rilevamento dell'RNA dell'HCV; di conseguenza, tali campioni sono reattivi per l'RNA dell'HCV.

Tabella 1: Interpretazione dei risultati

Risultato Aptima HCV Quant Dx Assay riportato		Interpretazione della concentrazione dell'RNA dell'HCV	Interpretazione diagnostica qualitativa dell'utilizzatore[a]
UI/mL	Valore Log_{10}[b]		
Non rilevato	Non rilevato	RNA dell'HCV non rilevato.	Non reattivo per l'RNA dell'HCV.
< 10 rilevati	< 1,00	L'RNA dell'HCV è stato rilevato, ma a un livello inferiore al LLoQ.	Reattivo per l'RNA dell'HCV.
10 - 100.000.000	1,00 - 8,00	La concentrazione di RNA dell'HCV rientra nell'intervallo lineare compreso fra 10 e 100.000.000 UI/mL.	Reattivo per l'RNA dell'HCV.
> 100.000.000	> 8,00	La concentrazione di RNA dell'HCV è superiore all'ULoQ.	Reattivo per l'RNA dell'HCV.
Non valido.[c]	Non valido.[c]	Si è verificato un errore nella generazione del risultato. Il campione biologico deve essere rianalizzato.	Non valido

[a] L'interpretazione diagnostica può essere formulata a partire da campioni di siero o plasma non diluiti.
[b] Il valore viene troncato a due posizioni decimali.
[c] I risultati non validi vengono visualizzati in blu.

I criteri di accettabilità per ciascuno dei controlli del test Aptima HCV Quant Dx sono riportati nella Tabella 2.

Nota: *l'intervallo di recupero elencato di seguito varia in base al valore assegnato a ciascun lotto specifico. Fare riferimento alla concentrazione assegnata elencata nell'inserto del foglio dei codici a barre di controllo fornito con ciascuna scatola dei controlli.*

Tabella 2: Criteri di accettabilità per l'intervallo di recupero per i controlli del test Aptima HCV Quant Dx Assay

Componente	Intervallo di recupero per sessioni analitiche valide
Controllo negativo	N/A
Controllo positivo basso	+/- 0,5 log_{10} IU/mL
Controllo positivo alto	+/- 0,5 log_{10} IU/mL

Limiti

A. L'uso di questo esame va limitato al personale addestrato all'esecuzione della procedura. La mancata osservanza delle istruzioni fornite in questo foglietto illustrativo può determinare risultati erronei.

B. L'affidabilità dei risultati è subordinata alla raccolta, al trasporto, alla conservazione e al trattamento adeguati del campione biologico.

C. Sebbene siano rare, le mutazioni all'interno delle regioni altamente conservate del genoma virale coperto dai primer e/o dalle sonde nel test Aptima HCV Quant Dx Assay potrebbero comportare un errore nel rilevamento del virus.

Prestazioni analitiche

Limite di rilevamento (LoD) utilizzando il secondo standard internazionale dell'OMS

Si definisce limite di rilevamento (LoD) del test la concentrazione di RNA dell'HCV rilevata con una probabilità del 95% o superiore in conformità alle linee guida CLSI EP17-A2.[18]

Il LoD è stato determinato analizzando pannelli del secondo standard internazionale dell'OMS per l'RNA del virus dell'epatite C (NIBSC 96/798, genotipo 1) diluito in plasma e siero EDTA di origine umana negativi all'HCV. Un minimo di 36 replicati di ciascuna diluizione è stato analizzato con ciascuno dei tre lotti di reagenti per un minimo di 108 replicati per ciascuna diluizione. È stata eseguita l'analisi Probit per generare i limiti di rilevamento previsti. I valori del LoD corrispondono ai risultati del lotto di reagente con il limite di rilevamento previsto più alto. Il LoD al 95% per il test Aptima HCV Quant Dx Assay utilizzando il secondo standard internazionale dell'OMS è pari a 4,3 UI/mL per il plasma e a 3,9 UI/mL per il siero.

Limite di rilevamento nei genotipi dell'HCV

Il LoD è stato determinato analizzando diluizioni di campioni biologi clinici positivi all'HCV per i genotipi 1, 2, 3, 4, 5 e 6 in plasma e siero umani negativi all'HCV. Le concentrazioni sono state determinate utilizzando un test approvato. Un minimo di 20 replicati di ogni elemento del pannello sono stati analizzati con ciascuno dei tre lotti di reagenti per un minimo di 60 replicati per ogni elemento del pannello. È stata eseguita l'analisi Probit per generare il 95% dei limiti di rilevamento previsti. I valori del LoD illustrati in Tabella 3 corrispondono ai risultati del lotto di reagente con il limite di rilevamento previsto più alto.

Tabella 3: Limite di rilevamento nei genotipi dell'HCV utilizzando campioni biologici clinici

Genotipo	Limite di rilevamento previsto	Concentrazione (UI/mL)	
		Plasma	Siero
1	95%	4,0	5,2
2	95%	2,8	4,0
3	95%	4,3	3,4
4	95%	4,8	2,3
5	95%	2,1	3,3
6	95%	4,1	3,9

Intervallo lineare

L'intervallo lineare è stato stabilito analizzando pannelli di Armored RNA del genotipo 1a dell'HCV diluito in plasma e siero di origine umana negativi all'HCV in conformità alle linee guida EP06-A del CLSI.[19] La concentrazione dei pannelli era compresa tra 1,0 $\log_{10}$ UI/mL e 8,2 $\log_{10}$ UI/mL. Il test Aptima HCV Quant Dx Assay ha dimostrato linearità nell'intervallo analizzato con un limite superiore di quantificazione (ULoQ) di 8,0 $\log_{10}$ UI/mL, come mostrato nella Figura 6.

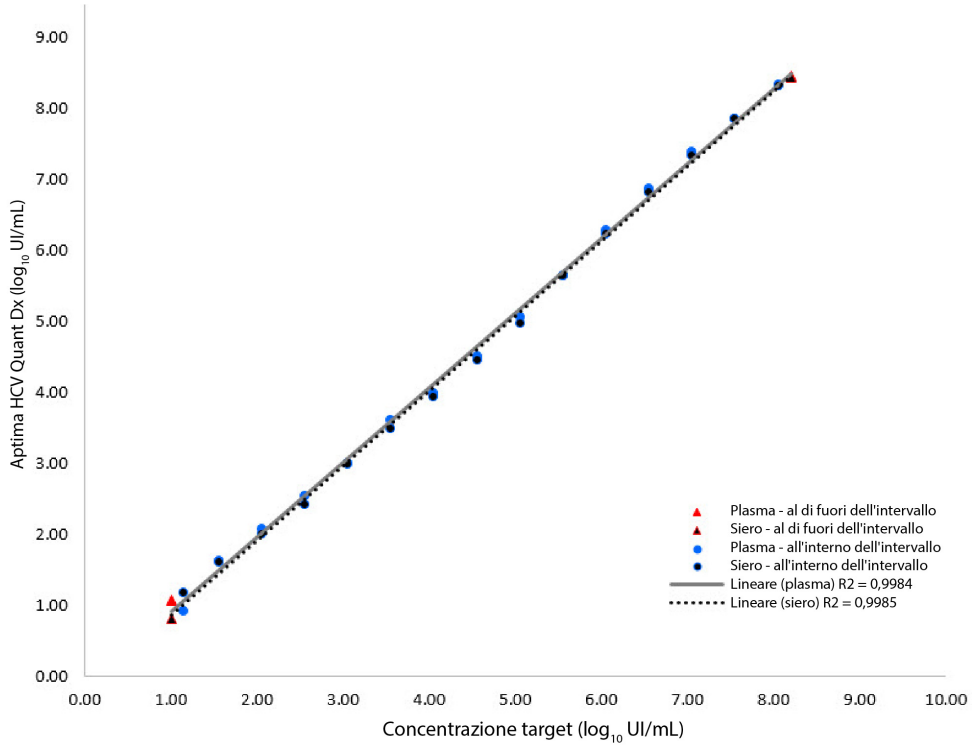


Figura 6. Linearità nel plasma e nel siero

Linearità nei genotipi dell'HCV

La linearità e l'intervallo lineare dei genotipi dell'HCV da 1 (1a per il plasma e 1b per il siero) a 6 sono stati stabiliti analizzando i singoli positivi clinici diluiti, uno per ogni genotipo dell'HCV per l'intervallo inferiore del test combinato con aRNA (genotipo 1a dell'HCV) per l'intervallo più elevato del test (superiore a 100.000 UI/mL). Le diluizioni nel plasma e nel siero di origine umana negativi sono state analizzate per tutti i genotipi. La linearità è stata dimostrata per tutti e sei i genotipi nell'intervallo analizzato come mostrato nella Figura 7 per il plasma e nella Figura 8 per il siero.

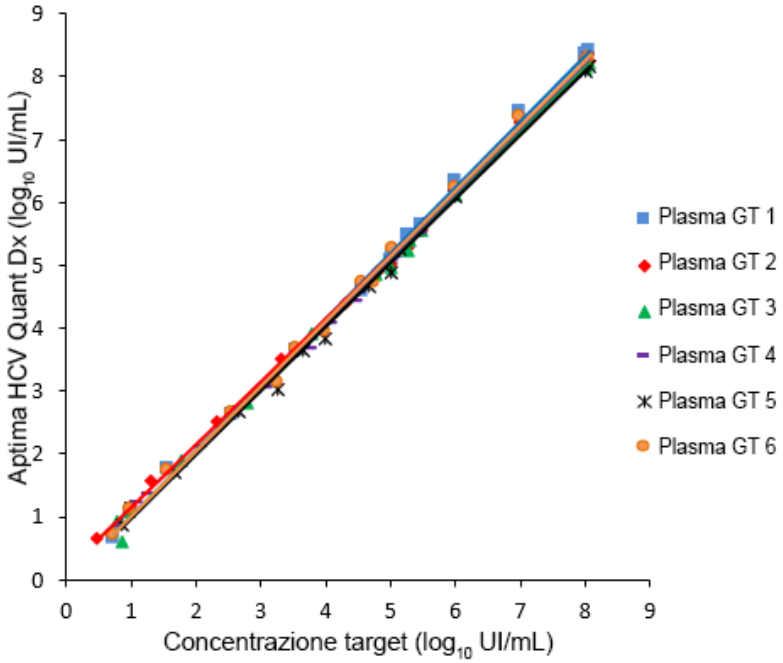


Figura 7. Intervallo lineare e linearità (plasma)

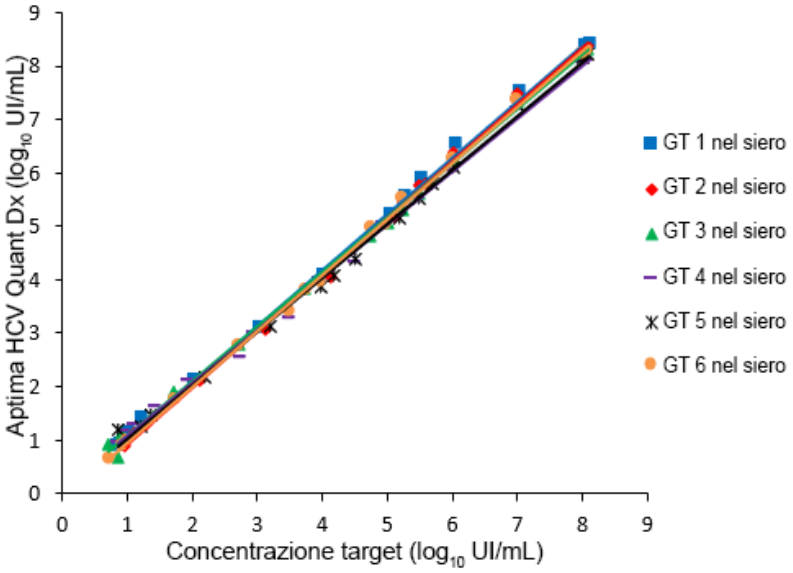


Figura 8. Intervallo lineare e linearità (siero)

Limite inferiore di quantificazione utilizzando il secondo standard internazionale dell'OMS

Si definisce limite inferiore di quantificazione (LLoQ) la concentrazione più bassa alla quale l'RNA dell'HCV viene quantificato in modo affidabile entro i limiti di un errore totale, in conformità alle linee guida EP17-A2 del CLSI.[18] L'errore totale è stato stimato mediante due metodi: Errore totale analitico (TAE) = |bias| + 2DS ed Errore totale (TE) = SQRT(2) x 2DS. Per garantire l'accuratezza e la precisione delle misurazioni, l'errore totale del test Aptima HCV Quant Dx è stato fissato su 1 $\log_{10}$ UI/mL (ovverosia, in corrispondenza del LLoQ, la differenza tra due misurazioni di più di 1 $\log_{10}$ UI/mL ha significatività statistica).

Il LLoQ è stato determinato analizzando pannelli che consistevano di diluizioni del Secondo Standard Internazionale dell'OMS per l'RNA del virus dell'epatite C (NIBSC 96/798, genotipo 1) in plasma e siero umano negativi all'HCV. Sono stati analizzati trentasei (36) replicati di ogni diluizione con ciascuno dei tre lotti di reagente per un minimo di 108 replicati per diluizione. I risultati del lotto di reagenti con la concentrazione massima pari o superiore al LoD e che soddisfano i requisiti di TE e TAE sono riportati nella Tabella 4 per il plasma e nella Tabella 5 per il siero. Il valore del LLoQ per il secondo standard internazionale dell'OMS è di 7 UI/mL (0,82 $\log_{10}$ UI/mL) per il plasma e 9 UI/mL (0,93 $\log_{10}$ UI/mL) per il siero, come riepilogato nella Tabella 6. Il valore LLoQ è stato determinato nei genotipi (fare riferimento a *Determinazione del limite inferiore di quantificazione (LLoQ) nei genotipi dell'HCV*). Questi dati sul genotipo stabiliscono che il LLoQ complessivo per il test è 10 UI/mL.

Tabella 4: Determinazione del LLoQ utilizzando il secondo standard internazionale dell'OMS per l'HCV diluito nel plasma

Lotto di reagenti	Aptima HCV Quant Dx (UI/mL)	Aptima HCV Quant Dx ($\log_{10}$ UI/mL)	DS ($\log_{10}$ UI/mL)	Bias ($\log_{10}$ UI/mL)	TE calcolato ($\log_{10}$ UI/mL)	TAE calcolato ($\log_{10}$ UI/mL)
1	3	0,53	0,30	0,05	0,85	0,65
	5	0,73	0,31	-0,04	0,88	0,67
	12	1,08	0,23	0,18	0,65	0,64
2	2	0,37	0,32	-0,11	0,92	0,75
	7	0,82	0,27	0,04	0,78	0,59
	9	0,96	0,26	0,06	0,74	0,58
3	3	0,46	0,25	-0,01	0,71	0,52
	6	0,76	0,34	-0,02	0,95	0,69
	8	0,89	0,26	-0,01	0,73	0,53

DS = deviazione standard

Tabella 5: Determinazione del LLoQ utilizzando il secondo standard internazionale dell'OMS per l'HCV diluito nel siero

Lotto di reagenti	Aptima HCV Quant Dx (UI/mL)	Aptima HCV Quant Dx ($\log_{10}$ UI/mL)	DS ($\log_{10}$ UI/mL)	Bias ($\log_{10}$ UI/mL)	TE calcolato ($\log_{10}$ UI/mL)	TAE calcolato ($\log_{10}$ UI/mL)
1	4	0,65	0,33	0,17	0,94	0,84
	8	0,93	0,32	0,15	0,90	0,79
	12	1,08	0,28	0,18	0,80	0,74
2	3	0,52	0,36	0,04	1,02	0,76
	8	0,89	0,32	0,11	0,90	0,75
	10	1,01	0,21	0,11	0,60	0,53
3	3	0,47	0,39	-0,01	1,11	0,79
	5	0,71	0,30	-0,06	0,86	0,67
	9	0,95	0,29	0,05	0,83	0,63

DS = deviazione standard

Tabella 6: Riepilogo del LLoQ utilizzando il secondo standard internazionale dell'OMS per l'HCV

Lotto di reagenti	LLoQ plasma		LLoQ siero	
	UI/mL	log_{10} UI/mL	UI/mL	log_{10} UI/mL
1	5	0,73	8	0,93
2	7	0,82	8	0,89
3	6	0,76	5	0,71

Determinazione del limite inferiore di quantificazione (LLoQ) nei genotipi dell'HCV

Il LLoQ è stato determinato analizzando diluizioni di campioni biologi clinici positivi all'HCV per i genotipi 1, 2, 3, 4, 5 e 6 in plasma e siero umani negativi all'HCV. L'assegnazione della concentrazione dei campioni biologici clinici è stata determinata utilizzando un test di confronto. Sono stati analizzati trentasei (36) replicati di ogni elemento del pannello con ciascuno dei tre lotti di reagente per un minimo di 108 replicati per ogni elemento del pannello. I risultati del lotto di reagenti con la concentrazione massima pari o superiore al LoD e che soddisfano i requisiti di TE e TAE, calcolati nel rispetto delle linee guida EP 17-A2[18] del CLSI, sono riportati nella Tabella 7 per il plasma e nella Tabella 8 per il siero. Nella Tabella 7 e nella Tabella 8 sottostanti, vengono riportati un solo risultato maggiore e un solo risultato minore del LLoQ per genotipo, poiché questi risultati riflettono maggiormente il LLoQ previsto. Il LLoQ per i genotipi 1 - 6 nel plasma e nel siero è sintetizzato nella Tabella 9. Il genotipo 6 aveva il LLoQ più alto per il siero a 10 UI/mL. Questo stabilisce che il LLoQ complessivo per il test è 10 UI/mL.

Tabella 7: Determinazione del LLoQ nei genotipi nel plasma

Genotipo	Aptima HCV Quant Dx[a] (UI/mL)	Aptima HCV Quant Dx[a] (log_{10} UI/mL)	DS (log_{10} UI/mL)	Bias (log_{10} UI/mL)	TE calcolato (log_{10} UI/mL)	TAE calcolato (log_{10} UI/mL)
1	4	0,65	0,38	0,17	1,08	0,94
	8	0,88	0,35	0,11	1,00	0,82
	10	0,99	0,24	0,09	0,68	0,56
2	4	0,63	0,40	0,16	1,13	0,95
	6	0,76	0,29	0,15	0,81	0,73
	13	1,12	0,30	0,34	0,86	0,94
3	3	0,52	0,30	-0,26	0,85	0,86
	6	0,80	0,21	-0,20	0,59	0,62
	8	0,89	0,26	-0,19	0,74	0,71
4	4	0,61	0,39	-0,29	1,11	1,07
	7	0,82	0,31	-0,18	0,87	0,80
	10	1,01	0,29	-0,07	0,83	0,65
5	4	0,57	0,37	0,10	1,06	0,85
	7	0,87	0,31	0,09	0,89	0,72
	14	1,15	0,16	0,15	0,44	0,46
6	5	0,66	0,36	0,36	1,02	1,08
	6	0,79	0,28	0,31	0,80	0,87
	14	1,14	0,26	0,36	0,74	0,89

DS = deviazione standard

[a] Sono stati eseguiti ulteriori livelli; tuttavia, tali dati non sono riportati nella tabella.

Tabella 8: Determinazione del LLoQ nei genotipi nel siero

Genotipo	Aptima HCV Quant Dx[a] (UI/mL)	Aptima HCV Quant Dx[a] (log_{10} UI/mL)	DS (log_{10} UI/mL)	Bias (log_{10} UI/mL)	TE calcolato (log_{10} UI/mL)	TAE calcolato (log_{10} UI/mL)
1	6	0,75	0,36	-0,03	1,02	0,75
	8	0,88	0,32	-0,02	0,89	0,65
	11	1,04	0,29	0,04	0,81	0,61
2	3	0,48	0,35	0,00	0,99	0,70
	6	0,80	0,31	0,02	0,86	0,63
	11	1,04	0,25	0,04	0,72	0,54
3	3	0,45	0,25	-0,33	0,72	0,84
	5	0,67	0,22	-0,33	0,63	0,78
	8	0,92	0,19	-0,16	0,54	0,54
4	2	0,19	0,27	0,19	0,77	0,73
	4	0,65	0,32	0,35	0,91	0,99
	4	0,65	0,34	0,17	0,96	0,85
5	3	0,48	0,37	0,02	1,04	0,76
	5	0,72	0,29	-0,04	0,81	0,61
	11	1,04	0,27	0,10	0,77	0,65
6	4	0,58	0,37	0,11	1,04	0,84
	10	0,99	0,22	0,21	0,61	0,64
	18	1,25	0,22	0,25	0,63	0,70

DS = deviazione standard

[a] Sono stati eseguiti ulteriori livelli; tuttavia, tali dati non sono riportati nella tabella.

Tabella 9: Riepilogo del LLoQ nei genotipi nel plasma e nel siero

Genotipo HCV	LLoQ plasma		LLoQ siero	
	UI/mL	log_{10} UI/mL	UI/mL	log_{10} UI/mL
1	8	0,88	8	0,88
2	6	0,76	6	0,80
3	6	0,80	5	0,67
4	7	0,82	4	0,65
5	7	0,87	5	0,72
6	6	0,79	10	0,99

Riconducibilità allo standard internazionale dell'OMS

Durante lo sviluppo e la produzione del prodotto è stata impiegata una serie di standard secondari con concentrazioni note con l'obiettivo di stabilire la riconducibilità allo standard dell'OMS. Le concentrazioni analizzate per lo standard OMS per l'HCV erano comprese tra 4,00 e 2,30 log_{10} UI/mL; la concentrazione degli standard secondari era compresa tra 1,50 e 8,46 log_{10} UI/mL. i controlli e i calibratori del test Aptima HCV Quant Dx Assay sono stati inoltre analizzati unitamente agli standard secondari e allo standard OMS. Tutti i pannelli hanno prodotto risultati simili e sono stati distribuiti in modo lineare nell'intervallo lineare del test, come mostrato nella Figura 9.

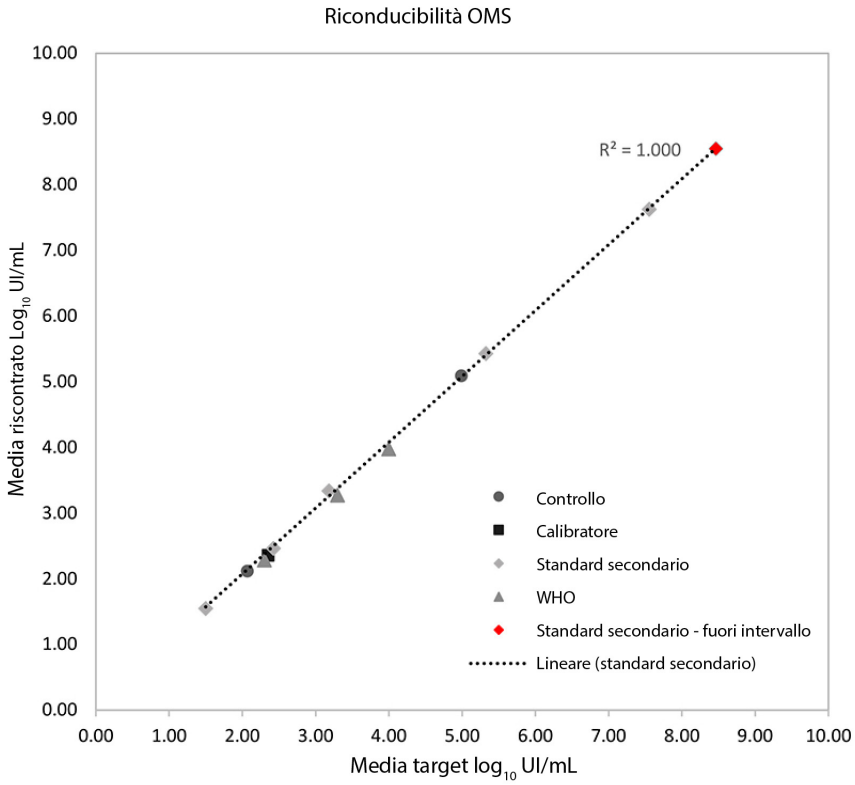


Figura 9. Riconducibilità tra le concentrazioni target secondo il secondo standard dell'OMS per l'HCV e la concentrazione osservata del test Aptima HCV Quant Dx Assay

Precisione

Il pannello di precisione Aptima HCV Quant Dx è stato creato diluendo il plasma clinico positivo all'HCV e l'aRNA del genotipo 1a HCV nel plasma clinico negativo all'HCV (i due elementi più alti del pannello erano aRNA). Sette elementi del pannello hanno coperto l'intervallo del test (da 1,86 log_{10} UI/mL a 7,68 log_{10} UI/mL) e sono stati analizzati in tre replicati per sessione analitica da parte di un operatore, adoperando un lotto pilota di reagenti su un Panther System nel corso di 21 giorni per due sessioni analitiche al giorno.

La Tabella 10 mostra la precisione dei risultati del test (in log_{10} UI/mL) inter-sessioni analitiche, intra-sessioni analitiche e nel complesso. La variabilità totale è stata ≤ 0,14 in tutti gli elementi del pannello, principalmente in ragione della variabilità intra-sessione analitica (ossia errore casuale).

Tabella 10: Precisione del test Aptima HCV Quant Dx Assay

N	Concentrazione media (UI/mL)	Concentrazione media (log_{10} UI/mL)	DS intergiornaliera	Inter-sessioni analitiche DS	Intra-sessioni analitiche DS	Totale DS
126	72	1,86	0,02	0,06	0,12	0,14
126	182	2,26	0,00	0,07	0,07	0,10
126	617	2,79	0,00	0,06	0,08	0,10
126	1.950	3,29	0,00	0,07	0,05	0,08
126	8.128	3,91	0,00	0,06	0,07	0,10
126	616.595	5,79	0,03	0,04	0,06	0,08
125[a]	47.863.009	7,68	0,05	0,05	0,06	0,09

DS = deviazione standard

[a] Numero di risultati validi all'interno dell'intervallo lineare del test.

Nota: la variabilità di alcuni fattori potrebbe essere numericamente negativa, cosa che può verificarsi se la variabilità dovuta a quei fattori è molto piccola. Quando ciò si verifica, il valore DS viene visualizzato pari a 0,00.

Sostanze potenzialmente interferenti

È stata valutata la suscettibilità del test Aptima HCV Quant Dx Assay a interferenza da livelli elevati di sostanze endogene o da farmaci comunemente prescritti ai soggetti con infezione da HCV. Sono stati analizzati campioni di plasma negativi all'HCV e campioni addizionati con HCV a una concentrazione di circa 15 UI/mL (1,2 log_{10} UI/mL) o 1.995 UI/mL (3,3 log_{10} UI/mL) dell'RNA dell'HCV.

Non è stata osservata interferenza nelle prestazioni in presenza di albumina (90 mg/mL), emoglobina (5 mg/mL), trigliceridi (30 mg/mL) o bilirubina non coniugata (0,2 mg/mL).

Con il test Aptima HCV Quant Dx Assay, sono stati analizzati campioni clinici di plasma ottenuti da pazienti con livelli elevati di sostanze definite, dieci campioni per ogni sostanza, o da pazienti affetti dalle patologie elencate nella Tabella 11. Non è stata osservata interferenza nelle prestazioni del test.

Tabella 11: Tipi di campioni clinici testati

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

Non è stata osservata alcuna interferenza nelle prestazioni del test in presenza delle sostanze esogene elencate nella Tabella 12 a concentrazioni almeno tre volte superiori a C_{max} (plasma umano).

Tabella 12: Sostanze esogene

Pool di sostanze esogene	Sostanze esogene analizzate
1	Telaprevir, claritromicina, interferone alfa-2a, dolutegravir, azitromicina
2	Simeprevir, sofosbuvir
3	Efavirenz, boceprevir, peginterferone alfa-2b, emtricitabina, raltegravir, amoxicillina
4	Abacavir solfato, ribavirina, dasabuvir, rilpivirina, rifampina/rifampicina
5	Lopinavir, tenofovir, lamivudina, valganciclovir
6	Eparina, EDTA, citrato di sodio

Prestazioni con campioni negativi all'HCV

La specificità è stata determinata utilizzando 198 campioni clinici negativi all'HCV appena preparati e 538 campioni clinici negativi all'HCV congelati. Utilizzando test approvati, è stata confermata la negatività all'HCV di un totale di 370 campioni di plasma e di un totale di 366 campioni di siero. La specificità è stata calcolata come percentuale di campioni negativi all'HCV con risultati di "Non rilevato". L'RNA dell'HCV non è stato rilevato in tutti i 736 campioni. La specificità è stata del 100% (736/736, IC 95%: 99,6 - 100%).

Tabella 13: Prestazioni in campioni clinici di plasma e siero negativi all'HCV

	Plasma appena preparato	Plasma congelato	Plasma Totale	Siero fresco	Siero congelato	Siero Totale	Combinati
Replicati validi (n)	100	270	370	98	268	366	736
Non rilevato	100	270	370	98	268	366	736
Specificità (IC 95%)	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	(97,1-100)	(98,9-100)	(99,2-100)	(97,0-100)	(98,9-100)	(99,2-100)	(99,6-100)

IC = intervallo di confidenza

Specificità analitica

La potenziale reattività crociata con i patogeni elencati nella Tabella 14 è stata valutata nel plasma umano negativo all'HCV in presenza o in assenza di ca. 15 UI/mL (1,2 $\log_{10}$ UI/mL) o 1.995 (3,3 $\log_{10}$ UI/mL) di HCV. Non è stata osservata alcuna reattività crociata. Non è stata osservata alcuna interferenza in presenza dei patogeni.

Tabella 14: Patogeni analizzati per la specificità analitica

Patogeno	Concentrazione	
Virus dell'epatite A	100.000	copie/mL
Virus dell'epatite B (HBV)	100.000	UI/mL[a]
Virus dell'Epatite G	1.470	genoma/mL
HIV-1	100.000	copie/mL
HIV-2	100.000	PFU/mL[b]
Virus dell'herpes simplex 1 (HSV-1)	100.000	PFU/mL
Virus dell'herpes simplex 2 (HSV-2)	100.000	PFU/mL
Virus dell'herpes umano 6B	100.000	copie/mL
Virus dell'herpes umano 8	2.667	TCID50 U/mL[c]
Virus a cellule T di tipo 1 (HTLV-1)	100.000	vp/mL[d]
Virus a cellule T di tipo 2 (HTLV-2)	100.000	vp/mL
Parvovirus B19	100.000	UI/mL
Virus del Nilo occidentale	100.000	PFU/mL
Virus Dengue 1	100.000	PFU/mL
Virus Dengue 2	100.000	PFU/mL
Virus Dengue 3	100.000	PFU/mL
Virus Dengue 4	100.000	PFU/mL
Cytomegalovirus	100.000	PFU/mL
Virus di Epstein-Barr	100.000	copie/mL
Rubivirus	100.000	PFU/mL
Papillomavirus umano	100.000	cellule/mL
Adenovirus tipo 5	100.000	TCID50 U/mL
Virus dell'influenza A	100.000	TCID50 U/mL
Virus dell'encefalite giapponese	NP	NP
Virus dell'encefalite di St. Louis	NP	NP
Virus dell'encefalite di Murray Valley	2.643	LD50/mL[e]
Virus della febbre gialla	100.000	cellule/mL

Patogeno	Concentrazione	
Corynebacterium diphtheriae	1.000.000	CFU/mL[f]
Streptococcus pneumoniae	1.000.000	CFU/mL
Staphylococcus aureus	1.000.000	CFU/mL
Propionibacterium acnes	1.000.000	CFU/mL
Staphylococcus epidermidis	1.000.000	CFU/mL
Candida albicans	1.000.000	CFU/mL
Neisseria gonorrhoeae	1.000.000	CFU/mL
Chlamydia trachomatis	1.000.000	IFU/mL[g]
Trichomonas vaginalis	1.000.000	cellule/mL

[a]UI/mL = Unità internazionali per mL.
[b]PFU/mL = Unità formanti placche per mL.
[c]TCID50 U/mL = Unità di dose infettante le colture tissutali per mL.
[d]vp/mL = Particelle virali per mL.
[e] LD50/mL = dose letale per mL
[f]CFU/mL = Unità formanti colonie per mL.
[g]IFU/mL = Unità formanti inclusioni per mL.

Campioni clinici contenenti virus diversi dall'HCV

I patogeni elencati nella Tabella 15 sono stati valutati ottenendo campioni clinici naturalmente infetti. Questi ultimi sono stati analizzati in presenza o in assenza di circa 15 UI/mL (1,2 log_{10} UI/mL) o 1.995 UI/mL (3,3 log_{10} UI/mL) di virus dell'HCV. Non è stata osservata alcuna reattività crociata. Non è stata osservata alcuna interferenza.

Tabella 15: Campioni clinici analizzati per la specificità analitica

Microrganismo	Matrice	N (donatori)
HBV	Siero	5
HBV	Plasma	5
Virus Dengue	Plasma	10
Virus dell'epatite A	Plasma	10
HTLV-1	Plasma	10
HTLV-2	Plasma	10
HIV-1	Plasma	10
Virus del Nilo occidentale	Plasma	10

Equivalenza di matrice

Sono stati valutati settantasei set di campioni di provette di raccolta di sangue abbinate (provetta con siero, SST, PPT, ACD, K2 EDTA e K3 EDTA) per determinare l'equivalenza di matrice. Di questi set di campioni, 68 erano positivi all'HCV da infezione naturale e 108 erano negativi all'HCV. Ventisei dei 68 set di campioni positivi sono stati ulteriormente diluiti con 13 campioni negativi di provette per prelievo di sangue abbinate con un rapporto di 1:10, 1:100 e 1:1000 o 1:100, 1:10.000 e 1:100.000 a concentrazioni nell'intervallo dinamico del test (146 replicati positivi per provetta di raccolta). La correlazione è stata misurata utilizzando la provetta di raccolta del siero come comparatore.

Tabella 16: Studio dell'equivalenza di matrice

Provetta di raccolta sangue	Regressione di Deming	IC al 95% di pendenza		IC al 95% di intercetta		R^2	Differenza media (log_{10})
		Inferiore Limite	Limite superiore	Limite inferiore	Superiore Limite		
SST	y = 1,00x - 0,01	0,99	1,01	-0,05	0,07	0,998	0,00
K2 EDTA	y = 1,01x - 0,03	0,99	1,02	-0,12	-0,07	0,995	0,00
K3 EDTA	y = 1,00x - 0,01	0,98	1,01	-0,10	0,07	0,996	-0,02
ACD	y = 1,00x - 0,14	0,99	1,01	-0,20	-0,08	0,997	-0,13
PPT	y = 1,00x - 0,01	0,98	1,01	-0,10	0,08	0,996	-0,01

Diluizione (1:3) dei campioni con il diluente dei campioni Aptima

Per valutare l'accuratezza del rilevamento dell'RNA dell'HCV nei campioni diluiti con plasma o siero del diluente dei campioni Aptima, i campioni compresi nell'intervallo da 1,67 log_{10} UI/mL a 6,34 log_{10} UI/mL sono stati diluiti con un rapporti di 1:3 con il diluente dei campioni Aptima (ovvero, 240 µL di campione sono stati combinati con 480 µL di diluente dei campioni Aptima). Ogni campione è stato analizzato non diluito e diluito (1:3) in triplicato. Le analisi sono state effettuate utilizzando un lotto di reagenti del test su un Panther System e due lotti di diluente dei campioni Aptima. La differenza tra i risultati del test per i campioni puri e per i campioni diluiti è stata calcolata per ciascun set di campioni come mostrato nella Tabella 17 per il plasma e nella Tabella 18 per il siero.

Tabella 17: Riepilogo del confronto relativo alla matrice di diluizione 1:3 dei campioni di plasma in Log_{10} UI/mL

Concentrazione media riportata della matrice del plasma (log_{10} UI/mL) n = 3	Concentrazione media riportata del diluente (log_{10} UI/mL) n = 6	Differenza tra diluente e matrice del plasma (log_{10} UI/mL)
1,74[a]	1,57[b]	-0,18
4,56	4,36	-0,20
5,62	5,46	-0,17
3,69	3,56	-0,13
2,65	2,60	-0,05
4,18	4,09	-0,09
3,25	3,28	0,03
4,12	4,06	-0,07
3,54	3,48	-0,06
6,20	5,91	-0,30

[a] Risultato di due repliche. Un risultato "Rilevato" ma non quantificato.
[b] Risultato di quattro repliche. Due risultati "Rilevati" ma non quantificati.

Tabella 18: Riepilogo del confronto relativo alla matrice di diluizione 1:3 dei campioni di siero in log_{10} UI/mL

Concentrazione media riportata della matrice del siero (log_{10} UI/mL) n = 3	Concentrazione media riportata del diluente (log_{10} UI/mL) n = 6	Differenza tra diluente e matrice del siero (log_{10} UI/mL)
1,50[a]	1,80	0,30
5,32	5,14	-0,18
3,65	3,59	-0,06
4,91	4,71	-0,20
3,66	3,72	0,06
3,81	3,74	-0,07
2,42	2,60	0,18
2,65	2,88	0,23
4,90	4,70	-0,21
6,17	6,00	-0,17

[a] Risultato di due repliche. Un risultato "Rilevato" ma non quantificato.

Diluizione (1:100) dei campioni con il diluente dei campioni Aptima

Per valutare l'accuratezza del rilevamento dell'RNA dell'HCV in campioni diluiti con plasma o siero del diluente dei campioni Aptima, cinque campioni di plasma e cinque campioni di siero naturalmente infetti, insieme a dieci campioni ciascuno di plasma e siero negativi all'HCV addizionati con aRNA dell'HCV con l'obiettivo di superare l'ULoQ, 8 log_{10} UI/mL a 8,30 log_{10} UI/mL sono stati analizzati in triplicato. È stata eseguita una diluizione 1:100 con una parte di campione e 99 parti di diluente dei campioni Aptima immediatamente prima dell'analisi. Le analisi sono state effettuate utilizzando un lotto di reagenti del test su un Panther System e due lotti di diluente dei campioni Aptima. La differenza tra i risultati del test per i campioni puri e per i campioni diluiti è stata calcolata per ciascun set di campioni come mostrato nella Tabella 19 per il plasma e nella Tabella 20 per il siero.

Tabella 19: Riepilogo del confronto relativo alla matrice di diluizione 1:100 dei campioni di plasma in log_{10} UI/mL

Matrice	Diluizione	Concentrazione media riportata della matrice di plasma (log_{10} UI/mL) n = 3	Concentrazione media riportata del diluente (log_{10} UI/mL) n = 6	Differenza
Plasma	1:100	8,03[a]	7,95	-0,08
		8,07[a]	7,93	-0,15
		8,14[a]	7,97	-0,17
		8,16[a]	7,94	-0,22
		8,09[a]	7,96	-0,13
		8,38[a]	7,97	-0,42
		7,98[a]	7,89	-0,09
		8,08[a]	7,89	-0,19
		8,14[a]	7,92	-0,22
		8,08[a]	7,97	-0,11
		6,41	6,22	-0,19
		6,73	6,58	-0,15
		6,88	6,75	-0,14
		6,54	6,51	-0,03
		6,55	6,29	-0,27

[a] Campione biologico addizionato

Tabella 20: Riepilogo del confronto relativo alla matrice di diluizione 1:100 dei campioni di siero in log_{10} UI/mL

Matrice	Diluizione	Concentrazione media riportata della matrice del siero (log_{10} UI/mL) n = 3	Concentrazione media riportata del diluente (log_{10} UI/mL) n = 6	Differenza
Siero	1:100	8,04[a]	7,94	-0,09
		8,07[a]	7,91	-0,16
		7,99[a]	7,91	-0,08
		8,03[a]	7,92	-0,11
		7,99[a]	7,89	-0,09
		8,05[a]	7,85	-0,20
		8,16[a]	7,93	-0,23
		8,16[a]	7,90	-0,26
		8,06[a]	7,89	-0,17
		8,26[a]	7,92	-0,34
		7,34	7,09	-0,25
		7,07	6,83	-0,24
		7,18	6,80	-0,38
		7,35[b]	7,12	-0,23
		7,07	6,68	-0,39

[a] Campione biologico addizionato

[b] Risultato di due dei tre replicati analizzati. Un replicato anomalo è stato rimosso.

Verifica del LLoQ nei campioni clinici diluiti nel diluente dei campioni

Il valore LLoQ del test Aptima HCV Quant Assay è stato verificato con i campioni clinici del genotipo 1 dell'HCV diluiti nel diluente dei campioni Aptima. I campioni sono stati preparati in plasma e siero di origine umana negativi all'HCV a 21, 30 e 45 UI/mL. Ciascun pannello è stato diluito in un rapporto 1:3 nel Diluente dei campioni Aptima immediatamente prima dell'analisi per produrre delle concentrazioni finali di circa 7, 10 e 15 UI/mL. Sono stati analizzati trentasei (36) replicati di ciascun elemento del pannello con un lotto di reagente nell'arco di tre giorni. Come mostrato nella Tabella 21, per il plasma e il siero negativi all'HCV diluiti nel diluente dei campioni Aptima è stato confermato un valore di LLoQ ≤ 10 UI/mL.

Tabella 21: Verifica del LLoQ - campioni clinici diluiti nel diluente dei campioni Aptima

Matrice	Concentrazione target (UI/mL)	Concentrazione target (log_{10} UI/mL)	% Rilevato	Aptima HCV Quant Dx (UI/mL)	Aptima HCV Quant Dx (log_{10} UI/mL)	DS (log_{10} UI/mL)	Bias (log_{10} UI/mL)	TE calcolato (log_{10} UI/mL)	TAE calcolato (log_{10} UI/mL)
Plasma	7	0,85	100%	9	0,94	0,25	0,10	0,71	0,60
Siero	7	0,85	100%	9	0,96	0,21	0,12	0,60	0,54

Precisione dei campioni diluiti

Il pannello di precisione Aptima HCV Quant Dx è stato creato diluendo il plasma clinico positivo all'HCV e l'aRNA dell'HCV nel plasma clinico negativo all'HCV. Il suddetto pannello è stato ulteriormente diluito nel diluente dei campioni Aptima I pannelli positivi sono stati diluiti nel diluente dei campioni Aptima e analizzati in tre replicati per sessione analitica da un operatore, adoperando un lotto pilota di reagenti su un Panther System nel corso di 21 giorni di analisi per due sessioni analitiche al giorno.

La Tabella 22 mostra la precisione dei risultati del test (in $\log_{10}$ UI/mL) inter-sessioni analitiche, intra-sessioni analitiche, intergiornaliera e nel complesso. La variabilità totale è stata ≤ 0,15 in tutti gli elementi del pannello, principalmente in ragione della variabilità intra-sessione analitica (ossia errore casuale).

Tabella 22: Precisione dei pannelli diluiti nel diluente dei campioni Aptima

Diluizione	N	Concentrazione media ($\log_{10}$ UI/mL)	Deviazione standard			
			Intergiornaliera	Inter-sessioni analitiche	Intra-sessioni analitiche	Totale
1:3	126	2,24	0,00	0,05	0,13	0,14
1:100	126	3,86	0,06	0,05	0,12	0,15
1:100	126	7,31	0,03	0,10	0,05	0,12

[a] Numero di risultati validi rientranti nell'intervallo lineare del test.

Nota: *la variabilità di alcuni fattori potrebbe essere numericamente negativa, eventualità che può verificarsi se la variabilità, dovuta a quei fattori, è molto esigua. Quando ciò si verifica, i valori DS e CV sono uguali a 0.*

Contaminazione crociata

Per stabilire che il Panther System riduce al minimo il rischio di risultati falsi positivi causati da contaminazione crociata, è stato condotto uno studio utilizzando pannelli addizionati su tre Panther System. La contaminazione crociata è stata valutata utilizzando campioni di plasma addizionati con DNA aRNA ad alta titolazione (7 $\log_{10}$ UI/mL) intervallati tra campioni negativi all'HCV in una disposizione a scacchiera. L'analisi è stata eseguita nel corso di quindici sessioni analitiche. Il tasso generale di contaminazione crociata era dello 0,14% (1/704).

Pannello di sieroconversione

Sono stati analizzati undici set di pannelli di sieroconversione per HCV per un totale di 72 campioni. I risultati del test Aptima HCV Quant Dx Assay sono stati confrontati con i risultati dei test degli anticorpi anti-HCV. Il numero di giorni al primo risultato reattivo è riportato nella Tabella 23. Il test Aptima HCV Quant Dx Assay ha rilevato la presenza di HCV in media 20 giorni prima dei test degli anticorpi.

Tabella 23: Riepilogo dei dati dei pannelli di sieroconversione

ID pannello	Numero di elementi del pannello testati	Numero di elementi del pannello reattivi			Giorni al primo risultato reattivo			Differenza in giorni al primo risultato reattivo (in base alla data del prelievo)	
		Aptima HCV Quant Dx	Test anticorpi anti-HCV 1	Test anticorpi anti-HCV 2	Aptima HCV Quant Dx	Test anticorpi anti-HCV 1	Test anticorpi anti-HCV 2	Giorni di rilevamento in anticipo rispetto al test degli anticorpi anti-HCV 1	Giorni di rilevamento in anticipo rispetto al test degli anticorpi anti-HCV 2
PHV911	4	4	3	3	3[a]	14	14	11	11
PHV913	4	4	0	2	0	9[b]	7	9	7
PH919	7	4	3	3	25	28	28	3	3
PH920	9	9	7	6	0[c]	13	16	13	16
PH921	11	11	9	7	0	7	18	7	18
PH923	6	6	2	2	0	21	21	21	21

Tabella 23: Riepilogo dei dati dei pannelli di sieroconversione (continua)

ID pannello	Numero di elementi del pannello testati	Numero di elementi del pannello reattivi			Giorni al primo risultato reattivo			Differenza in giorni al primo risultato reattivo (in base alla data del prelievo)	
		Aptima HCV Quant Dx	Test anticorpi anti-HCV 1	Test anticorpi anti-HCV 2	Aptima HCV Quant Dx	Test anticorpi anti-HCV 1	Test anticorpi anti-HCV 2	Giorni di rilevamento in anticipo rispetto al test degli anticorpi anti-HCV 1	Giorni di rilevamento in anticipo rispetto al test degli anticorpi anti-HCV 2
PH924	6	6	3	3	0	59	59	59	59
PH925	5	5	1	1	0	27	27	27	27
PH926	5	5	1	0	0	14	14[b]	14	14
6227	7	4	2	2	42	74	74	32	32
6229	8	8	4	3	0	17	20	17	20
Totale	72	66	35	32			Media	19,36	20,73
							Mediana	14	18

Il test degli anticorpi anti-HCV 1 è stato completato con il test Abbott Prism HCV Assay.
Il test degli anticorpi anti-HCV 2 è stato completato con il test Ortho Enhanced SAVE Assay con le seguenti eccezioni:
Panelli 6227 e 6229, che sono stati entrambi analizzati con il test Ortho ELISA Anti-HCV 3.0
[a] Il primo prelievo non è stato analizzato in ragione dell'indisponibilità del campione del fornitore.
[b] Tutti i prelievi di questo pannello sono risultati non reattivi all'anticorpo anti-HCV. Il giorno dell'ultimo prelievo è stato usato come il valore "Giorni al primo risultato reattivo".
[c] Il secondo prelievo non è stato analizzato in ragione dell'indisponibilità del campione del fornitore.

Studio sulla riproducibilità

La riproducibilità è stata valutata sul Panther System presso tre centri di analisi USA esterni. Due operatori hanno eseguito i test in ciascun centro. Ogni operatore ha eseguito due sessioni analitiche al giorno nell'arco di tre giorni, utilizzando 3 lotti di reagente durante l'analisi. Ciascuna sessione analitica è stata caratterizzata da tre repliche di ciascun elemento del pannello. Sono stati analizzati complessivamente 108 replicati per ogni elemento del pannello.

La riproducibilità è stata analizzata impiegando gli elementi del pannello ottenuti dal plasma negativo all'HCV. Gli elementi del pannello positivi lo erano per il genotipo 1, genotipo 2 o genotipo 3 dell'HCV. Le concentrazioni di RNA di HCV coprivano l'intervallo lineare del test.

La Tabella 24 mostra la riproducibilità e la precisione dei risultati del test per ciascun elemento positivo del pannello tra i centri, tra gli operatori, interlotto, intergiornaliere, inter-sessioni analitiche, intra-sessioni analitiche e nel complesso; nella tabella è altresì mostrata la percentuale di replicati a cui sono associati risultati non rientranti nell'intervallo refertabile del test Aptima HCV Quant Dx Assay.

Il coefficiente di variazione è stato calcolato utilizzando la seguente equazione, dove σ^2 è la varianza dei campioni dei dati dopo la trasformazione $\log_{10}$.

$$\% \text{ CV} = 100 \times \sqrt{(10^{\sigma^2 \ln(10)} - 1)}$$

Per l'elemento del pannello negativo all'HCV, sono stati analizzati 108 replicati; l'RNA dell'HCV non è stato rilevato in tutti e 108 i replicati (concordanza negativa = 100%, IC al 95%: dal 96,6% al 100%). Per tutti gli elementi del pannello positivi all'HCV, i valori di concordanza erano pari al 100%.

Tabella 24: Riproducibilità dei livelli di RNA dell'HCV del test Aptima HCV Quant Dx Assay sul Panther System negli elementi positivi del pannello

GT	N	Media osservata IU/mL	Media osservata Log_{10} IU/mL	Tra siti diversi SD (%CV)	Tra lotti diversi SD (%CV)	Tra operatori/giorni[a] SD (%CV)	Tra diverse sessioni analitiche SD (%CV)	Durante le sessioni analitiche SD (%CV)	Totale SD (%CV)	In basso LLoQ n (%)	Sopra ULoQ n (%)
1	108	10,6	1,0	0,070 (16,22)	0,048 (10,98)	0,000 (0,00)	0,040 (9,20)	0,258 (64,93)	0,274 (69,94)	59 (54,6)	0 (0,0)
	107	19,5	1,3	0,034 (7,77)	0,035 (7,97)	0,009 (2,10)	0,064 (14,91)	0,169 (40,31)	0,187 (45,12)	9 (8,4)	0 (0,0)
	108	43,6	1,6	0,000 (0,00)	0,070 (16,11)	0,000 (0,00)	0,061 (14,13)	0,155 (36,82)	0,180 (43,39)	0 (0,0)	0 (0,0)
	108	602,7	2,8	0,042 (9,58)	0,035 (8,02)	0,022 (5,05)	0,023 (5,30)	0,075 (17,40)	0,098 (22,81)	0 (0,0)	0 (0,0)
	108	22710,9	4,3	0,075 (17,42)	0,045 (10,49)	0,044 (10,08)	0,058 (13,46)	0,071 (16,57)	0,135 (31,74)	0 (0,0)	0 (0,0)
	108	4195539,0	6,6	0,007 (1,65)	0,026 (6,08)	0,045 (10,43)	0,000 (0,00)	0,131 (30,97)	0,142 (33,50)	0 (0,0)	0 (0,0)
	108	58549271,2	7,8	0,010 (2,26)	0,000 (0,00)	0,022 (5,10)	0,035 (8,08)	0,105 (24,42)	0,113 (26,43)	0 (0,0)	1 (0,9)
2	108	11,3	1,0	0,062 (14,29)	0,075 (17,28)	0,112 (26,28)	0,000 (0,00)	0,290 (75,02)	0,326 (86,94)	53 (49,1)	0 (0,0)
	108	13,9	1,1	0,000 (0,00)	0,125 (29,36)	0,128 (30,18)	0,068 (15,83)	0,211 (51,69)	0,285 (73,45)	46 (42,6)	0 (0,0)
	108	62,6	1,8	0,000 (0,00)	0,044 (10,18)	0,101 (23,48)	0,069 (16,00)	0,124 (29,25)	0,180 (43,24)	0 (0,0)	0 (0,0)
	108	351,0	2,5	0,022 (5,18)	0,062 (14,38)	0,004 (1,01)	0,045 (10,31)	0,081 (18,70)	0,113 (26,56)	0 (0,0)	0 (0,0)
	108	14519,2	4,1	0,000 (0,00)	0,051 (11,78)	0,048 (11,01)	0,011 (2,42)	0,092 (21,50)	0,116 (27,25)	0 (0,0)	0 (0,0)
	108	5810012,3	6,8	0,000 (0,00)	0,017 (4,00)	0,041 (9,54)	0,015 (3,53)	0,104 (24,25)	0,114 (26,73)	0 (0,0)	0 (0,0)
	108	77499195,7	7,9	0,000 (0,00)	0,018 (4,24)	0,028 (6,56)	0,000 (0,00)	0,077 (17,77)	0,084 (19,46)	0 (0,0)	10 (9,3)
3	107	8,6	0,9	0,049 (11,32)	0,103 (24,05)	0,056 (12,95)	0,000 (0,00)	0,225 (55,47)	0,258 (65,16)	71 (66,4)	0 (0,0)
	108	14,3	1,1	0,157 (37,31)	0,000 (0,00)	0,090 (21,04)	0,000 (0,00)	0,178 (42,88)	0,254 (63,90)	36 (33,3)	0 (0,0)
	107	49,9	1,7	0,119 (27,96)	0,065 (15,08)	0,047 (10,80)	0,034 (7,81)	0,109 (25,42)	0,183 (44,15)	0 (0,0)	0 (0,0)
	108	218,3	2,2	0,324 (86,23)	0,043 (10,01)	0,139 (32,83)	0,063 (14,64)	0,082 (19,09)	0,370 (103,21)	0 (0,0)	0 (0,0)
	107	8541,1	3,9	0,248 (61,97)	0,056 (12,90)	0,151 (35,77)	0,048 (10,99)	0,078 (18,19)	0,309 (81,20)	0 (0,0)	0 (0,0)
	107	4128761,4	6,6	0,044 (10,17)	0,000 (0,00)	0,000 (0,00)	0,042 (9,61)	0,126 (29,65)	0,140 (33,06)	0 (0,0)	0 (0,0)
	108	63813728,0	7,8	0,012 (2,84)	0,000 (0,00)	0,000 (0,00)	0,059 (13,76)	0,092 (21,32)	0,110 (25,71)	0 (0,0)	3 (2,8)

% CV = coefficiente di variazione logaritmico normale, GT = genotipo DS = deviazione standard (log_{10} UI/mL)

Nota: la variabilità da alcuni fattori potrebbe essere numericamente negativa. Ciò può verificarsi se la variabilità dovuta a tali fattori è piuttosto ridotta. In tali casi, i valori DS e CV sono uguali a 0.

[a] In ragione della possibilità di confondere la variabilità tra operatori con quella intergiornaliera, le stime tra operatori e intergiornaliere sono combinate in tra operatori/intergiornaliere.

Prestazioni cliniche

Correlazione fra metodi

Le prestazioni del test Aptima HCV Quant Dx Assay sono state determinate confrontandole con quelle di un test di confronto con marcatura CE analizzando campioni clinici non diluiti provenienti da pazienti con infezione da HVC, utilizzando tre Panther System con quattro lotti di reagenti. Un totale di 1058 campioni di plasma e di siero (872 campioni di plasma e 186 campioni di siero) in tutti i genotipi dell'HCV rientranti nell'intervallo lineare comune a entrambi i test sono stati utilizzati per la regressione lineare come mostrato nella Figura 10.

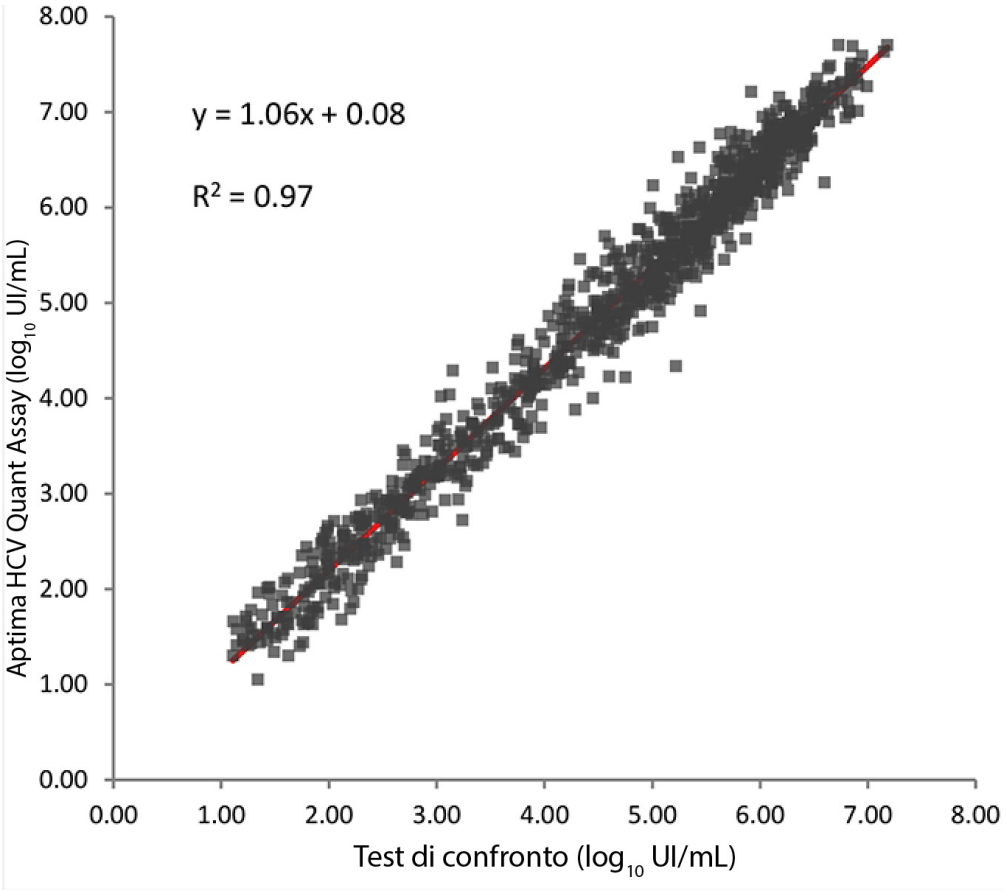


Figura 10. Correlazione fra il test Aptima HCV Quant Dx Assay e il test di confronto

Studio sull'utilità clinica

Lo studio è stato formulato per dimostrare l'utilità clinica stimando le caratteristiche prestazionali per ottenere una risposta virologica sostenuta (SVR) o una risposta virologica non sostenuta (nonsustained virologic response, NSVR) in punti temporali prestabiliti e clinicamente rilevanti durante il trattamento antivirale di 8, 12 o 24 settimane. Lo studio ha altresì valutato l'influenza delle covariate (ossia età, sesso, etnia, livello basale di RNA dell'HCV e presenza o assenza di cirrosi) sulla risposta SVR.

I campioni sono stati raccolti in modo prospettico da soggetti di genotipo 1, 2 e 3 con infezione cronica da HCV che stavano iniziando la terapia con trattamenti a base di sofosbuvir della durata di 8, 12 o 24 settimane utilizzando farmaci approvati dalla FDA e prescritti nel rispetto dell'etichettatura approvata dalla FDA e /o delle linee guida dell'AASLD/IDSA sul trattamento dell'HCV.[20,21] I soggetti naïve al trattamento per l'HCV o con esperienza di trattamento e i soggetti senza cirrosi o con cirrosi compensata erano idonei, come applicabile per ciascun regime di trattamento.

La determinazione della carica virale dell'RNA dell'HCV è stata eseguita al basale nonché alle settimane 1, 2, 4, 8, 12 e 24 utilizzando il test Aptima HCV Quant Dx Assay. I risultati del follow-up alla fine del trattamento (EOT) e alla settimana 4 e alla settimana 12 post-trattamento sono stati determinati utilizzando il test Aptima HCV Quant Dx Assay e due test quantitativi dell'RNA dell'HCV approvati. La SVR è stata definita in termini di livello di RNA dell'HCV < LLoQ determinato mediante un test quantitativo approvato per il campione della settimana 12 post-trattamento.

Dei 352 soggetti arruolati da 35 centri clinici statunitensi, 274 avevano uno stato SVR definitivo ed erano valutabili per l'analisi. Cinquantasei (56) soggetti presentavano uno stato SVR non valutabile e non sono stati inclusi nell'analisi. Altri 22 soggetti presentavano uno stato SVR definitivo, ma non erano valutabili in ragione della mancanza di risultati pre-trattamento/al basale; tutti risultati durante il trattamento < LLoQ o non rilevati o i genotipi non sono stati stabiliti con un test approvato. In questo studio, il 90,5% (248/274) dei soggetti ha raggiunto la SVR e il 9,5% (26/274) ha raggiunto la NSVR (si veda dalla Tabella 31 alla Tabella 33 per i valori in base a genotipo e DRA). La più alta carica virale al basale era pari a 7,58 $\log_{10}$ UI/mL, sulla base di quanto stabilito mediante il test Aptima HCV Quant Dx Assay. Tutti i soggetti valutabili hanno completato la terapia senza manifestazione di inefficacia durante il trattamento (ad es., mancata risposta). È stato analizzato un totale di 2.449 campioni raccolti in momenti diversi da ciascun soggetto in tre centri di analisi negli Stati Uniti.

La Tabella 25 mostra le caratteristiche demografiche e cliniche dei 274 soggetti valutabili.

Tabella 25: Caratteristiche demografiche e cliniche

Caratteristiche		
Totale	N	274
Genere	Femminile, n (%)	112 (40,9)
	Maschile, n (%)	162 (59,1)
Età (anni)	n	274
	Media	55,1
	Mediana	56,0
	DS	10,40
	Minimo	23
	Massimo	83
	21 - 49, n (%)	61 (22,3)
	50 - 70, n (%)	203 (74,1)
	> 70, n (%)	10 (3,6)

Tabella 25: Caratteristiche demografiche e cliniche (continua)

Etnia	n	274
	Ispanica o latina, n (%)	65 (23,7)
	Non ispanica o latina, n (%)	202 (73,7)
	Non nota, n (%)	6 (2,2)
	Rifiutata, n (%)	1 (0,4)
Origine etnica[a]	n	274
	Bianca, n (%)	223 (81,4)
	Nera o afro-americana, n (%)	43 (15,7)
	Asiatica, n (%)	1 (0,4)
	Indiano d'America/Nativo dell'Alaska, n (%)	3 (1,1)
	Nativo delle Hawaii/Abitante delle isole del Pacifico, n (%)	0 (0,0)
	Altra, n (%)	3 (1,1)
	Non nota, n (%)	1 (0,4)
	Rifiutata, n (%)	0 (0,0)
Genotipo	n	274
	Genotipo 1, n (%)	158 (57,7)
	Genotipo 2, n (%)	66 (24,1)
	Genotipo 3, n (%)	50 (18,2)
Stato del trattamento per l'HCV	n	274
	Naïve, n (%)	232 (84,7)
	Precedentemente trattati, n (%)	42 (15,3)
	Ricaduta, n (%)	32 (76,2)
	Risposta insufficiente o nulla, n (%)	1 (2,4)
	Non rispondente, n (%)	2 (4,8)
	Parzialmente rispondente, n (%)	3 (7,1)
	Breakthrough, n (%)	1 (2,4)
	Rebound virologico, n (%)	0 (0,0)
	Risposta al trattamento non nota, n (%)	3 (7,1)
	Mancante, n (%)	0 (0,0)
Stato cirrotico	n	274
	Cirrosi, n (%)	98 (35,8)
	Assenza di cirrosi, n (%)	176 (64,2)

[a] I soggetti potrebbero dichiarare più di una origine etnica.

La Tabella 26 mostra le assegnazioni finali del regime farmacologico per i 274 soggetti valutabili.

Tabella 26: Riepilogo delle assegnazioni finali del regime farmacologico dei soggetti in base al genotipo

Assegnazione del regime farmacologico	**Genotipo HCV, n (%)**		
	1	**2**	**3**
Sofosbuvir, peginterferone e ribavirina per 12 settimane	25 (15,8)	-	3 (6,0)
Sofosbuvir e simeprevir e/o ribavirina per 12 settimane	63 (39,9)	-	-
Sofosbuvir e simeprevir e/o ribavirina per 24 settimane	4 (2,5)	-	-
Sofosbuvir e ribavirina per 12 settimane	-	66 (100)	-
Sofosbuvir e ribavirina per 24 settimane	6 (3,8)	-	47 (94,0)
Ledipasvir e sofosbuvir per 8 settimane	14 (8,9)	-	-
Ledipasvir e sofosbuvir per 12 settimane	39 (24,7)	-	-
Ledipasvir e sofosbuvir per 24 settimane	7 (4,4)	-	-
Totale soggetti idonei	158	66	50

Nella Tabella 27 viene valutata l'associazione delle covariate al basale (età, origine etnica, sesso, carica virale dell'HCV al basale [variabile binaria] e stato cirrotico) e la SVR utilizzando il rapporto di probabilità (odds ratio, OR) con un'analisi di regressione logistica univariata (non corretta). I risultati per i 274 soggetti valutabili sono stati esaminati in base al genotipo dell'HCV. Per i genotipi 1 e 2, i soggetti cirrotici avevano meno probabilità rispetto ai soggetti non cirrotici di raggiungere la SVR (OR = 0,16 [IC al 95% con test di Wald: da 0,04 a 0,63], p = 0,009 e OR = 0,13 [IC al 95% con test di Wald: da 0,02 a 0,70], rispettivamente p = 0,017). I valori dell'IC al 95% per le altre covariate per il genotipo 1 e 2 e tutte le covariate per il genotipo 3 includevano il valore 1 e non erano statisticamente significativi.

Tabella 27: Valutazione dei predittori di SVR al basale

GT	Categoria	N	Raggruppamento	N (%)	Percentuale che ha raggiunto la SVR	Rapporto di probabilità (IC al 95% con test di Wald) Utilizzo dell'analisi LR univariata	Valore p
1	Età	158	≥ 40 anni	146 (92,4)	91,8	0 [0 - ∞)	Non calcolabile
			< 40 anni	12 (7,6)	100		
	Genere	158	Maschile	92 (58,2)	90,2	0,44 (0,11 – 1,69)	0,231
			Femminile	66 (41,8)	95,5		
	Razza	158	Bianco	116 (73,4)	94,0	2,10 (0,63 – 7,03)	0,227
			Non bianco	42 (26,6)	88,1		
	Carica virale al basale dell'RNA dell'HCV[a]	156	> 740.000 UI/mL	111 (71,2)	92,8	1,26 (0,36 – 4,40)	0,721
			≤ 740.000 UI/mL	45 (28,8)	91,1		
	Stato cirrotico	158	Cirrotico	57 (36,1)	84,2	0,16 (0,04 – 0,63)	0,009
			Non cirrotico	101 (63,9)	97,0		
2	Età	66	≥ 40 anni	60 (90,9)	88,3	1,51 (0,15 – 14,91)	0,722
			< 40 anni	6 (9,1)	83,3		
	Genere	66	Maschile	36 (54,5)	86,1	0,69 (0,15 – 3,15)	0,631
			Femminile	30 (45,5)	90,0		
	Razza	66	Bianco	61 (92,4)	86,9	0 [0 - ∞)	Non calcolabile
			Non bianco	5 (7,6)	100		
	Carica virale al basale dell'RNA dell'HCV	66	> 740.000 UI/mL	44 (66,7)	84,1	0,25 (0,03 – 2,19)	0,211
			≤ 740.000 UI/mL	22 (33,3)	95,5		
	Stato cirrotico	66	Cirrotico	22 (33,3)	72,7	0,13 (0,02 – 0,70)	0,017
			Non cirrotico	44 (66,7)	95,5		
3	Età	50	≥ 40 anni	44 (88,0)	86,4	0 [0 - ∞)	NC
			< 40 anni	6 (12,0)	100		
	Genere	50	Maschile	34 (68,0)	85,3	0,39 (0,04 – 3,62)	0,405
			Femminile	16 (32,0)	93,8		
	Razza	50	Bianco	46 (92,0)	87,0	0 [0 - ∞)	Non calcolabile
			Non bianco	4 (8,0)	100		
	Carica virale al basale dell'RNA dell'HCV[a]	49	> 740.000 UI/mL	30 (61,2)	83,3	0,28 (0,03 – 2,59)	0,261
			≤ 740.000 UI/mL	19 (38,8)	94,7		
	Stato cirrotico	50	Cirrotico	19 (38,0)	78,9	0,26 (0,04 – 1,58)	0,143
			Non cirrotico	31 (62,0)	93,5		

IC = intervallo di confidenza; GT = genotipo; LR = regressione logistica

[a] La covariata della carica virale dell'RNA dell'HCV al basale non include i soggetti che non hanno fornito una carica virale quantitativa dell'RNA dell'HCV prima dell'inizio della terapia.

Risposta alla terapia antivirale

Le caratteristiche prestazionali del test sono state stabilite per individui trattati con determinati regimi DAA. Non vi sono informazioni disponibili sul valore predittivo del test quando vengono impiegate altre terapie combinate di DAA.

Definizioni:

Carica virale (VL) alla settimana 1 = RNA dell'HCV < LLoQ = 10 UI/mL alla settimana 1 della terapia antivirale

VL alla settimana 2 = RNA dell'HCV < LLoQ = 10 UI/mL alla settimana 2 della terapia antivirale

VL alla settimana 4 = RNA dell'HCV < LLoQ = 10 UI/mL alla settimana 4 della terapia antivirale

VL alla settimana 8 = RNA dell'HCV < LLoQ = 10 UI/mL alla settimana 8 della terapia antivirale

VL alla settimana 8 (EOT): RNA dell'HCV < LLoQ alla settimana 8 della terapia antivirale

VL alla settimana 12 = RNA dell'HCV < LLoQ = 10 UI/mL alla settimana 12 della terapia antivirale

VL alla settimana 12 (EOT): RNA dell'HCV < LLoQ alla settimana 12 della terapia antivirale

VL alla settimana 24 (EOT): RNA dell'HCV < LLoQ alla settimana 24 della terapia antivirale

Risposta virologica sostenuta (SVR)12: RNA dell'HCV < LLoQ alla settimana 12 dopo il completamento della terapia antivirale, misurato con un test indipendente dell'RNA dell'HCV.

La Tabella 28 e la Tabella 29 mostrano rispettivamente la frequenza della risposta SVR e della mancata risposta in base al genotipo e al regime farmacologico nel complesso nonché per soggetti cirrotici, non cirrotici, naïve al trattamento e con esperienza di trattamento. La maggior parte dei soggetti ha raggiunto SVR nei genotipi: 92,4% nel genotipo 1, 87,9% nel genotipo 2 e 88,0% nel genotipo 3. In tutti i genotipi, i tassi di SVR erano generalmente più alti nei soggetti non cirrotici rispetto ai soggetti cirrotici e simili tra soggetti naïve al trattamento e soggetti con esperienza di trattamento.

Tabella 28: Frequenza della risposta SVR in base al genotipo e al regime farmacologico

GT	DRA	Soggetti con risposta SVR n (%)				
		Nel complesso	Cirrotico	Non cirrotico	Naïve al trattamento	Precedentemente trattati
1	Ledipasvir e sofosbuvir per 8 settimane	13/14 (92,9)	N/A	13/14 (92,9)	13/14 (92,9)	N/A
	Ledipasvir e sofosbuvir per 12 settimane	39/39 (100)	9/9 (100)	30/30 (100)	34/34 (100)	5/5 (100)
	Ledipasvir e sofosbuvir per 24 settimane	6/7 (85,7)	6/7 (85,7)	N/A	N/A	6/7 (85,7)
	Sofosbuvir, peginterferone e ribavirina per 12 settimane	24/25 96,0)	7/7 (100)	17/18 (94,4)	22/23 (95,7)	2/2 (100)
	Sofosbuvir e ribavirina per 24 settimane	6/6 (100)	1/1 (100)	5/5 (100)	5/5 (100)	1/1 (100)
	Sofosbuvir e simeprevir e/o ribavirina per 12 settimane	54/63 (85,7)	21/29 (72,4)	33/34 (97,1)	45/54 (83,3)	9/9 (100)
	Sofosbuvir e simeprevir e/o ribavirina per 24 settimane	4/4 (100)	4/4 (100)	N/A	2/2 (100)	2/2 (100)
2	Sofosbuvir e ribavirina per 12 settimane	58/66 (87,9)	16/22 (72,7)	42/44 (95,5)	53/60 (88,3)	5/6 (83,3)
3	Sofosbuvir, peginterferone e ribavirina per 12 settimane	3/3 (100)	3/3 (100)	N/A	1/1 (100)	2/2 (100)
	Sofosbuvir e ribavirina per 24 settimane	41/47 (87,2)	12/16 (75,0)	29/31 (93,5)	35/39 (89,7)	6/8 (75,0)

DRA = assegnazione regime farmacologico; GT = genotipo, N/A = il regime farmacologico non è applicabile per questo gruppo di pazienti

Tabella 29: Frequenza di mancanza di risposta SVR in base al genotipo e al regime farmacologico

GT	DRA	Soggetti senza risposta SVR n (%)				
		Nel complesso	**Cirrotico**	**Non cirrotico**	**Naïve al trattamento**	**Precedentemente trattati**
1	Ledipasvir e sofosbuvir per 8 settimane	1/14 (7,1)	N/A	1/14 (7,1)	1/14 (7,1)	N/A
	Ledipasvir e sofosbuvir per 12 settimane	0/39 (0,0)	0/9 (0,0)	0/30 (0,0)	0/34 (0,0)	0/5 (0,0)
	Ledipasvir e sofosbuvir per 24 settimane	1/7 (14,3)	1/7 (14,3)	N/A	N/A	1/7 (14,3)
	Sofosbuvir, peginterferone e ribavirina per 12 settimane	1/25 (4,0)	0/7 (0,0)	1/18 (5,6)	1/23 (4,3)	0/2 (0,0)
	Sofosbuvir e ribavirina per 24 settimane	0/6 (0,0)	0/1 (0,0)	0/5 (0,0)	0/5 (0,0)	0/1 (0,0)
	Sofosbuvir e simeprevir e/o ribavirina per 12 settimane	9/63 (14,3)	8/29 (27,6)	1/34 (2,9)	9/54 (16,7)	0/9 (0,0)
	Sofosbuvir e simeprevir e/o ribavirina per 24 settimane	0/4 (0,0)	0/4 (0,0)	N/A	0/2 (0,0)	0/2 (0,0)
2	Sofosbuvir e ribavirina per 12 settimane	8/66 (12,1)	6/22 (27,3)	2/44 (4,5)	7/60 (11,7)	1/6 (16,7)
3	Sofosbuvir, peginterferone e ribavirina per 12 settimane	0/3 (0,0)	0/3 (0,0)	N/A	0/1 (0,0)	0/2 (0,0)
	Sofosbuvir e ribavirina per 24 settimane	6/47 (12,8)	4/16 (25,0)	2/31 (6,5)	4/39 (10,3)	2/8 (25,0)

DRA = assegnazione regime farmacologico; GT = genotipo, N/A = il regime farmacologico non è applicabile per questo gruppo di pazienti

Nella Tabella 30 è riportata la percentuale di soggetti con risposta virologica (definita in termini di risultati del test Aptima HCV Quant Dx Assay < LLoQ) per ogni genotipo e assegnazione del regime farmacologico a ogni visita durante il trattamento e a specifiche settimane post-trattamento. La maggior parte dei soggetti ha raggiunto la SVR entro la settimana 4 in tutti i genotipi; tutti i soggetti hanno raggiunto la SVR entro la settimana 8.

Tabella 30: Probabilità di raggiungere la risposta SVR durante il trattamento e a specifiche settimane post-trattamento

GT	DRA	N	Con risposta SVR % (n)	Senza risposta SVR % (n)	Percentuale di soggetti con risposta virologica per visita[a] n (%)						
					Settimane					EOT	PT04
					1	2	4	8	12		
1	LDV + SOF (8 settimane)	14	92,9 (13/14)	7,1 (1/14)	42,9 (6/14)	76,9 (10/13)	100 (14/14)	N/A	N/A	100 (14/14)	90 (9/10)
	LDV + SOF (12 settimane)	39	100 (39/39)	0,0 (0/39)	11,1 (4/36)	52,6% (20/38)	92,1 (35/38)	100 (36/36)	N/A	100 (39/39)	100 (33/33)
	LDV + SOF (24 settimane)	7	85,7 (6/7)	14,3 (1/7)	0,0 (0/6)	42,9 (3/7)	71,4 (5/7)	100 (7/7)	100 (7/7)	100 (6/6)	80 (4/5)
	SOF+PEG+RBV (12 settimane)	25	96,0 (24/25)	4,0 (1/25)	40,0 (10/25)	80,0 (20/25)	100 (25/25)	100 (25/25)	N/A	100 (25/25)	100 (25/25)
	SOF+RBV (24 settimane)	6	100 (6/6)	0,0 (0/6)	16,7 (1/6)	66,7 (4/6)	83,3 (5/6)	100 (5/5)	100 (6/6)	100 (5/5)	100 (6/6)
	SOF+SIM+RBV (12 settimane)	63	85,7 (54/63)	14,3 (9/63)	20,7 (12/58)	67,9 (38/56)	98,4 (62/63)	100 (57/57)	N/A	96,6 (57/59)	90,0 (54/60)
	SOF+SIM+RBV (24 settimane)	4	100 (4/4)	0,0 (0/4)	66,7 (2/3)	66,7 (2/3)	100 (4/4)	100 (3/3)	100 (3/3)	100 (4/4)	100 (4/4)
2	SOF+RBV (12 settimane)	66	87,9 (58/66)	12,1 (8/66)	22,2 (12/54)	69,4 (43/62)	95,4 (62/65)	100 (64/64)	N/A	98,5 (64/65)	93,5 (58/62)
3	SOF+PEG+RBV (12 settimane)	3	100 (3/3)	0,0 (0/3)	33,3 (1/3)	100 (2/2)	100 (3/3)	100 (2/2)	N/A	100 (3/3)	100 (3/3)
	SOF+RBV (24 settimane)	47	87,2 (41/47)	12,8 (6/47)	20,9 (9/43)	70,5 (31/44)	100 (46/46)	100 (46/46)	100 (47/47)	100 (42/42)	89,1 (41/46)

DRA = assegnazione del regime farmacologico; EOT = fine del trattamento; N/A = non applicabile perché la visita corrisponde all'EOT per il trattamento assegnato o è oltre la finestra di trattamento; PT04 = settimana 4 post-trattamento

[a] Risposta virale durante e dopo il trattamento definita come < 10 UI/mL.

Nota: l'EOT non è incluso nella settimana di trattamento.

Per i partecipanti con genotipo 1, il 95,5% (150/157) dei soggetti valutati ha mostrato risposte virali durante il trattamento entro la settimana 4. I 7 soggetti di genotipo 1 che non hanno mostrato alcuna risposta entro la settimana 4 (3 soggetti trattati con LDV + SOF [12 settimane], 2 soggetti trattati con LDV + SOF [24 settimane], 1 soggetto ciascuno trattato con SOF + RBV [24 settimane] o SOF + SIM ± RBV [12 settimane]) hanno mostrato risposte virali al trattamento entro la settimana 8. Due (2) soggetti trattati con SOF + SIM ± RBV (12 settimane) hanno avuto una recidiva alla fine del trattamento e 6 (1 soggetto trattato con LDF + SOF [8 settimane], 1 soggetto trattato con LDF + SOF [24 settimane] , e 4 soggetti trattati con SOF + SIM ± RBV [12 settimane]) hanno avuto una recidiva entro la settimana 4 post-trattamento.

Per i partecipanti con genotipo 2, il 95,4% (62/65) dei soggetti valutati ha mostrato risposte virali durante il trattamento entro la settimana 4. I 3 soggetti con genotipo 2 che non avevano mostrato alcuna risposto entro la settimana 4 hanno fatto registrare risposte virali al trattamento entro la settimana 8. Un (1) soggetto trattato con SOF + RBV (12 settimane) ha manifestato una recidiva alla fine del trattamento e 4 soggetti con lo stesso regime farmacologico assegnato hanno avuto una recidiva alla settimana 4 post-trattamento.

Per i partecipanti con genotipo 3, il 100% (49/49) dei soggetti valutati ha mostrato risposte virali durante il trattamento entro la settimana 4. Nessun (0) soggetto ha manifestato una

recidiva alla fine del trattamento e 5 soggetti trattati con SOF + RBV (24 settimane) hanno avuto una recidiva entro la settimana 4 post-trattamento.

Sulla base dei risultati di questo studio, il test Aptima HCV Quant Dx Assay può essere utilizzato come ausilio nella gestione dei pazienti con infezione da HCV in terapia antivirale a base di sofosbuvir e può essere utilizzato per determinare la risposta SVR e la mancata risposta. I risultati del test possono essere utilizzati per misurare quantitativamente i livelli di RNA dell'HCV nel plasma umano al basale e durante il trattamento.

Studio sull'utilità diagnostica

La sensibilità è stata valutata in 338 soggetti positivi agli anticorpi anti-HCV appartenenti a una popolazione ad alto rischio. Nella Tabella 31 sono indicate le caratteristiche demografiche e cliniche del soggetto.

Tabella 31: Caratteristiche demografiche e cliniche dei soggetti positivi agli anticorpi anti-HCV

Caratteristiche		
Totale	*N*	338
Genere	Femminile, n (%)	80 (23,7)
	Maschile, n (%)	258 (76,3)
Età (anni)	Media	48,2
	Mediana	51,0
	DS	11,01
	< 21, n (%)	2 (0,6)
	21 - 49, n (%)	152 (45,0)
	50 - 70, n (%)	182 (53,8)
	> 70, n (%)	2 (0,6)
Origine etnica/Etnia[a]	Bianca, n (%)	86 (25,4)
	Nera, n (%)	118 (34,9)
	Asiatica, n (%)	1 (0,3)
	Ispanica, n (%)	123 (36,4)
	Etnie miste, n (%)	4 (1,2)
	Altra, n (%)	10 (3,0)
	Non nota, n (%)	0 (0,0)
Fattore di rischio[b]	Uso di farmaci iniettabili, n (%)	294 (87,0)
	Trattati con fattori della coagulazione prodotti prima del 1990, n (%)	0 (0,0)
	Diagnosi/Trattamento per epatite, n (%)	172 (50,9)
	Diagnosi/Trattamento per HIV, n (%)	13 (3,8)
	Esperienza di detenzione carceraria, n (%)	311 (92,0)
	Destinatari di trasfusione di sangue o emocomponenti, n (%)	39 (11,5)
	Destinatari di un trapianto, n (%)	0 (0,0)
	Emodialisi, n (%)	3 (0,9)
	Livelli di ALT costantemente elevati, n (%)	2 (0,6)
	Nati tra il 1945 e il 1965, n (%)	192 (56,8)
Stato dell'infezione da HCV	Positività alla presenza dell'RNA dell'HCV, n (%)	259 (76,6)
	Negatività alla presenza dell'RNA dell'HCV, n (%)	79 (23,4)

ALT = alanina aminotransferasi, HIV = virus dell'immunodeficienza umana
[a] I soggetti potrebbero dichiarare più di una origine etnica.
[b] I soggetti potrebbero segnalare più di un fattore di rischio.

I campioni biologici sono stati analizzati con un test qualitativo dell'RNA dell'HCV approvato, un test anticorpale anti-HCV approvato e il test Aptima HCV Quant Dx Assay. Lo studio ha incluso 338 soggetti reattivi agli anticorpi anti-HCV. Secondo le attuali linee guida dell'AASLD, si deve impiegare un NAAT approvato dalla FDA con un livello di rilevamento massimo di 25 UI/mL[20] per confermare uno stato di infezione da HCV positivo a seguito di un risultato reattivo del test anticorpale anti-HCV. La concordanza tra lo stato dell'infezione del paziente e i risultati del test Aptima HCV Quant Dx Assay è stata determinata utilizzando un valore di cutoff di 25 UI/mL. I campioni biologici con risultati < 25 UI/mL sono stati considerati "non rilevati"; di contro, quelli con risultati ≥ 25 UI/mL sono stati considerati "rilevati". Si veda la Tabella 32.

I risultati del test Aptima HCV Quant Dx Assay sono stati confrontati con lo stato di infezione di un paziente sulla base dei risultati del test anticorpale anti-HCV approvato e dei risultati del test qualitativo dell'RNA approvato. Lo stato di infezione del paziente è stato considerato positivo all'HCV se sia il test anticorpale anti-HCV sia il test qualitativo approvato hanno restituito risultati reattivi. Lo stato di infezione del paziente è stato considerato negativo all'HCV se il test anticorpale anti-HCV approvato aveva restituito un risultato non reattivo.

Dei 338 soggetti con risultati di reattività agli anticorpi anti-HCV, 256 sono stati rilevati dal test Aptima HCV Quant Dx Assay (% concordanza positiva = 98,8%). Dei tre soggetti con RNA dell'HCV quantificato al di sotto di 25 UI/mL o non rilevato, due soggetti hanno fatto registrare un risultato rilevato ma non quantificato (RNA dell'HCV < 10 UI/mL) e un soggetto ha fatto registrare un risultato quantitativo dell'RNA dell'HCV di 12 UI/mL.

Tabella 32: Concordanza tra i risultati del test Aptima HCV Quant Dx Assay e lo stato di infezione del paziente utilizzando un valore di cutoff di 25 UI/mL

Aptima HCV Quant Dx Riportato	**Stato di infezione pazienti**		**Totale**
	Positività all'HCV	**Negatività all'HCV**	
RNA dell'HCV quantificato pari o superiore a 25 UI/mL	256	0	256
RNA dell'HCV quantificato o rilevato al di sotto di 25 UI/mL o non rilevato	3[a]	79	82
Totale	259	79	338
% concordanza positiva (IC al 95% del punteggio)	98,8 (96,7-99,6)	N/A	N/A
% concordanza negativa (IC al 95% del punteggio)	N/A	100 (95,4-100)	N/A

IC = intervallo di confidenza, N/A = non applicabile

[a] Il test Aptima HCV Quant Dx Assay ha rilevato ma non quantificato l'RNA dell'HCV (< 10 UI/mL) per due soggetti e per un terzo soggetto l'RNA dell'HCV è stato quantificato come pari a 12 UI/mL.

Questo studio dimostra l'utilità clinica del test Aptima HCV Quant Dx Assay nel diagnosticare correttamente i soggetti con infezione da RNA dell'HCV attiva in corso e nel distinguerli dai soggetti con infezioni inattive in una popolazione con precedente esposizione all'HCV (sierologia positiva per gli anticorpi anti-HCV).

Reattività crociata in soggetti con epatopatia non correlata all'HCV

Sono stati prelevati campioni di siero e plasma (n = 214) da soggetti con altre epatopatie (in cui l'infezione attiva da HCV non era indicata come causa soggiacente). I campioni sono stati testati con un test anti-HCV approvato e un test qualitativo dell'RNA dell'HCV approvato per attestare che i campioni fossero negativi all'HCV. Sono stati esclusi diciassette (17) campioni positivi all'HCV (con risultati positivi nel test anticorpale anti-HCV e/o risultati reattivi del test qualitativo dell'RNA dell'HCV) e tre campioni non idonei. I test Aptima HCV Quant Dx Assay sono stati eseguiti internamente con tre lotti di kit di reagenti. La Tabella 33 mostra le caratteristiche demografiche e lo stato dell'epatopatia dei 194 soggetti valutabili.

Tabella 33: Caratteristiche demografiche e stato dell'epatopatia dei soggetti

Caratteristiche		Tutti
Totale	N	194
Genere	n	193
	Femminile, n (%)	116 (60,1)
	Maschile, n (%)	77 (39,9)
Età (anni)	n	194
	Media	55,2
	Mediana	56,0
	DS	12,19
	Minimo	25
	Massimo	82
	21 - 49, n (%)	60 (30,9)
	50 - 70, n (%)	114 (58,8)
	> 70, n (%)	20 (10,3)
Etnia	n	194
	Ispanica o latina, n (%)	9 (4,6)
	Non ispanica o latina, n (%)	147 (75,8)
	Non nota, n (%)	38 (19,6)
	Rifiutata, n (%)	0 (0,0)
Origine etnica[a]	n	194
	Bianca, n (%)	122 (62,9)
	Nera o afro-americana, n (%)	20 (10,3)
	Asiatica, n (%)	17 (8,8)
	Indiano d'America/Nativo dell'Alaska, n (%)	0 (0,0)
	Nativo delle Hawaii/Abitante delle isole del Pacifico, n (%)	1 (0,5)
	Altra, n (%)	34 (17,5)
	Non nota, n (%)	2 (1,0)
	Rifiutata, n (%)	0 (0,0)
Epatopatia[b]	n	194
	Epatite autoimmune, n (%)	31 (16,0)
	Malattia epatica alcolica, n (%)	51 (26,3)
	HBV cronico, n (%)	34 (17,5)
	Cirrosi biliare primitiva, n (%)	37 (19,1)
	NASH, n (%)	39 (20,1)
	Più di un'epatopatia dichiarata, n (%)	2 (1,0)

HBV = virus dell'epatite B; NASH = steatoepatite non alcolica

[a] I soggetti potrebbero dichiarare più di una origine etnica.

[b] I soggetti con più di un'epatopatia hanno dichiarato sia epatite autoimmune sia cirrosi biliare primitiva.

Nella Tabella 34 è riportata la specificità del test Aptima HCV Quant Dx Assay in base all'epatopatia e la distribuzione dei risultati del test Aptima HCV Quant Dx Assay tra le categorie di carica virale. La specificità è stata del 100% nei soggetti con virus dell'epatite B cronica (HBV), cirrosi biliare primitiva, steatoepatite non alcolica (NASH) e più di un'epatopatia dichiarata. L'RNA dell'HCV è stato rilevato a livelli molto bassi in 1 soggetto con epatite autoimmune (< 10 UI/mL) e in 4 soggetti con malattia epatica alcolica (< 10 UI/mL per 3 soggetti e 16 UI/mL per 1 soggetto). Per uno dei 5 soggetti, l'RNA dell'HCV è stato rilevato da un test quantitativo dell'HCV approvato.

Tabella 34: Specificità del test Aptima HCV Quant Dx Assay e risultati di distribuzione nei soggetti negativi agli anticorpi anti-HCV e all'RNA dell'HCV con epatopatie non correlate all'HCV

Epatopatia	Specificità (%) IC al 95%[a]	Non rilevata	< 10 UI/mL	10 - < 25 UI/mL	25 - 100.000.000 UI/mL	> 100.000.000 UI/mL	Totale
Epatite autoimmune	96,8 (83,8-99,4)	30 (96,8)	1 (3,2)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	31
Malattia epatica alcolica	92,2 (81,5-96,9)	47 (92,2)	3 (5,9)[b]	1 (2,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	51
HBV cronico	100 (89,8-100)	34 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	34
Cirrosi biliare primitiva	100 (90,6-100)	37 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	37
NASH	100 (91,0-100)	39 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	39
Più di un'epatopatia[C]	100 (34,2-100)	2 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2
Totale	97,4 (94,1-98,9)	189 (97,4)	4 (2,1)	1 (0,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	194

HBV = virus dell'epatite B, NASH = steatoepatite non alcolica

[a] IC del punteggio.

[b] Per un soggetto, l'RNA dell'HCV è stato rilevato da un test quantitativo dell'HCV approvato dalla FDA.

[c] I soggetti presentavano sia epatite autoimmune sia cirrosi biliare primitiva.

Bibliografia

1. Averhoff FM, Glass N and Holtzman D. Global Burden of Hepatitis C: Considerations for Healthcare Providers in the United States. Clinical Infectious Diseases 2012; 55 (S1): S10-15.
2. Zalesak M, Francis K, Gedeon A, et al. Current and Future Disease Progression of the Chronic HCV Population in the United States. PLoS One. 2013 May 21;8(5):e63959
3. Engle RE, Bukh J, Alter HJ et al., Transfusion-associated hepatitis before the screening of blood for hepatitis risk factors.Transfusion. 2014 May 5.
4. Lee M-H, Yang, H-I, Yuan Y et al., Epidemiology and natural history of hepatitis C virus infection. World J Gasteroenterology 2014: 20 (28): 9270-9280.
5. Tan SL, editor. Hepatitis C Viruses: Genome and Molecular Biology. Norfolk (UK): Horizon Bioscience; 2006.
6. Smith DB, Bukh J, Kuiken C, et al, P. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource.Hepatology. 2014 Jan;59(1):318-27.
7. EASL Recommendations on treatment of Hepatitis C 2014: www.easl.eu/_clinical-practice-guideline.
8. AASLD and the Infectious Diseases Society of America (IDSA), in collaboration with the International Antiviral Society-USA (IAS-USA). HCV Guidance: Recommendations for Testing, Managing, and Treating Hepatitis C. 2014: www.hcvguidelines.org.
9. CDC. Testing for HCV infection: An update for clinicians and laboratories. MMWR 2013; 62 (18).
10. Sidharthan, S., Kohli, A., Sims, Z., Nelson, A., Osinusi, A., Masur, H., Kottilil, S. Utility of Hepatitis C Viral Load Monitoring on Directly Acting Antiviral Therapy. Clinical Infectious Diseases, 2015.
11. Kohli, A., Shaffer, A., Sherman, A., Kottilil, S. Treatment of hepatitis C: a systematic review. JAMA, 2014.
12. AASLD. Recommendations for Testing, Managing, and Treating Hepatitis C. 2015. Pubblicato su hcvguidelines.org, (ultimo accesso: 11 febbraio 2016).
13. Simmons, B., Saleem, J., Heath, K., Cooke, G., Hill, A. Long-term treatment outcomes of patients infected with Hepatitis C virus: a systematic review and meta-analysis of the survival benefit of achieving a Sustained Virological Response. Clinical Infectious. 2015 Sep 1;61(5):730-40.
14. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2005. Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods; Approved Guideline. CLSI Document MM13-A. Wayne, PA.
15. **29 CFR Part 1910.1030.** Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens; current version.
16. **Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health.** Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL); current version.
17. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2002. Clinical Laboratory Waste Management. CLSI Document GP5-A2. Villanova, PA.
18. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)**. 2012. Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline—Second Edition. Documento CLSI EP17-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
19. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)**. 2003. Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline. Documento CLSI EP06-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
20. AASLD/IDSA. Recommendations for testing, managing, and treating hepatitis C. AASLD and IDSA. http://www.hcvguidelines.org/fullreport. Aggiornamento: 21 marzo 2014. Ultimo accesso: 01 marzo 2016.
21. AASLD/IDSA HCV Guidance Panel. Hepatitis C Guidance: AASLD-IDSA recommendations for testing, managing, and treating adults infected with hepatitis C virus. Hepatology. 2015;62(3):932-954.

Recapiti e cronologia delle revisioni



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

IVD

CE 2797

EC REP

Hologic BV
Da Vincilaan 5
1930 Zaventem
Belgium

Australian Sponsor
Hologic (Australia & New Zealand) Pty Ltd.
Macquarie Park NSW 2113

Per l'indirizzo e-mail e il numero di telefono dell'assistenza tecnica e del servizio clienti specifici del Paese, visitare www.hologic.com/support.

Incidenti gravi verificatisi in relazione al dispositivo nell'Unione europea devono essere segnalati al fabbricante e all'autorità competente dello Stato membro in cui l'utilizzatore e/o il paziente è stabilito.

Hologic, Aptima, Panther, Panther Fusion e i relativi loghi sono marchi commerciali o marchi registrati di Hologic, Inc. e/o delle aziende consociate negli U.S.A. e/o in altri Paesi.

Armored RNA è un marchio commerciale di Asuragen, Inc.

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

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

©2016-2025 Hologic, Inc. Tutti i diritti riservati.

AW-28216-701 Rev. 001

2025-12

Cronologia delle revisioni	Data	Descrizione
AW-28216-701 Rev. 001	Dicembre 2025	• Versione iniziale.