Kvantifikacijski test Aptima® HCV Dx

Upute za uporabu
Za *in vitro* dijagnostičku uporabu
Samo za izvoz u SAD

Opće informacije 2
Predviđena uporaba 2
Sažetak i objašnjenje testa 2
Načela postupka 3
Sažetak o sigurnosti i učinkovitosti 4
Upozorenja i mjere opreza 4
Zahtjevi za skladištenje reagensa i rukovanje njima 8
Prikupljanje i skladištenje ispitaka 9
Uzorci na sustavu Panther 12
Transport ispitaka 12
Sustav Panther 13
Isporučeni reagensi i materijali 13
Potrebni materijali koji su dostupni zasebno 14
Opcionalni materijali 15
Postupak testiranja na sustavu Panther 16
Napomene o postupku 20
Kontrola kvalitete 21
Kalibracija testa 21
Negativne i pozitivne kontrole 21
Interni kalibrator / interna kontrola 21
Tumačenje rezultata 22
Ograničenja 23
Analitička učinkovitost 24
Granica detekcije (LoD) primjenom 2. međunarodnog standarda SZO-a 24
Granica detekcije među genotipovima HCV-a 24
Linearni raspon 25
Linearnost među genotipovima HCV-a 26
Donja granica kvantifikacije primjenom 2. međunarodnog standarda SZO-a 27
Određivanje donje granice kvantifikacije (LLoQ) za sve genotipove HCV-a 28
Sljedivost do standarda SZO-a 30
Preciznost 30
Potencijalno interferirajuće tvari 31
Učinkovitost s ispitcima negativnima na HCV 33
Analitička specifičnost 33
Klinički uzorci koji sadrže viruse osim HCV-a 34
Ekvivalencija matrice 35
Razrjeđivanje uzorka s pomoću razrjeđivača za ispitke Aptima (1 : 3) 35
Razrjeđivanje uzorka s pomoću razrjeđivača za ispitke Aptima (1 : 100) 36
Potvrda LLoQ-a u kliničkim ispitcima razrijeđenima u razrjeđivaču za ispitke 37
Preciznost razrijeđenih uzoraka 38
Prijenos 38
Serokonverzijski panel 38
Studija obnovljivosti 39
Klinička učinkovitost 41
Korelacija metoda 41
Studija kliničke korisnosti 41
Odgovor na antivirusnu terapiju 45
Studija dijagnostičke korisnosti 49
Križna reaktivnost u ispitanika s bolešću jetre koja nije povezana s HCV-om 51
Bibliografija 53
Kontaktni podaci i povijest revizija 54

Opće informacije

Predviđena uporaba

Kvantifikacijski test Aptima® HCV Dx je test amplifikacije posredovane transkripcijom u stvarnom vremenu. Ovaj test se koristi za detekciju i kvantifikaciju RNA virusa hepatitisa C (HCV) u svježem i smrznutom ljudskom serumu i plazmi osoba zaraženih HCV-om.

Plazma se može pripremiti u etilendiamintetraoctenoj kiselini (EDTA), otopini antikoagulantne citrat-dekstroze (ACD) i epruvetama za pripremu plazme (PPT). Serum se može pripremiti u epruvetama za serum i epruvetama za odvajanje seruma (SST). Ispitci se testiraju s pomoću sustava Panther™ za automatiziranu obradu, amplifikaciju, detekciju i kvantifikaciju ispitaka. Ispitci koji sadržavaju HCV genotipove od 1 do 6 potvrđeni su za otkrivanje i kvantifikaciju u testu.

Kvantifikacijski test Aptima HCV Dx je indiciran za upotrebu kao pomoć u dijagnozi HCV infekcije. Test se može koristiti za potvrdu aktivne HCV infekcije kod bolesnika s pozitivnim rezultatom HCV protutijela. Detekcija HCV RNA-a ukazuje na to da se virus replicira i stoga je dokaz aktivne infekcije.

Kvantifikacijski test Aptima HCV Dx test indiciran je za upotrebu kao pomoć u liječenju bolesnika zaraženih HCV-om koji se podvrgavaju antivirusnoj terapiji protiv HCV-a. Test mjeri razine HCV RNA na početku, tijekom liječenja i nakon liječenja kako bi se odredio održivi virološki odgovor (SVR). Rezultate kvantifikacijskog testa Aptima HCV Dx treba tumačiti u kontekstu svih relevantnih kliničkih i laboratorijskih nalaza.

Kvantifikacijski test Aptima HCV Dx nije namijenjen za korištenje kao probirni test za prisutnost HCV-a u krvi ili krvnim pripravcima.

Sažetak i objašnjenje testa

HCV je patogen koji se prenosi krvlju i predstavlja globalni javnozdravstveni teret s do 170 milijuna ljudi zaraženih diljem svijeta i 350.000 smrtnih slučajeva godišnje zbog stanja povezanih s HCV-om, uključujući cirozu i rak jetre.[1,2] Prijenos HCV-a događa se izloženošću krvi, krvnim pripravcima ili aktivnostima s potencijalom za perkutanu izloženost.[3,4] Genetski, HCV sadrži pozitivno lančani RNA genom od približno 9500 nukleotida koji kodiraju strukturne proteine (jezgru, glikoproteine E1 i E2, protein ionskog kanala p7) i nestrukturne proteine (NS2, NS3, NS4A/B, NS5A/B), pri čemu su potonji ključni virusni replikacijski proteini i mete izravno djelujućih antivirusnih lijekova.[4,5] Dvije netranslatirane regije (UTR) genoma, 5'UTR i 3'UTR, imaju ulogu u translaciji i replikaciji/pakiranju genoma.[5] 5'-UTR je najočuvanija genomska regija među šest glavnih genotipova HCV-a.[6]

Klinički, postoji visoka prevalencija asimptomatske infekcije HCV-om, a kronična infekcija HCV-om javlja se u do 75 % bolesnika.[2] Algoritmi laboratorijskog testiranja HCV-a zahtijevaju dijagnozu aktivnih infekcija HCV-om u osoba pozitivnih na protutijela putem detekcije HCV RNA-a u plazmi ili serumu kako bi se omogućilo odgovarajuće povezivanje sa skrbi.[7,8,9]

Kvantifikacija HCV RNA (količina virusa u krvi) odigrala je ključnu ulogu u definiranju i praćenju uspješnog liječenja HCV-a. Održivi virološki odgovor (SVR), definiran kao nedetektirani HCV RNA nakon uspješne terapije, ključni je marker za izlječenje HCV-a.[10,11] U terapiji temeljenoj na interferonu, rani virološki odgovor (EVR), definiran kao smanjenje količine virusa HCV-a u krvi za 2 log ili više nakon 12 tjedana terapije, i brzi virološki odgovor (RVR), definiran kao nedetektabilne razine HCV RNA-a nakon 4 tjedna terapije, pokazali su se pozitivnim prediktorima za SVR.[10,12,13] Ovi markeri virusne kinetike upotrebljavaju se u pristupima vođenim odgovorom koji prilagođavaju mogućnosti liječenja za prekid ili produljenje terapije kako bi se postigao SVR.[14]

Nadalje, dugoročne studije praćenja pokazale su trajnost SVR-a nakon uspješnog liječenja, a eradikacija virusa sprječava progresiju bolesti jetre.[10]

U današnje vrijeme antivirusnih lijekova s izravnim djelovanjem (DAA) kvantifikacija HCV RNA-a (količine virusa u krvi) odigrala je ključnu ulogu u definiranju i praćenju uspješnog liječenja HCV-a. Održivi virološki odgovor (SVR) definiran je kao nedetektabilni HCV RNA (s pomoću testa koji ima granicu detekcije od < 25 IU/mL) nakon terapije.[10,11] U nedavnim smjernicama AASLD-a predlaže se testiranje HCV RNA-a ne samo na početku, već i periodično tijekom liječenja (tj. 4 tjedna) i 12 tjedana nakon završetka liječenja.[10,12,13]

Načela postupka

Kvantifikacijski test Aptima HCV Dx jest test amplifikacije nukleinskih kiselina koji upotrebljava tehnologiju amplifikacije posredovane transkripcijom (TMA) u stvarnom vremenu za detekciju i kvantifikaciju HCV RNA-a radi pomoći u dijagnosticiranju ili utvrđivanja početne količine virusa u krvi, kao i za mjerenje odgovora tijekom i nakon liječenja. Test cilja konzerviranu regiju HCV genoma, detektirajući i kvantificirajući genotipove 1, 2, 3, 4, 5 i 6. Test je standardiziran prema 2. međunarodnom standardu SZO-a za virus hepatitisa C (NIBSC kod 96/798).[12]

Kvantifikacijski test Aptima HCV Dx obuhvaća tri glavna koraka koji se svi odvijaju u jednoj epruveti na sustavu Panther: izdvajanje ciljne sekvence, amplifikacija ciljne sekvence s pomoću amplifikacije posredovane transkripcijom (TMA) i otkrivanje produkata amplifikacije (amplikon) s pomoću fluorescentno obilježenih sondi (izvora svjetlosti).

Tijekom izdvajanja ciljne sekvence, RNA virusa se izolira iz ispitaka. Ispitak se tretira deterdžentom kako bi se solubilizirala virusna ovojnica, denaturirali proteini i oslobodila virusna genomska RNA. Izdvojeni oligonukleotidi hibridiziraju se s visoko očuvanim regijama HCV RNA, ako su prisutne, u testnom ispitku. Hibridizirana ciljna sekvenca zatim se hvata na magnetske mikročestice koje se od ispitka odvajaju u magnetskom polju. Koraci pranja uklanjaju nepripadajuće komponente iz reakcijske epruvete.

Amplifikacija ciljne sekvence odvija se s pomoću tehnike TMA, metode amplifikacije nukleinske kiseline posredovane transkripcijom u kojoj se primjenjuju dva enzima, reverzna transkriptaza Moloneyjevog virusa mišje leukemije (engl. *Moloney murine leukemia virus*, MMLV) i T7 RNA polimeraza. Reverznom transkriptazom generira se kopija DNA (koja sadržava promotorsku sekvencu za T7 RNA polimerazu) ciljne sekvence. T7 RNA polimeraza proizvodi više kopija amplikona RNA iz DNA predloška za kopiranje. Kvantifikacijski test Aptima HCV Dx koristi TMA metodu za amplifikaciju dijela 5' UTR HCV genoma. Amplifikacija ove regije postiže se korištenjem specifičnih primera koji su dizajnirani za amplifikaciju HCV genotipova 1, 2, 3, 4, 5 i 6.

Otkrivanje se postiže uporabom izvora svjetlosti u obliku jednolančanih nukleinskih kiselina koji su prisutni tijekom amplifikacije ciljne sekvence i koji se specifično hibridiziraju s amplikonom u stvarnom vremenu. Svaki izvor svjetlosti sadržava fluorofor i gasitelj. Kada izvor svjetlosti nije hibridiziran s amplikonom, gasitelj se nalazi u neposrednoj blizini fluorofora i potiskuje fluorescenciju. Kada se izvor svjetlosti veže za amplikon, gasitelj se udaljava od fluorofora i emitirat će signal na određenoj valnoj duljini kada ga pobudi izvor svjetlosti. Kako se više izvora svjetlosti hibridizira s amplikonom, generira se jači fluorescentni signal. Vrijeme potrebno da fluorescentni signal dosegne određeni prag proporcionalno je početnoj koncentraciji virusa HCV. Svaka reakcija ima interni kalibrator / internu kontrolu (engl. *internal calibrator/internal control*, IC) za kontrolu varijacija u obradi, amplifikaciji i otkrivanju ispitka. Koncentraciju uzorka određuje softver sustava Panther koristeći HCV i IC signale za svaku reakciju i uspoređujući ih s podacima o kalibraciji.

Sažetak o sigurnosti i učinkovitosti

SSP (sažetak o sigurnosti i učinkovitosti, engl. *Summary of Safety and Performance*) dostupan je u europskoj bazi podataka o medicinskim uređajima (Eudamed), gdje je povezan s identifikatorima uređaja (osnovni UDI-DI). Kako biste pronašli SSP za kvantifikacijski test Aptima HCV Dx, poslužite se osnovnim jedinstvenim identifikatorom proizvoda (BUDI): 54200455DIAGAPTHCVAJ.

Upozorenja i mjere opreza

A. Za *in vitro* dijagnostičku uporabu.

B. Za profesionalnu uporabu.

C. Kako biste smanjili rizik od nevaljanih rezultata, prije izvođenja testa na sustavu Panther pažljivo pročitajte cijelu uputu i *Priručnik za rukovatelja sustavom Panther / Panther Fusion*™ za informacije o postupku.

D. Za dodatna specifična upozorenja, mjere opreza i postupke za kontrolu kontaminacije pogledajte *Priručnik za rukovatelja sustavom Panther / Panther Fusion.*

U vezi s laboratorijem

E. OPREZ: Kontrole za ovaj test sadržavaju ljudsku plazmu. Plazma ne reagira na površinski antigen hepatitisa B (HBsAg), protutijela na HCV, protutijela na HIV-1 i HIV-2 te HIV antigen kada se testira pomoću postupaka koje je odobrila Američka agencija za hranu i lijekove (FDA). Osim toga, plazma ne reagira na RNA HCV-a i RNA virusa HIV-1 kada se testira licenciranim testovima nukleinskih kiselina primjenom skupnih uzoraka. Sav materijal dobiven iz ljudske krvi treba smatrati potencijalno zaraznim i s njim treba postupati uz pridržavanje univerzalnih mjera opreza.[14,15,16]

F. Samo osoblje koje je odgovarajuće osposobljeno za uporabu kvantifikacijskog testa Aptima HCV Dx i za rukovanje potencijalno zaraznim materijalima smije provoditi ovaj postupak. Ako dođe do izlijevanja, odmah na licu mjesta dezinficirajte odgovarajućim postupcima.

G. Upotrebljavajte samo isporučene ili određene jednokratne laboratorijske proizvode.

H. Pridržavajte se rutinskih laboratorijskih mjera opreza. Nemojte pipetirati ustima. Nemojte jesti, piti ili pušiti u označenim radnim područjima. Prilikom rukovanja ispitcima i reagensima iz kompleta nosite jednokratne rukavice bez pudera, zaštitne naočale i laboratorijsku kutu. Nakon rukovanja ispitcima i reagensima iz kompleta temeljito operite ruke.

I. Radne površine, pipete i drugu opremu potrebno je redovito dekontaminirati otopinom natrijeva hipoklorita od 2,5 % do 3,5 % (0,35 M do 0,5 M).

J. Zbrinite sve materijale koji su došli u kontakt s ispitcima i reagensima u skladu s lokalnim, državnim i saveznim propisima.[14,15,16,17] Temeljito očistite i dezinficirajte sve radne površine.

K. Kontrole sadržavaju natrijev azid kao konzervans. Nemojte upotrebljavati metalne cijevi za prijenos reagensa. Ako se otopine koje sadržavaju spojeve natrijevog azida odlažu u vodovodni sustav, treba ih razrijediti i isprati obilnom količinom tekuće vode. Ove mjere opreza preporučuju se kako bi se izbjeglo nakupljanje naslaga u metalnim cijevima u kojima bi se mogli razviti eksplozivni uvjeti.

L. Dobre standardne prakse za molekularne laboratorije uključuju praćenje stanja okoliša. Za praćenje laboratorijskog okruženja predlaže se postupak naveden u nastavku:
   1. Uzmite vateni štapić i uparite ga s epruvetom za alikvote ispitaka Aptima (SAT).
   2. Označite svaki SAT na odgovarajući način.
   3. Napunite svaku epruvetu SAT s 1 mL razrjeđivača za ispitke Aptima.
   4. Za prikupljanje površinskih uzoraka lagano navlažite štapić deioniziranom vodom bez nukleaze.
   5. Prikupite bris s površine od interesa okomitim pokretima od vrha prema dnu. Dok uzimate bris, štapić zakrećite za otprilike pola okreta.
   6. Uzorak brisa odmah stavite u epruvetu i lagano zavrtite štapić u razrjeđivaču kako biste izvukli potencijalne materijale iz brisa. Pritisnite štapić o bočnu stranu epruvete za prijenos kako biste istisnuli što je više tekućine moguće. Odložite štapić u otpad i začepite epruvetu.
   7. Ponovite korake za preostale uzorke brisa.
   8. Ispitajte bris molekularnim testom.

U vezi s ispitkom

M. Ispitci mogu biti infektivni. Prilikom izvođenja testa pridržavajte se univerzalnih mjera opreza.[14,15,16] Treba utvrditi pravilne metode rukovanja i odlaganja u skladu s lokalnim propisima.[17] Ovaj postupak smije provoditi samo osoblje koje je odgovarajuće obučeno za uporabu kvantifikacijskog testa Aptima HCV Dx i obučeno za rukovanje zaraznim materijalima.

N. Tijekom prijevoza ispitka održavajte odgovarajuće uvjete pohrane kako biste osigurali cjelovitost ispitka. Stabilnost ispitka u uvjetima prijevoza drugačijim od preporučenih nije procijenjena.

O. Izbjegavajte križnu kontaminaciju prilikom izvođenja koraka rukovanja ispitcima. Budite posebno oprezni kako biste izbjegli kontaminaciju širenjem aerosola prilikom otpuštanja ili otvaranja ispitaka. Ispitci mogu sadržavati ekstremno visoke razine organizama. Pobrinite se da se spremnici ispitaka međusobno ne dodiruju, a iskorišteni materijal odložite pazeći da ga ne prenosite preko otvorenih spremnika. Zamijenite rukavice ako dođu u kontakt s ispitkom.

U vezi s testom

P. Nemojte upotrebljavati komplet reagensa, kalibrator ili kontrole nakon isteka roka valjanosti.

Q. Nemojte zamjenjivati, miješati ili kombinirati analitičke reagense iz kompleta s drugim brojevima osnovne serije. Tekućine za ispitivanje mogu biti iz serija s različitim brojevima. Kontrole i kalibrator mogu biti iz serija s različitim brojevima.

R. Izbjegavajte kontaminaciju reagensa mikroorganizmima i nukleazom.

S. Zatvorite i pohranite sve analitičke reagense na propisanim temperaturama. Nepravilno pohranjeni analitički reagensi mogu utjecati na učinkovitost testa. Pogledajte *Zahtjevi za skladištenje reagensa i rukovanje njima* i *Postupak testiranja na sustavu Panther* za više informacija.

T. Nemojte kombinirati nikakve analitičke reagense ili tekućine bez posebnih uputa. Reagense ili tekućine nemojte puniti do vrha. Sustav Panther provjerava razine reagensa.

U. Neki reagensi u ovom kompletu označeni su simbolima rizika i sigurnosti.

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

Informacije o opasnostima za EU	
—	**Amplifikacijski reagens** *MAGNEZIJEV KLORID 60 - 65 %* — H412 – Štetno za vodeni okoliš s dugotrajnim učincima. P273 – Izbjegavati ispuštanje u okoliš. P501 – Odložiti sadržaj/spremnik u odobreni pogon za odlaganje otpada.
—	**Promotorski reagens** *MAGNEZIJEV KLORID 60 – 65 %* — H412 – Štetno za vodeni okoliš s dugotrajnim učincima. P273 – Izbjegavati ispuštanje u okoliš. P501 – Odložiti sadržaj/spremnik u odobreni pogon za odlaganje otpada.
—	**Enzimski reagens** *TRITON X-100 1 – 5 %* *HEPES 1 – 5 %* — H412 – Štetno za vodeni okoliš s dugotrajnim učincima. P273 – Izbjegavati ispuštanje u okoliš. P501 – Odložiti sadržaj/spremnik u odobreni pogon za odlaganje otpada.
	**Kontrole kompleta HCV VL** *NATRIJEV AZID < 1 %* — **OPASNOST** H300 – Smrtonosno ako se proguta. H410 – Vrlo otrovno za vodeni okoliš, s dugotrajnim učincima. P264 – Nakon uporabe temeljito oprati lice, ruke i sve izložene površine kože. P273 – Izbjegavati ispuštanje u okoliš. P301 + P310 – AKO SE PROGUTA: odmah nazvati CENTAR ZA KONTROLU OTROVANJA ili liječnika. P321 – Potrebna je posebna liječnička obrada (vidi dopunske upute za prvu pomoć na ovoj naljepnici). P330 – Isprati usta. P391 – Sakupiti proliveno.
—	**Kalibratori kompleta HCV VL** *HEPES 15 – 20 %* *Lauril sulfat, litijeva sol 5 – 10 %* *Litijev hidroksid, monohidrat 1 – 5 %* *Jantarna kiselina 1 – 5 %* — H412 – Štetno za vodeni okoliš s dugotrajnim učincima. P273 – Izbjegavati ispuštanje u okoliš. P501 – Odložiti sadržaj/spremnik u odobreni pogon za odlaganje otpada.

—	**Otopina za rekonstituciju enzima** *Glicerol 20 – 25 %* *Triton X-100 5 – 10 %* *HEPES 1 – 5 %* — H412 – Štetno za vodeni okoliš s dugotrajnim učincima. P273 – Izbjegavati ispuštanje u okoliš. P501 – Odložiti sadržaj/spremnik u odobreni pogon za odlaganje otpada.
—	**Reagens za hvatanje ciljne sekvence** *HEPES 15 – 20 %* *Lauril sulfat, litijeva sol 5 – 10 %* *Litijev hidroksid, monohidrat 1 – 5 %* *Jantarna kiselina 1 – 5 %* — H412 – Štetno za vodeni okoliš s dugotrajnim učincima. P273 – Izbjegavati ispuštanje u okoliš. P501 – Odložiti sadržaj/spremnik u odobreni pogon za odlaganje otpada.

Zahtjevi za skladištenje reagensa i rukovanje njima

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

Reagens	Skladištenje neotvorenog proizvoda	Otvoreni komplet (rekonstituirani)	
		Skladištenje	Stabilnost
qHCV amplifikacijski reagens	od 2 °C do 8 °C		
qHCV Otopina za rekonstituciju amplifikacije	od 2 °C do 8 °C	od 2 °C do 8 °C	30 dana[a]
qHCV Enzimski reagens	od 2 °C do 8 °C		
qHCV Otopina za rekonstituciju enzima	od 2 °C do 8 °C	od 2 °C do 8 °C	30 dana[a]
qHCV Promotorski reagens	od 2 °C do 8 °C		
qHCV Otopina za rekonstituciju promotora	od 2 °C do 8 °C	od 2 °C do 8 °C	30 dana[a]
qHCV Reagens ciljnog izdvajanja	od 2 °C do 8 °C	od 2 °C do 8 °C	30 dana[a]
qHCV NC CONTROL – (negativna kontrola)	od -15 °C do -35 °C	od 15 °C do 30 °C	Bočica za jednokratnu uporabu Upotrijebiti unutar 24 sata
qHCV LPC CONTROL + (nisko pozitivna kontrola)	od -15 °C do -35 °C	od 15 °C do 30 °C	Bočica za jednokratnu uporabu Upotrijebiti unutar 24 sata
qHCV HPC CONTROL + (visoko pozitivna kontrola)	od -15 °C do -35 °C	od 15 °C do 30 °C	Bočica za jednokratnu uporabu Upotrijebiti unutar 24 sata
qHCV PCAL (pozitivni kalibrator)	od -15 °C do -35 °C	od 15 °C do 30 °C	Bočica za jednokratnu uporabu Upotrijebiti unutar 24 sata

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

B. Neiskorištene rekonstituirane reagense i reagense za izdvajanje ciljne sekvence (TCR) odložite u otpad nakon 30 dana ili nakon isteka roka valjanosti osnovne serije, ovisno o tome što nastupi ranije.

C. Reagensi pohranjeni u sustavu Panther stabilni su 72 sata. Reagensi se mogu postaviti u sustav Panther do 8 puta. Sustav Panther bilježi svako postavljanje reagensa.

D. Nakon odmrzavanja kalibratora otopina mora biti bistra, tj. ne smije biti mutna ni sadržavati talog.

E. Promotorski reagens i rekonstituirani promotorski reagens fotosenzitivni su. Zaštitite te reagense od svjetlosti tijekom skladištenja i pripreme za upotrebu.

Prikupljanje i skladištenje ispitaka

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

Napomena: *Pazite da izbjegnete križnu kontaminaciju tijekom koraka rukovanja uzorkom. Na primjer, bacite upotrijebljeni materijal bez prelaska preko otvorenih epruveta.*

Napomena: *Za skladištenje se preporučuju samo plastične sekundarne epruvete.*

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

- Epruvete koje sadrže antikoagulanse etilendiamintetraoctenu kiselinu (EDTA) ili kiseli citrat dekstroze (ACD) ili
- Epruvete za pripremu plazme (engl. *plasma preparation tubes*, PPT)
- Epruvete sa serumom
- Epruvete za odvajanje seruma (SST-ovi)

Za serum pustite da se formira ugrušak prije daljnje obrade.

A. Prikupljanje ispitka

Puna krv može se čuvati na temperaturi od 2 °C do 30 °C i mora se centrifugirati unutar 6 sati od prikupljanja ispitka. Odvojite plazmu ili serum od nataloženih eritrocita slijedeći upute proizvođača za epruvetu koja se upotrebljava. Plazma ili serum mogu se testirati na sustavu Panther u primarnoj epruveti ili prenijeti u sekundarnu epruvetu poput epruvete za alikvote ispitka Aptima. Za dobivanje reakcijskog volumena od 500 µl minimalni volumen plazme ili seruma za primarne epruvete za prikupljanje iznosi do 1200 µl, a za sekundarne epruvete minimalni volumen iznosi 700 µl. U tablici u nastavku navedeni su zahtjevi za mrtvi volumen za svaku vrstu primarne i sekundarne epruvete.

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

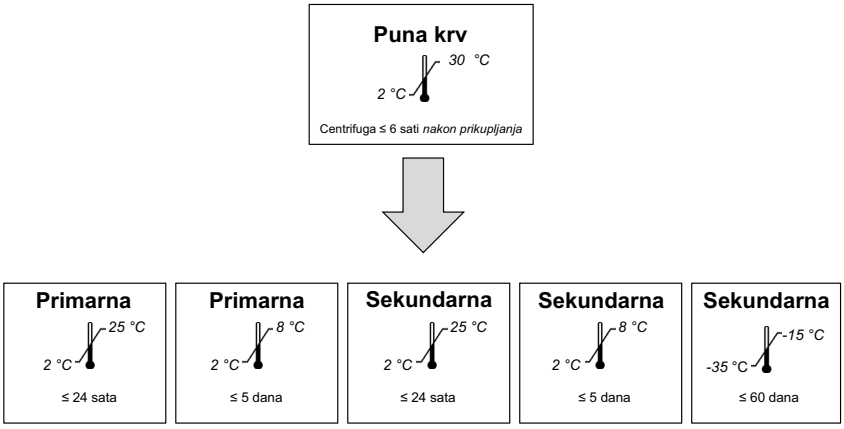
Ako se ne testiraju odmah, plazma ili serum mogu se skladištiti u skladu sa specifikacijama navedenima u nastavku. Ako se prenese u sekundarnu epruvetu, plazma ili serum može se zamrznuti na –20 °C. Nemojte izvesti više od 3 ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja. Ne zamrzavajte ispitke u epruvetama s antikoagulansom EDTA ili ACD ni u primarnim epruvetama za prikupljanje seruma.

B. Uvjeti za skladištenje ispitaka

1. Ispitci plazme s antikoagulansima EDTA i ACD

   Puna krv može se čuvati na temperaturi od 2 °C do 30 °C i mora se centrifugirati unutar 6 sati od prikupljanja ispitka. Plazma se zatim može pohraniti pod jednim od sljedećih uvjeta:

   - U primarnoj ili sekundarnoj epruveti za prikupljanje na temperaturi od 2 °C do 25 °C do 24 sata,
   - U primarnoj ili sekundarnoj epruveti za prikupljanje na temperaturi od 2 °C do 8 °C do 5 dana, ili
   - u sekundarnoj epruveti na -20 °C do 60 dana.

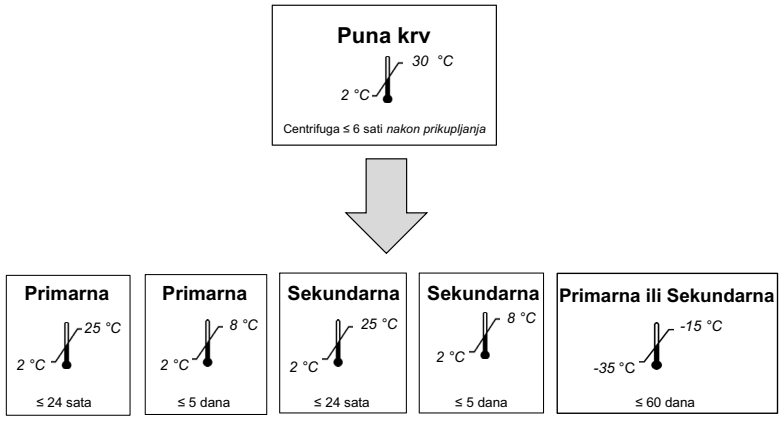


Slika 1. Uvjeti skladištenja za EDTA/ACD epruvete

2. Ispitci u PPT-u

   Puna krv može se čuvati na temperaturi od 2 °C do 30 °C i mora se centrifugirati unutar 6 sati od prikupljanja ispitka. Plazma se zatim može pohraniti pod jednim od sljedećih uvjeta:

   - U primarnoj ili sekundarnoj epruveti za prikupljanje na temperaturi od 2 °C do 25 °C do 24 sata,
   - U primarnoj ili sekundarnoj epruveti za prikupljanje na temperaturi od 2 °C do 8 °C do 5 dana, ili
   - U primarnoj ili sekundarnoj epruveti za prikupljanje na temperaturi od –20 °C do 60 dana.

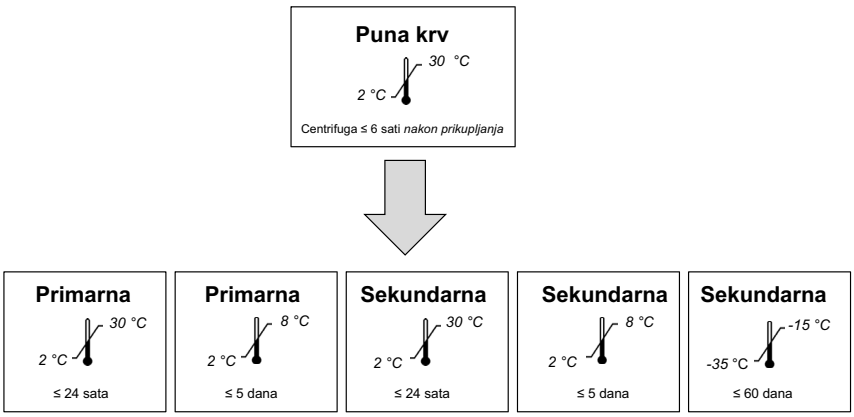


Slika 2. Uvjeti skladištenja za PPT-ove

3. Ispitci u epruveti za serum

   Puna krv može se čuvati na temperaturi od 2 °C do 30 °C i mora se centrifugirati unutar 6 sati od prikupljanja ispitka. Serum se zatim može pohraniti pod jednim od sljedećih uvjeta:

   - u primarnoj epruveti za prikupljanje ili sekundarnoj epruveti na temperaturi od 2 °C do 30 °C do 24 sata
   - u primarnoj ili sekundarnoj epruveti za prikupljanje na temperaturi od 2 °C do 8 °C do 5 dana, ili
   - u sekundarnoj epruveti na -20 °C do 60 dana.

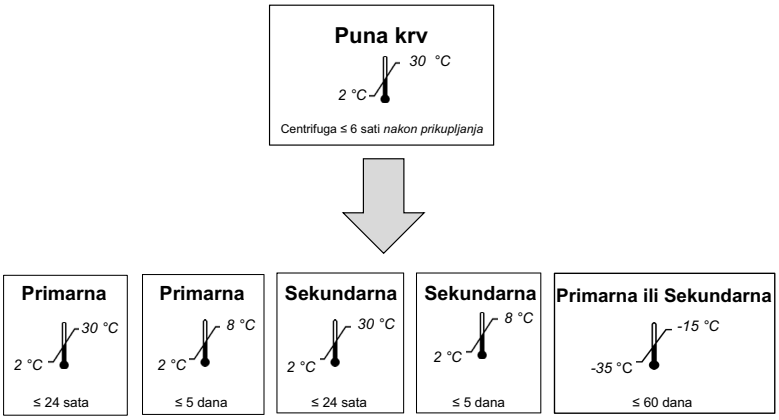


Slika 3. Uvjeti skladištenja za epruvete za serum

4. Ispitci u SST-u

   Puna krv može se čuvati na temperaturi od 2 °C do 30 °C i mora se centrifugirati unutar 6 sati od prikupljanja ispitka. Serum se zatim može pohraniti pod jednim od sljedećih uvjeta:

   - u primarnoj epruveti za prikupljanje ili sekundarnoj epruveti na temperaturi od 2 °C do 30 °C do 24 sata
   - u primarnoj ili sekundarnoj epruveti za prikupljanje na temperaturi od 2 °C do 8 °C do 5 dana, ili
   - u primarnoj ili sekundarnoj epruveti za prikupljanje na temperaturi od –20 °C do 60 dana.



Slika 4. Uvjeti skladištenja za SST-ove

C. Dugotrajno skladištenje u zamrzivaču

Uzorci plazme ili seruma mogu se čuvati na temperaturi od –65 °C do –70 °C do 60 dana u SAT-ovima.

D. Razrjeđivanje ispitaka plazme i seruma

Ispitci plazme i seruma mogu se razrijediti u SAT-u ili sekundarnoj epruveti za testiranje na sustavu Panther. Za više informacija pogledajte u nastavku *Postupak testiranja na sustavu Panther*, korak E.6.

⚠ *Dijagnostičko tumačenje ne bi trebalo provoditi na temelju rezultata „Not Detected" (Nije detektirano) za razrijeđene ispitke seruma ili plazme. Uzmite novi nerazrijeđeni ispitak i ponovno testirajte.*

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

Uzorci na sustavu Panther

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

Transport ispitaka

Održavajte uvjete za skladištenje uzoraka kako je opisano u odjeljku *Prikupljanje i skladištenje ispitaka.*

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

Sustav Panther

U nastavku su navedeni reagensi za kvantifikacijski test Aptima HCV Dx za sustav Panther. Pored naziva reagensa navedeni su i identifikacijski simboli reagensa.

Isporučeni reagensi i materijali

Komplet za kvantifikacijski test Aptima HCV Dx, 100 testova, kat. br. PRD-03506
(1 kutija testova, 1 komplet kalibratora i 1 komplet kontrola)

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

Kutija kvantifikacijskih testova Aptima HCV Dx
(nakon primitka čuvajte na 2 °C do 8 °C)

Simbol	Komponenta	Količina
A	**qHCV amplifikacijski reagens** *Neinfektivne nukleinske kiseline osušene u puferiranoj otopini.*	1 bočica
E	**qHCV enzimski reagens** *Reverzna transkriptaza i RNA polimeraza osušene u otopini tretiranoj puferom HEPES.*	1 bočica
PRO	**qHCV promotorski reagens** *Neinfektivne nukleinske kiseline osušene u puferiranoj otopini.*	1 bočica
AR	**qHCV otopina za rekonstituciju amplifikacije** *Vodena otopina koja sadržava glicerol i konzervanse.*	1 x 7,2 mL
ER	**qHCV otopina za rekonstituciju enzima** *Otopina tretirana puferom HEPES koja sadržava površinski aktivnu tvar i glicerol.*	1 x 5,8 mL
PROR	**qHCV otopina za rekonstituciju promotora** *Vodena otopina koja sadržava glicerol i konzervanse.*	1 x 4,5 mL
TCR	**qHCV reagens ciljnog izdvajanja** *Nukleinske kiseline u puferiranoj otopini soli koja sadržava krutu fazu, neinfektivne nukleinske kiseline i interni kalibrator.*	1 x 72,0 mL
	Prstenovi za rekonstituciju	3
	List s crtičnim kodovima osnovne serije	1 list

Komplet kalibratora za kvantifikacijski test Aptima HCV Dx (kat. br. PRD-03507)
(nakon primitka čuvajte na –15 °C do –35 °C)

Simbol	Komponenta	Količina
PCAL	**qHCV pozitivni kalibrator** *Transkript u puferiranoj otopini.*	5 x 2,5 mL
	Naljepnica s crtičnim kodom kalibratora	—

Komplet kontrola za kvantifikacijski test Aptima HCV Dx (kat. br. PRD-03508)
(nakon primitka čuvajte na –15 °C do –35 °C)

Simbol	Komponenta	Količina
NC	**qHCV negativna kontrola** *Defibrinirana ljudska plazma negativna na HCV koja sadržava gentamicin i 0,2 % natrijeva azida kao konzervanse.*	5 × 0,8 mL
LPC	**qHCV nisko pozitivna kontrola** *Neinfektivni HCV Armored RNA u defibriniranoj ljudskoj plazmi koja sadržava gentamicin i 0,2 % natrijeva azida kao konzervanse.*	5 × 0,8 mL
HPC	**qHCV visoko pozitivna kontrola** *Neinfektivni HCV Armored RNA u defibriniranoj ljudskoj plazmi koja sadržava gentamicin i 0,2 % natrijeva azida kao konzervanse.*	5 × 0,8 mL
	Naljepnica s crtičnim kodom kontrole	—

Potrebni materijali koji su dostupni zasebno

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

Materijal	Kat. br.
Sustav Panther™	303095
Sustav Panther Fusion™	PRD-04172
Sustav Panther™ , značajka za kontinuiranu izmjenu tekućina i pražnjenje otpada (Panther Plus)	PRD-06067
Komplet kontrola za kvantifikacijski test Aptima® HCV Dx	PRD-03508
Komplet kalibratora za kvantifikacijski test Aptima® HCV Dx	PRD-03507
Komplet Panther za izvođenje testova u stvarnom vremenu (samo za testove u stvarnom vremenu)	PRD-03455 (5000 testova)
Komplet testnih tekućina Aptima® (naziva se i kompletom univerzalnih tekućina) *sadržava otopinu za ispiranje Aptima®, pufer za deaktivacijsku tekućinu Aptima® i uljni reagens Aptima®*	303014 (1000 testova)
Jedinice za više epruveta (engl. multi-tube units*, MTU)*	104772-02
Komplet vrećica za otpad Panther™	902731
Poklopac koša za otpad Panther™	504405
Ili komplet za izvođenje testova na sustavu Panther™ *(kada se TMA testovi koji nisu u stvarnom vremenu izvode istovremeno s TMA testovima u stvarnom vremenu) sadržava MTU-ove, vrećice za otpad, poklopce koša za otpad, sustav za automatsko otkrivanje i testne tekućine*	303096 (5000 testova)
Vrhovi, 1000 µL, filtrirani, s mogućnosti mjerenja razine tekućine, vodljivi i za jednokratnu uporabu *Nisu svi proizvodi dostupni u svim regijama. Obratite se svojem predstavniku za informacije specifične za regiju.*	901121 (10612513 Tecan) 903031 (10612513 Tecan) MME-04134 (30180117 Tecan) MME-04128
Izbjeljivač, od 5 % do 8,25 % (od 0,7 M do 1,16 M) otopine natrijeva hipoklorita	—

Materijal	Kat. br.
Rukavice za jednokratnu uporabu bez pudera	—
Zamjenski neprobojni čepovi	103036A
Zamjenski čepovi za reagense	
Bočice za rekonstituciju reagensa za amplifikaciju, enzimskog reagensa i promotorskog reagensa	CL0041 (100 čepova)
Bočica reagensa TCR	CL0040 (100 čepova)
Pokrovi s plastičnom poleđinom za radne površine u laboratoriju	—
Maramice koje ne ostavljaju dlačice	—
Pipetor	—
Vrhovi	—
Opcije epruveta za prikupljanje primarnih ispitaka:	
13 mm x 100 mm	—
13 mm x 75 mm	—
16 mm x 100 mm	—
Centrifuga	—
Vorteks miješalica	—

Opcionalni materijali

Materijal	Kat. br.
Opcije za sekundarne epruvete:	
12 mm x 75 mm	—
13 mm x 100 mm	—
16 mm x 100 mm	—
Epruvete za alikvote ispitaka (SAT) Aptima (pakiranje od 100 komada)	FAB-18184
Čep za epruvetu za prijenos (pakiranje od 100 komada) *čep za SAT*	504415
Razrjeđivač za ispitke Aptima®	PRD-03003
Komplet razrjeđivača za ispitke Aptima® *sadržava razrjeđivač za ispitke, 100 SAT-ova i 100 čepova*	PRD-03478
Pipete za prijenos	—
Komercijalno dostupni paneli	—
Vateni štapići	—
Klackalica epruvete	PRD-03488

Postupak testiranja na sustavu Panther

Napomena: *Dodatne informacije o postupku potražite u Priručniku za rukovatelja sustavom Panther / Panther Fusion.*

A. Priprema radnog prostora

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

B. Priprema kalibratora i kontrola

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

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

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

   Napomena: *Izbjegavajte stvaranje prekomjerne pjene prilikom preokretanja kalibratora i kontrola. Pjena ometa mjerenje razine sustavom Panther.*
2. Kada se sadržaj epruvete odmrzne, osušite vanjski dio epruvete čistom suhom maramicom za jednokratnu uporabu.
3. U tom trenutku nemojte otvarati epruvete kako ne bi došlo do kontaminacije.

C. Rekonstitucija reagensa / priprema novog kompleta

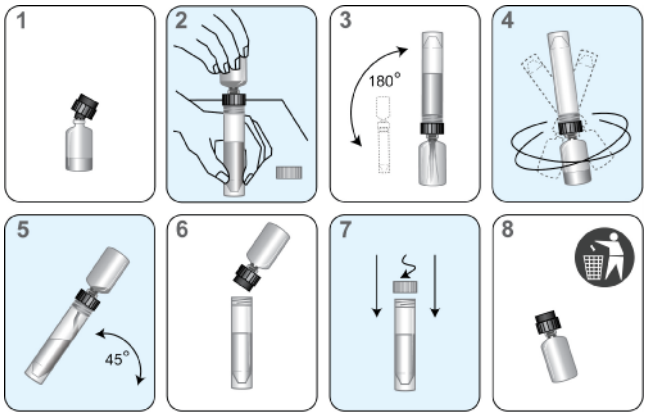
Napomena: *Rekonstituciju reagensa potrebno je provesti prije početka rada na sustavu Panther.*

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

      Opcija. Bočica TCR-a može se pripremiti na klackalici epruvete slijedeći upute u nastavku: Izvadite TCR iz skladišta (od 2 °C do 8 °C) i odmah snažno protresite 10 puta. Stavite bočicu TCR-a u klackalicu epruvete i ostavite TCR da se zagrije na temperaturi od 15 °C do 30 °C najmanje 45 minuta.
   c. Prije upotrebe provjerite je li sav talog u otopini i jesu li magnetske čestice suspendirane.

2. Za rekonstituciju reagensa za amplifikaciju, enzimskog reagensa i promotorskog reagensa izvedite sljedeće:
   a. Izvadite liofilizirane reagense i odgovarajuće otopine za rekonstituciju iz skladišta (od 2 °C do 8 °C). Svaku otopinu za rekonstituciju uparite s njezinim liofiliziranim reagensom.
   b. Provjerite podudaraju li se boje oznaka na otopini za rekonstituciju i liofiliziranom reagensu. Provjerite brojeve serija na listu crtičnih kodova osnovne serije kako biste se uvjerili da ste uparili odgovarajuće reagense.
      i. Otvorite bočicu s liofiliziranim reagensom uklanjanjem metalne brtve i gumenog čepa.
      ii. Kraj prstena za rekonstituciju s urezima (crni) čvrsto umetnite na bočicu (slika 5, korak 1).
      iii. Otvorite odgovarajuću bočicu otopine za rekonstituciju i čep stavite na čistu, prekrivenu radnu površinu.
      iv. Bočicu s otopinom za rekonstituciju postavite na stabilnu površinu (tj. stol). Zatim preokrenite bočicu s liofiliziranim reagensom iznad bočice s otopinom za rekonstituciju i čvrsto pričvrstite prsten na bočicu s otopinom za rekonstituciju (slika 5, korak 2).
      v. Polako preokrenite sastavljene bočice (bočicu pričvršćenu na bočicu s otopinom) kako biste omogućili da se otopina iscijedi u staklenu bočicu (slika 5, korak 3).
      vi. Podignite sastavljene bočice i miješajte ih kružnim pokretima najmanje 10 sekundi (slika 5, korak 4).
      vii. Pričekajte najmanje 30 minuta da liofilizirani reagens prijeđe u otopinu.
      viii. Nakon što liofilizirani reagens prijeđe u otopinu, miješajte sastavljene bočice kružnim pokretima najmanje 10 sekundi, a zatim lagano protresite otopinu unutar staklene bočice naprijed-natrag kako biste je dobro promiješali.
   c. Polako ponovno nagnite sastavljene bočice kako biste omogućili da se sva otopina iscijedi natrag u bočicu s otopinom za rekonstituciju (slika 5, korak 5).
   d. Oprezno uklonite prsten za rekonstituciju i staklenu bočicu (slika 5, korak 6).
   e. Ponovno začepite bocu. Zabilježite inicijale rukovatelja i datum rekonstitucije na naljepnici (slika 5, korak 7).
   f. Odložite prsten za rekonstituciju i staklenu bočicu u otpad (slika 5, korak 8).

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



Slika 5. Postupak rekonstitucije reagensa

D. Priprema reagensa za prethodno pripremljene reagense

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

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

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

E. Rukovanje ispitkom

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

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

⚠ *Dijagnostičko tumačenje ne bi trebalo provoditi na temelju rezultata „Not Detected" (Nije detektirano) za razrijeđene ispitke seruma ili plazme. Uzmite novi nerazrijeđeni ispitak i ponovno testirajte.*

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

a. Razrjeđivanje ispitaka s malim volumenom

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

   i. Stavite 240 µL ispitka u SAT.

   ii. Dodajte 480 µL razrjeđivača za ispitke Aptima.

   iii. Začepite epruvetu.

   iv. Lagano preokrenite 5 puta da biste promiješali.

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

b. Razrjeđivanje ispitaka visokog titra

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

i. Stavite 30 µL ispitka u SAT ili sekundarnu epruvetu.

ii. Dodajte 2970 µL razrjeđivača za ispitke Aptima.

iii. Začepite epruvetu.

iv. Lagano preokrenite 5 puta da biste promiješali.

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

Napomena: *Za razrijeđene ispitke čije su nerazrijeđene koncentracije veće od gornje granice kvantifikacije (ULoQ) rezultati će biti prikazani u znanstvenom zapisu.*

6. Neposredno prije postavljanja ispitaka u stalak za uzorke centrifugirajte svaki ispitak na 1000 do 3000 *g* 10 minuta. Ne skidajte čepove. Mjehurići u epruveti ometaju očitavanje razine na sustavu Panther.

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

F. Priprema sustava

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

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

   b. Stavite epruvetu s uzorkom u stalak za uzorke.

   c. Ponovite korake 2.a i 2.b za svaki preostali uzorak.

   d. Nakon što se uzorci postave u stalak za uzorke, uklonite i bacite svaki čep epruvete s uzorkom u jednom stalku za uzorke. Kako biste izbjegli kontaminaciju, nemojte prenositi čep preko drugih stalaka za uzorke ili epruveta za uzorke.

   e. Ako je potrebno, upotrijebite novu pipetu za prijenos za jednokratnu uporabu kako biste uklonili mjehuriće ili pjenu.

   f. Kada se ukloni posljednji čep, umetnite stalak za uzorke u odjeljak za uzorke.

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

   g. Ponovite korake od 2.a do 2.f za sljedeći stalak za uzorke.

Napomene o postupku

A. Kalibrator i kontrole

1. Epruvete s qHCV pozitivnim kalibratorom, qHCV nisko pozitivnom kontrolom, qHCV visoko pozitivnom kontrolom i qHCV negativnom kontrolom mogu se umetnuti u bilo koji položaj na stalku za uzorke i u bilo koji utor odjeljka za uzorke na sustavu Panther. Pipetiranje uzoraka započet će kada je zadovoljen jedan od sljedećih dvaju uvjeta:
   a. Sustav trenutačno obrađuje kalibrator i kontrole.
   b. U sustavu su registrirani važeći rezultati za kalibrator i kontrole.
2. Kada se epruveta s kalibratorom i kontrolne epruvete pipetiraju i obrađuju za komplet reagensa kvantifikacijskog testa Aptima HCV Dx, ispitci se mogu testirati s pomoću pridruženog rekonstituiranog kompleta do 24 sata, **osim** u sljedećim slučajevima:
   a. Rezultat kalibratora ili rezultati kontrola nevaljani su.
   b. Pridruženi komplet analitičkog reagensa uklanja se iz sustava.
   c. Pridruženi komplet analitičkog reagensa premašio je granice stabilnosti.
3. Epruvetu kalibratora i svaku kontrolnu epruvetu moguće je upotrijebiti samo jednom. Pokušaji uporabe epruvete više od jednom mogu dovesti do pogrešaka pri obradi.

B. Puder iz rukavica

Kao i kod svakog drugog sustava reagensa, višak pudera na nekim rukavicama može uzrokovati kontaminaciju otvorenih epruveta. Preporučuje se uporaba rukavica bez pudera.

Kontrola kvalitete

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

Kalibracija testa

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

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

Negativne i pozitivne kontrole

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

Tijekom obrade softver sustava Panther automatski provjerava kriterije za prihvaćanje kontrola. Za generiranje valjanih rezultata negativna kontrola mora dati rezultat „Not Detected” (Nije detektirano), a pozitivne kontrole moraju dati rezultate unutar unaprijed definiranih parametara (nazivni cilj za LPC: 2,36 $\log_{10}$ IU/mL, nazivni cilj za HPC: 5,36 $\log_{10}$ IU/mL). Ako bilo koja od kontrola ima nevaljani rezultat, softver automatski poništava ciklus. Uzorci u poništenom ciklusu moraju se ponovno testirati primjenom svježe pripremljenog kalibratora i svježe pripremljenih kontrola.

Interni kalibrator / interna kontrola

Svaki uzorak sadržava interni kalibrator / internu kontrolu (IC). Tijekom obrade kriteriji prihvatljivosti IC-a automatski se provjeravaju u softveru sustava Panther. Ako je rezultat IC-a nevažeći, rezultat uzorka poništava se. Svaki uzorak s nevažećim rezultatom IC-a mora se ponovno testirati kako bi se dobio valjan rezultat.

Softver sustava Panther osmišljen je za preciznu provjeru procesa kada se postupci izvode slijedeći naputke iz ove upute i *Priručnika za rukovatelja sustavom Panther* / *Panther Fusion*.

Tumačenje rezultata

Sustav Panther automatski određuje koncentraciju HCV RNA za ispitke i kontrole usporedbom rezultata s kalibracijskom krivuljom. Koncentracije HCV RNA-a prikazane su u IU/mL i $\log_{10}$ IU/mL. Tumačenje rezultata navedeno je u Tablica 1. Ako se za razrijeđene ispitke upotrebljava razrjeđenje 1 : 3 ili 1 : 100, sustav Panther automatski izračunava koncentraciju HCV RNA-a za nerazrijeđeni ispitak množenjem razrijeđene koncentracije s faktorom razrjeđivanja, a razrijeđeni ispitci označavaju se kao razrijeđeni.

Napomena: *Za razrijeđene ispitke rezultati navedeni kao „Not Detected" (Nije detektirano) ili „<10 detected" (Detektirano < 10) mogu se dobiti razrjeđivanjem ispitka s koncentracijom iznad, ali blizu granice detekcije (LoD) ili donje granice kvantifikacije (LLoQ). Preporučuje se prikupljanje i testiranje drugog nerazrijeđenog ispitka ako se ne dobije kvantitativni rezultat.*

Sustav Panther ne daje kvalitativni rezultat (tj. „Reactive" (Reaktivno) ili „Non-reactive" (Nereaktivno)) za dijagnostičku upotrebu. Rukovatelj mora protumačiti prijavljenu koncentraciju HCV RNA-a kao kvalitativni rezultat (Tablica 1). Ispitci čiji su rezultati navedeni kao „Not Detected" (Nije otkriveno) nisu reaktivni na HCV RNA. Ispitci s rezultatima navedenim kao „< 10 otkriveno" s rezultatima navedenim unutar linearnog raspona i > 100.000.000 (gornja granica kvantifikacije) ukazuju na to da je otkrivena HCV RNA i da su ti ispitci reaktivni na HCV RNA.

Tablica 1: Tumačenje rezultata

Prijavljeni rezultat kvantifikacijskog testa Aptima HCV Dx		**Tumačenje koncentracije HCV RNA-a**	**Korisničko dijagnostičko kvalitativno tumačenje[a]**
IU/mL	**$\log_{10}$ vrijednost[b]**		
Nije detektirano	Nije detektirano	HCV RNA nije detektiran.	Nije reaktivno na HCV RNA
< 10 detektirano	< 1,00	HCV RNA je detektiran, ali ispod razine LLoQ-a	Reaktivno na HCV RNA
Od 10 do 100.000.000	Od 1,00 do 8,00	Koncentracija HCV RNA-a je unutar linearnog raspona od 10 do 100.000.000 IU/mL.	Reaktivno na HCV RNA
> 100.000.000	> 8,00	Koncentracija HCV RNA-a je iznad ULoQ-a	Reaktivno na HCV RNA
Nevaljano[c]	Nevaljano[c]	Došlo je do pogreške u generiranju rezultata. Potrebno je ponovo testirati ispitak	Nevaljano

[a] Dijagnostičko tumačenje može se napraviti iz ispitaka seruma ili plazme koji nisu razrijeđeni.
[b] Vrijednost se skraćuje na dvije decimale.
[c] Nevaljani rezultati prikazani su fontom u plavoj boji.

Kriteriji prihvatljivosti za svaku od kontrola kvantifikacijskog testa Aptima HCV Dx navedeni su u Tablica 2.

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

Tablica 2: Kriteriji prihvatljivosti za raspon iskoristivosti kontrola kvantifikacijskog testa Aptima HCV Dx

Komponenta	**Raspon iskoristivosti za valjane cikluse**
Negativna kontrola	N/P
Nisko pozitivna kontrola	+/– 0,5 $\log_{10}$ IU/mL
Visoko pozitivna kontrola	+/– 0,5 $\log_{10}$ IU/mL

Ograničenja

A. Uporaba ovog testa ograničena je na osoblje koje je obučeno za postupak. Neuspješno praćenje uputa navedenih u ovoj uputi u pakiranju može rezultirati pogrešnim rezultatima.

B. Pouzdani rezultati ovise o primjerenom prikupljanju, prijenosu, skladištenju i obradi ispitaka.

C. Iako su rijetke, mutacije unutar visoko očuvanih regija virusnog genoma pokrivenih početnicama i/ili sondama u kvantifikacijskom testu Aptima HCV Dx mogu rezultirati neuspjehom u detekciji virusa.

Analitička učinkovitost

Granica detekcije (LoD) primjenom 2. međunarodnog standarda SZO-a

Granica detekcije (LoD) testa definirana je kao koncentracija HCV RNA-a koja se otkriva s vjerojatnošću od 95 % ili većom prema dokumentu EP17-A2 instituta CLSI.[18]

LoD je određen testiranjem panela 2. međunarodnog standarda SZO-a za RNA virusa hepatitisa C (NIBSC 96/798 genotip 1) razrijeđenog u ljudskoj plazmi s EDTA-om i serumu negativnima na HCV. Testirano je najmanje 36 replikata svakog razrjeđenja sa svakom od tri serije reagensa za ukupno minimalno 108 replikata po razrijeđenoj otopini. Probit analiza je provedena kako bi se generirale predviđene granice detekcije. Vrijednosti LoD-a rezultati su serije reagensa s najvišom predviđenom granicom detekcije. LoD od 95 % za kvantifikacijski test Aptima HCV Dx primjenom 2. međunarodnog standarda SZO-a iznosi 4,3 IU/mL za plazmu i 3,9 IU/mL za serum.

Granica detekcije među genotipovima HCV-a

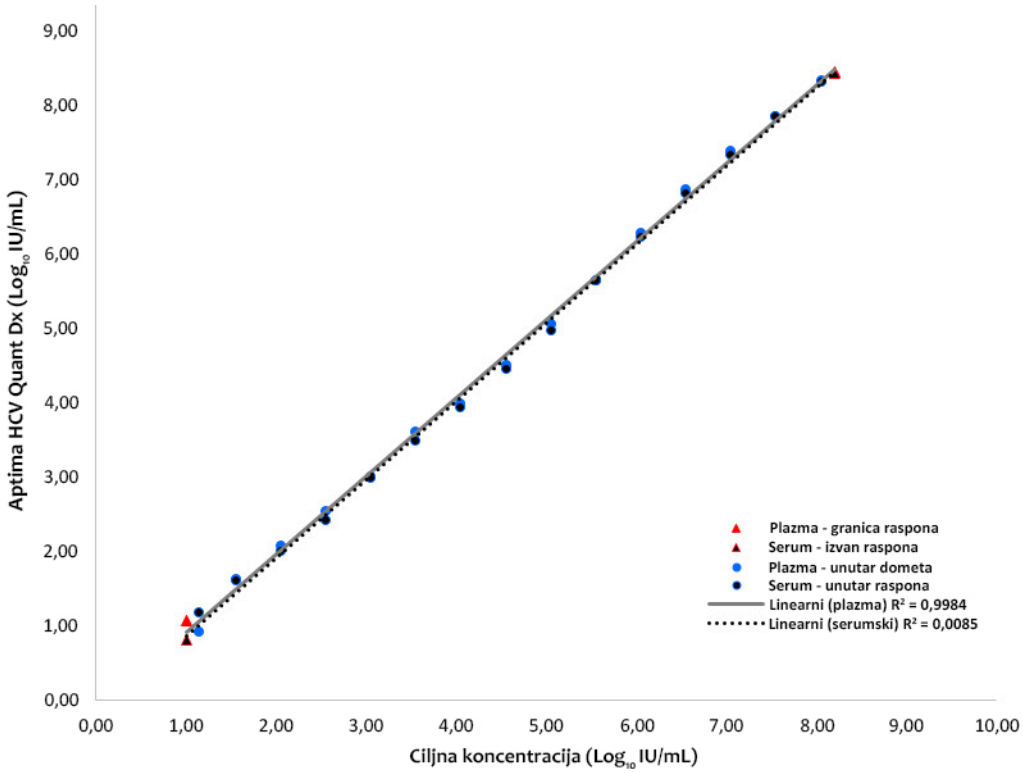
LoD je određen testiranjem razrjeđenja HCV pozitivnih kliničkih uzoraka za genotipove 1, 2, 3, 4, 5 i 6 u HCV negativnoj ljudskoj plazmi i serumu. Koncentracije su određene odobrenim testom. Testirano je najmanje 20 replikata svake sastavnice panela sa svakom od tri serije reagensa za minimalno 60 replikata po sastavnici panela. Probit analiza provedena je kako bi se generirale predviđene granice detekcije od 95 %. Vrijednosti LoD-a prikazane u Tablica 3 rezultati su iz serije reagensa s najvišom predviđenom granicom detekcije.

Tablica 3: Granica detekcije među genotipovima HCV-a uz primjenu kliničkih ispitaka

Genotip	Predviđena granica detekcije	Koncentracija (IU/mL)	
		Plazma	Serum
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

Linearni raspon

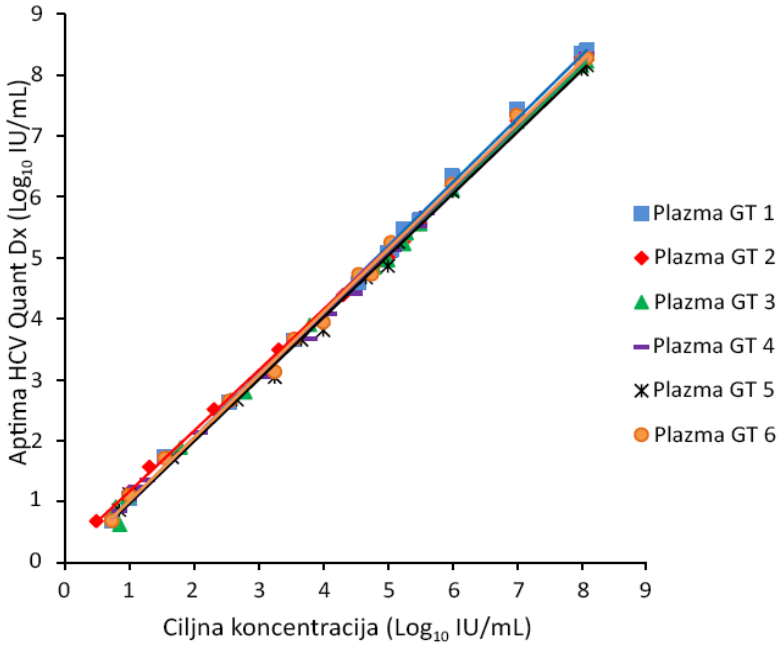
Linearni raspon utvrđen je testiranjem panela HCV 1a Armored RNA (aRNA) razrijeđenih u HCV negativnoj ljudskoj plazmi i serumu prema dokumentu CLSI EP06-A.[19] Paneli su imali raspon koncentracija od 1,0 log_{10} IU/mL do 8,2 log_{10} IU/mL. Kvantifikacijski test Aptima HCV Dx pokazao je linearnost u cijelom testiranom rasponu, s gornjom granicom kvantifikacije (ULoQ) od 8,0 log_{10} IU/mL, kako je prikazano na slika 6.



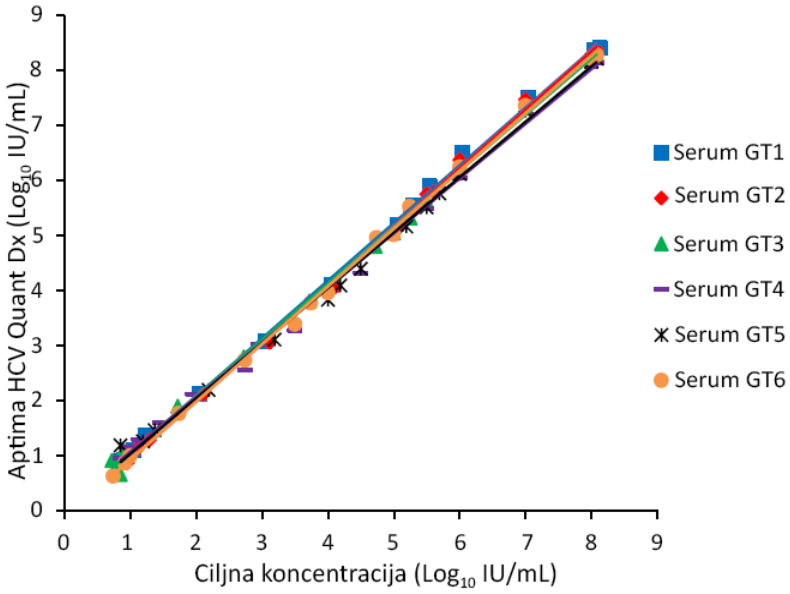
Slika 6. Linearnost u plazmi i serumu

Linearnost među genotipovima HCV-a

Linearnost i linearni raspon genotipova HCV-a od 1 (1a za plazmu i 1b za serum) do 6 utvrđeni su testiranjem razrijeđenih pojedinačnih klinički pozitivnih uzoraka, po jednog za svaki genotip HCV-a za donji raspon testa u kombinaciji s aRNA-om (HCV 1a) za gornji raspon testa (iznad 100.000 IU/mL). Razrjeđenja u negativnoj ljudskoj plazmi i serumu testirana su za sve genotipove. Linearnost je dokazana za svih šest genotipova u testiranom rasponu kao što je prikazano na slika 7 za plazmu i slika 8 za serum.



Slika 7. Linearni raspon i linearnost (plazma)



Slika 8. Linearni raspon i linearnost (serum)

Donja granica kvantifikacije primjenom 2. međunarodnog standarda SZO-a

Donja granica kvantifikacije (LLoQ) definirana je kao najniža koncentracija pri kojoj se HCV RNA pouzdano kvantificira unutar ukupne pogreške, prema dokumentu CLSI EP17-A2.[18] Ukupna pogreška procijenjena je na dva načina: ukupna analitička pogreška (TAE) = |sustavno odstupanje| + 2 SD te ukupna pogreška (TE) = SQRT(2) × 2 SD. Kako bi se osigurale točnost i preciznost mjerenja, ukupna pogreška kvantifikacijskog testa Aptima HCV Dx postavljena je na 1 $\log_{10}$ IU/mL (tj. pri LLoQ-u, razlika između dvaju mjerenja veća od 1 $\log_{10}$ IU/mL statistički je značajna).

LLoQ je određen testiranjem panela 2. međunarodnog standarda SZO-a za RNA virusa hepatitisa C (NIBSC 96/798 genotip 1) razrijeđenog u HCV negativnoj ljudskoj plazmi i serumu. Trideset i šest (36) replikata svakog razrjeđenja testirano je sa svakom od triju serija reagensa za minimalno 108 replikata po razrjeđenju. Rezultati iz serije reagensa s najvećom koncentracijom jednakom ili većom od LoD-a i koja zadovoljava zahtjeve za TE i TAE prikazani su u Tablica 4 za plazmu i Tablica 5 za serum. LLoQ za 2. međunarodni standard SZO-a iznosi 7 IU/mL (0,82 $\log_{10}$ IU/mL) za plazmu i 9 IU/mL (0,93 $\log_{10}$ IU/mL) za serum, kako je sažeto u Tablica 6. LLoQ je utvrđen za sve genotipove (pogledajte odjeljak *Određivanje donje granice kvantifikacije (LLoQ) za sve genotipove HCV-a*). Ovi podaci o genotipu utvrđuju ukupni LLoQ za test od 10 IU/mL.

Tablica 4: LLoQ primjenom 2. međunarodnog standarda SZO-a za HCV razrijeđen u plazmi

Serija reagensa	Kvantifikacijski test Aptima HCV Dx	Kvantifikacijski test Aptima HCV Dx	SD	Sustavno odstupanje	Izračunati TE	Izračunati TAE
	(IU/mL)	($\log_{10}$ IU/mL)	($\log_{10}$ IU/mL)	($\log_{10}$ IU/mL)	($\log_{10}$ IU/mL)	($\log_{10}$ IU/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

SD = standardna devijacija

Tablica 5: LLoQ primjenom 2. međunarodnog standarda SZO-a za HCV razrijeđen u serumu

Serija reagensa	Kvantifikacijski test Aptima HCV Dx	Kvantifikacijski test Aptima HCV Dx	SD	Sustavno odstupanje	Izračunati TE	Izračunati TAE
	(IU/mL)	($\log_{10}$ IU/mL)	($\log_{10}$ IU/mL)	($\log_{10}$ IU/mL)	($\log_{10}$ IU/mL)	($\log_{10}$ IU/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

SD = standardna devijacija

Tablica 6: Sažetak LLoQ-a primjenom 2. međunarodnog standarda SZO-a za HCV

Serija reagensa	LLoQ za plazmu		LLoQ za serum	
	IU/mL	log_{10} IU/mL	IU/mL	log_{10} IU/mL
1	5	0,73	8	0,93
2	7	0,82	8	0,89
3	6	0,76	5	0,71

Određivanje donje granice kvantifikacije (LLoQ) za sve genotipove HCV-a

LLoQ je određen testiranjem razrjeđenja HCV pozitivnih kliničkih uzoraka za genotipove 1, 2, 3, 4, 5 i 6 u HCV negativnoj ljudskoj plazmi i serumu. Dodjeljivanje koncentracije za kliničke ispitke određeno je s pomoću usporednog testa. Trideset i šest (36) replikata svake sastavnice panela testirano je sa svakom od triju serija reagensa za minimalno 108 replikata po sastavnici panela. Rezultati iz serije reagensa s najvećom koncentracijom jednakom ili većom od LoD-a i koja zadovoljava zahtjeve za TE i TAE, izračunato prema zahtjevima dokumenta CLSI EP 17-A2,[18], prikazani su u Tablica 7 za plazmu i Tablica 8 za serum. Samo po jedan rezultat veći i manji od LLoQ-a po genotipu prikazan je u Tablica 7 i Tablica 8 u nastavku jer ti rezultati najbolje odražavaju očekivani LLoQ. LLoQ za genotipove od 1 do 6 u plazmi i serumu sažet je u Tablica 9. Genotip 6 imao je najviši LLoQ za serum od 10 IU/mL. Time je utvrđen ukupni LLoQ za test od 10 IU/mL.

Tablica 7: Određivanje LLoQ-a među genotipovima u plazmi

Genotip	Kvantifikacijski test Aptima HCV Dx[a] (IU/mL)	Kvantifikacijski test Aptima HCV Dx[a] (log_{10} IU/mL)	SD (log_{10} IU/mL)	Sustavno odstupanje (log_{10} IU/mL)	Izračunati TE (log_{10} IU/mL)	Izračunati TAE (log_{10} IU/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

SD = standardna devijacija

[a] Provedene su dodatne razine, ali ti podaci nisu prikazani u tablici.

Tablica 8: Određivanje LLoQ-a među genotipovima u serumu

Genotip	Kvantifikacijski test Aptima HCV Dx[a] (IU/mL)	Kvantifikacijski test Aptima HCV Dx[a] (log_{10} IU/mL)	SD (log_{10} IU/mL)	Sustavno odstupanje (log_{10} IU/mL)	Izračunati TE (log_{10} IU/mL)	Izračunati TAE (log_{10} IU/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

SD = standardna devijacija

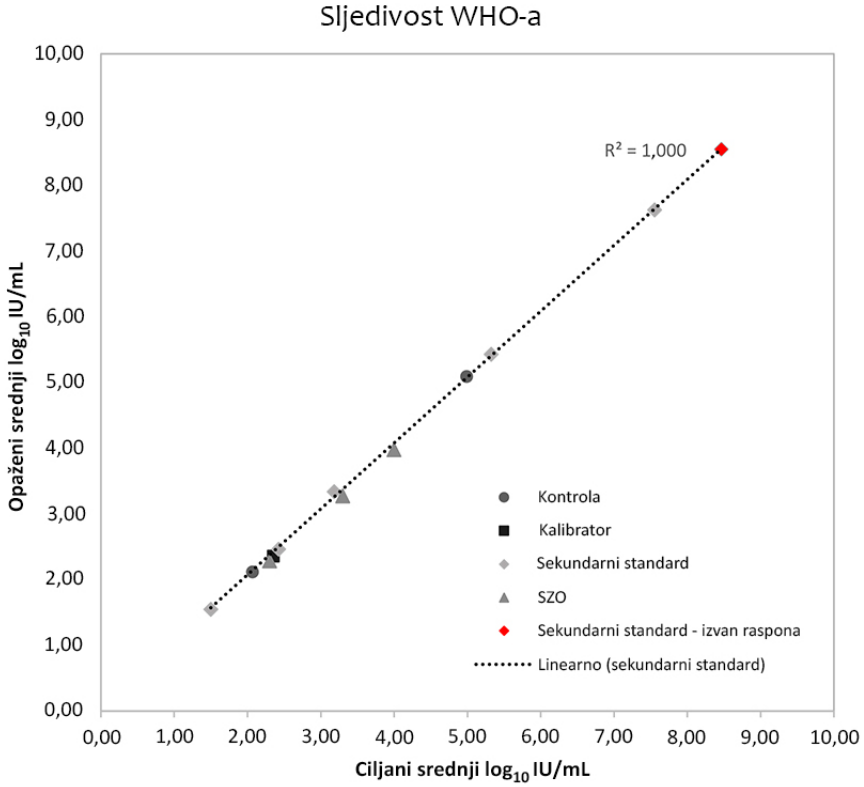
[a] Provedene su dodatne razine, ali ti podaci nisu prikazani u tablici.

Tablica 9: Sažetak LLoQ-a među genotipovima u plazmi i serumu

Genotip HCV-a	LLoQ za plazmu		LLoQ za serum	
	IU/mL	log_{10} IU/mL	IU/mL	log_{10} IU/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

Sljedivost do standarda SZO-a

Tijekom razvoja i proizvodnje proizvoda korišten je niz sekundarnih standarda s poznatim koncentracijama kako bi se uspostavila sljedivost do standarda SZO-a. Koncentracije testirane za standard SZO-a za HCV bile su između 4,00 i 2,30 $\log_{10}$ IU/mL, a sekundarni standardi imali su koncentraciju od 1,50 do 8,46 $\log_{10}$ IU/mL. Kontrole i kalibratori kvantifikacijskog testa Aptima HCV Dx također su testirani zajedno sa sekundarnim standardima i standardom SZO-a. Svi paneli imali su slične rezultate, a bili su linearno raspoređeni u linearnom rasponu testa, kao što je prikazano na slika 9.



Slika 9. Sljedivost između ciljnih koncentracija 2. standarda SZO-a za HCV i uočene koncentracije iz kvantifikacijskog testa Aptima HCV Dx

Preciznost

Panel za preciznost kvantifikacijskog testa Aptima HCV Dx izrađen je razrjeđivanjem HCV pozitivne kliničke plazme i HCV 1a aRNA-a u HCV negativnoj kliničkoj plazmi (dvije sastavnice panela s najvišim udjelom bile su aRNA). Sedam pozitivnih sastavnica panela obuhvatilo je raspon testa (od 1,86 $\log_{10}$ IU/mL do 7,68 $\log_{10}$ IU/mL) i testirao ih je jedan rukovatelj u tri replikata po ciklusu pomoću jedne pilot serije reagensa na jednom sustavu Panther tijekom 21 dana testiranja, s dva ciklusa dnevno.

Tablica 10 prikazuje preciznost rezultata testa (u $\log_{10}$ IU/mL) između ciklusa, unutar ciklusa i ukupno. Ukupna varijabilnost bila je ≤ 0,14 za sve sastavnice panela, prvenstveno zbog varijabilnosti unutar ciklusa (tj. slučajne pogreške).

Tablica 10: Preciznost kvantifikacijskog testa Aptima HCV Dx

N	Srednja koncentracija (IU/mL)	Srednja koncentracija (log_{10} IU/mL)	Međudnevno SD	Među ciklusima SD	Unutar ciklusa SD	Ukupno SD
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

SD = standardna devijacija

[a] Broj valjanih rezultata unutar linearnog raspona testa.

Napomena: varijabilnost nekih čimbenika može biti brojčano negativna, što se može dogoditi ako je varijabilnost zbog tih čimbenika vrlo mala. Kada se to dogodi, SD se prikazuje kao 0,00.

Potencijalno interferirajuće tvari

Procijenjena je osjetljivost kvantifikacijskog testa Aptima HCV Dx na interferenciju uzrokovanu povišenim razinama endogenih tvari ili lijekovima koji se obično propisuju osobama zaraženima virusom HCV. Testirani su HCV negativni uzorci plazme i uzorci obogaćeni HCV-om do koncentracije od približno 15 IU/mL (1,2 log_{10} IU/mL) ili 1995 IU/mL (3,3 log_{10} IU/mL) HCV RNA-a.

Nije uočena interferencija s učinkovitosti testa u prisutnosti albumina (90 mg/mL), hemoglobina (5 mg/mL), triglicerida (30 mg/mL) ili nekonjugiranog bilirubina (0,2 mg/mL).

Klinički ispitci plazme prikupljeni od bolesnika s povišenim razinama definiranih tvari ili od bolesnika s bolestima navedenima u Tablica 11, po deset uzoraka za svaku tvar, testirani su kvantifikacijskim testom Aptima HCV Dx. Nije uočena nikakva interferencija s učinkovitosti testa.

Tablica 11: Testirane vrste kliničkih ispitaka

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

Nije uočena interferencija s učinkovitosti testa u prisutnosti egzogenih tvari navedenih u Tablica 12 pri koncentracijama najmanje tri puta većim od C_{max} (ljudska plazma).

Tablica 12: Egzogene tvari

Skupni uzorak egzogenih tvari	Testirane egzogene tvari
1	Telaprevir, klaritromicin, interferon alfa-2a, dolutegravir, azitromicin
2	Simeprevir, sofosbuvir
3	Efavirenz, boceprevir, pegilirani interferon alfa-2b, emtricitabin, raltegravir, amoksicilin
4	Abakavir sulfat, ribavirin, dasabuvir, rilpivirin, rifampin/rifampicin
5	Lopinavir, tenofovir, lamivudin, valganciklovir
6	Heparin, EDTA, natrijev citrat

Učinkovitost s ispitcima negativnima na HCV

Specifičnost je određena korištenjem 198 svježih i 538 smrznutih HCV negativnih kliničkih ispitaka. Ukupno 370 ispitaka plazme i 366 ispitaka seruma potvrđeno je kao negativno na HCV pomoću odobrenih testova. Specifičnost izračunata je kao postotak uzoraka negativnih na HCV s rezultatom „Not Detected" (Nije otkriveno). HCV RNA nije detektirana u svih 736 uzoraka. Specifičnost je 100 % (736/736, 95 % CI: 99,6 - 100 %).

Tablica 13: Učinkovitost u HCV negativnim kliničkim ispitcima plazme i seruma

	Svježa plazma	Zamrznuta plazma	Ukupno za plazmu	Svježi serum	Zamrznuti serum	Ukupno za serum	Kombinirano
Valjani replikati (n)	100	270	370	98	268	366	736
Nije otkriveno	100	270	370	98	268	366	736
Specifičnost (95-postotni CI)	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)

CI = interval pouzdanosti

Analitička specifičnost

Potencijalna križna reaktivnost s patogenima navedenima u Tablica 14 procijenjena je u HCV negativnoj ljudskoj plazmi u prisutnosti ili odsutnosti približno 15 IU/mL (1,2 $\log_{10}$ IU/mL) ili 1995 IU/mL (3,3 $\log_{10}$ IU/mL) HCV-a. Nije uočena križna reaktivnost. U prisutnosti patogena nije uočena interferencija.

Tablica 14: Patogeni testirani na analitičku specifičnost

Patogen	Koncentracija	
Virus hepatitisa A	100.000	kopija/mL
Virus hepatitisa B (HBV)	100.000	IU/mL[a]
Virus hepatitisa G	1.470	genom/mL
HIV-1	100.000	kopija/mL
HIV-2	100.000	PFU/mL[b]
Virus herpes simplex 1 (HSV-1)	100.000	PFU/mL
Virus herpes simplex 2 (HSV-2)	100.000	PFU/mL
Virus humanog herpesa 6B	100.000	kopija/mL
Virus humanog herpesa 8	2.667	TCID50 U/mL[c]
Limfotropni virus humanih T-stanica tipa 1 (HTLV-1)	100.000	vp/mL[d]
Limfotropni virus humanih T-stanica tipa 2 (HTLV-2)	100.000	vp/mL
Parvovirus B19	100.000	IU/mL
Virus Zapadnog Nila	100.000	PFU/mL
Virus denge 1	100.000	PFU/mL
Virus denge 2	100.000	PFU/mL
Virus denge 3	100.000	PFU/mL
Virus denge 4	100.000	PFU/mL

Patogen	Koncentracija	
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	stanica/mL

[a]IU/mL = međunarodne jedinice po mL
[b]PFU/mL = jedinice koje tvore plak po mL
[c]TCID50 U/mL = jedinice infektivne doze za kulturu tkiva po mL
[d]vp/mL = virusne čestice po mL
[e]LD50/mL = smrtonosna doza po mL
[f]CFU/mL = jedinice koje tvore kolonije po mL
[g]IFU/mL = jedinice koje tvore inkluzije po mL

Tablica 14: Patogeni testirani na analitičku specifičnost (nastavak)

Patogen	Koncentracija		Patogen	Koncentracija
Citomegalovirus	100.000	PFU/mL		
Epstein-Barrov virus	100.000	kopija/mL		
Virus rubeole	100.000	PFU/mL		
Humani papiloma virus	100.000	stanica/mL		
Adenovirus tipa 5	100.000	TCID50 U/mL		
Virus gripe A	100.000	TCID50 U/mL		
Virus japanskog encefalitisa	NA	NA		
Virus encefalitisa u St. Louisu	NA	NA		
Virus encefalitisa Murray Valley	2.643	LD50/mL[e]		
Virus žute groznice	100.000	stanica/mL		

Klinički uzorci koji sadrže viruse osim HCV-a

Patogeni navedeni u Tablica 15 procijenjeni su uzimanjem pojedinačnih prirodno zaraženih kliničkih ispitaka. Testirani su u prisutnosti ili odsutnosti približno 15 IU/mL (1,2 $\log_{10}$ IU/mL) ili 1995 IU/mL (3,3 $\log_{10}$ IU/mL) virusa HCV-a. Nije uočena križna reaktivnost. Nije uočena nikakva interferencija.

Tablica 15: Klinički uzorci testirani na analitičku specifičnost

Mikroorganizam	Matrica	N (donori)
HBV	Serum	5
HBV	Plazma	5
Virus denge	Plazma	10
Virus hepatitisa A	Plazma	10
HTLV-1	Plazma	10
HTLV-2	Plazma	10
HIV-1	Plazma	10
Virus Zapadnog Nila	Plazma	10

Ekvivalencija matrice

Sto sedamdeset i šest skupova uzoraka usklađenih epruveta za prikupljanje krvi (epruvete za serum, SST, PPT, ACD, K2 EDTA, K3 EDTA) procijenjeno je u pogledu ekvivalentnosti matrice. Među tim skupovima uzoraka 68 je bilo prirodno zaraženo i pozitivno na HCV, a 108 negativno na HCV. Dvadeset i šest od 68 pozitivnih dodatno je razrijeđeno s 13 negativnih uzoraka iz usklađenih epruveta za prikupljanje krvi u omjerima 1 : 10, 1 : 100 i 1 : 1000 ili 1 : 100, 1 : 10.000 i 1 : 100.000, s koncentracijama u cijelom dinamičkom rasponu testa (146 pozitivnih replikata po epruveti za prikupljanje). Korelacija je mjerena pomoću epruvete za prikupljanje seruma kao komparatora.

Tablica 16: Studija ekvivalencije matrice

Epruveta za prikupljanje krvi	Demingova regresija	95 %-tni interval pouzdanosti nagiba		95 %-tni interval pouzdanosti presijecanja		R^2	Srednja razlika (log_{10})
		Donja granica	Gornja granica	Donja granica	Gornja granica		
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

Razrjeđivanje uzorka s pomoću razrjeđivača za ispitke Aptima (1 : 3)

Za procjenu točnosti detekcije HCV RNA-a u uzorcima razrijeđenima plazmom ili serumom s razrjeđivačem za ispitke Aptima, uzorci od 1,67 log_{10} IU/mL do 6,34 log_{10} IU/mL razrijeđeni su u omjeru 1 : 3 razrjeđivačem za ispitke Aptima (240 µL uzorka kombiniranog s 480 µL razrjeđivača za ispitke Aptima). Svaki je uzorak testiran nerazrijeđen i razrijeđen (1 : 3) u tri replikata. Testiranje je provedeno pomoću jedne serije testnih reagensa na jednom sustavu Panther s dvjema serijama razrjeđivača za ispitke Aptima. Razlika između nerazrijeđenih i razrijeđenih rezultata testa izračunata je za svaki skup uzoraka kako je prikazano u Tablica 17 za plazmu i Tablica 18 za serum.

Tablica 17: Sažetak usporedbe matrice razrjeđenja ispitka plazme 1 : 3 u log_{10} IU/mL

Matrica plazme Prosječna zabilježena koncentracija (log_{10} IU/mL) n = 3	Razrjeđivač Prosječna zabilježena koncentracija (log_{10} IU/mL) n = 6	Razlika Razrjeđivač iz matrice plazme (log_{10} IU/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] Rezultat dvaju replikata. Jedan rezultat bio je „Detected" (Detektirano), ali nije kvantificiran.
[b] Rezultat četiriju replikata. Dva rezultata bila su „Detected" (Detektirano), ali nisu kvantificirani.

Tablica 18: Sažetak usporedbe matrice razrjeđenja ispitka seruma 1 : 3 u log_{10} IU/mL

Matrica seruma Prosječna zabilježena koncentracija (log_{10} IU/mL) n = 3	Razrjeđivač Prosječna zabilježena koncentracija (log_{10} IU/mL) n = 6	Razlika Razrjeđivač iz matrice seruma (log_{10} IU/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] Rezultat dvaju replikata. Jedan rezultat bio je „Detected" (Detektirano), ali nije kvantificiran.

Razrjeđivanje uzorka s pomoću razrjeđivača za ispitke Aptima (1 : 100)

Za procjenu točnosti detekcije HCV RNA-a u uzorcima razrijeđenima plazmom ili serumom s razrjeđivačem za ispitke Aptima, pet prirodno inficiranih ispitaka plazme i pet prirodno inficiranih ispitaka seruma, zajedno s deset ispitaka HCV negativne plazme i seruma obogaćenog HCV aRNA-om ciljano iznad ULoQ, 8 log_{10} IU/mL pri 8,30 log_{10} IU/mL, testirano je u tri replikata. Razrjeđivanje 1 : 100 provedeno je s jednim dijelom uzorka i 99 dijelova razrjeđivača za ispitke Aptima neposredno prije testiranja. Testiranje je provedeno pomoću jedne serije testnih reagensa na jednom sustavu Panther s dvjema serijama razrjeđivača za ispitke Aptima. Razlika između nerazrijeđenih i razrijeđenih rezultata testa izračunata je za svaki skup uzoraka kako je prikazano u Tablica 19 za plazmu i Tablica 20 za serum.

Tablica 19: Sažetak usporedbe matrice razrjeđenja ispitka plazme 1 : 100 u log_{10} IU/mL

Matrica	Razrjeđivanje	Matrica plazme Prosječna zabilježena koncentracija (log_{10} IU/mL) n = 3	Razrjeđivač Prosječna zabilježena koncentracija (log_{10} IU/mL) n = 6	Razlika
Plazma	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] Obogaćeni ispitak

Tablica 20: Sažetak usporedbe matrice razrjeđenja ispitka seruma 1 : 100 u log10 IU/mL

Matrica	Razrjeđivanje	Matrica plazme Prosječna zabilježena koncentracija (log_{10} IU/mL) n = 3	Razrjeđivač Prosječna zabilježena koncentracija (log_{10} IU/mL) n = 6	Razlika
Serum	1 :1 00	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] Obogaćeni ispitak

[b] Rezultat dvaju od triju testiranih replikata. Jedan odstupajući replikat uklonjen.

Potvrda LLoQ-a u kliničkim ispitcima razrijeđenima u razrjeđivaču za ispitke

LLoQ kvantifikacijskog testa Aptima HCV potvrđen je kliničkim ispitcima genotipa 1 HCV-a razrijeđenima u razrjeđivaču za ispitke Aptima. Ispitci su pripremljeni u ljudskoj plazmi i serumu negativnima na HCV u koncentracijama od 21, 30 i 45 IU/mL. Svaki panel razrijeđen je u omjeru 1 : 3 u razrjeđivaču za ispitke Aptima neposredno prije testiranja kako bi se dobile konačne koncentracije od približno 7, 10 i 15 IU/mL. Trideset i šest (36) replikata svake sastavnice panela testirano je s jednom serijom reagensa tijekom tri dana. Potvrđen je LLoQ ≤ 10 IU/mL za plazmu i serum s HCV-om razrijeđene u razrjeđivaču za ispitke Aptima, kao što je prikazano u Tablica 21.

Tablica 21: Potvrda LLoQ-a – klinički uzorci u razrjeđivaču za ispitke Aptima

Matrica	Ciljna koncentracija (IU/mL)	Ciljna koncentracija (log_{10} IU/mL)	% detekcije	Kvantifikacijski test Aptima HCV Dx (IU/mL)	Kvantifikacijski test Aptima HCV Dx (log_{10} IU/mL)	SD (log_{10} IU/mL)	Sustavno odstupanje (log_{10} IU/mL)	Izračunati TE (log_{10} IU/mL)	Izračunati TAE (log_{10} IU/mL)
Plazma	7	0,85	100 %	9	0,94	0,25	0,10	0,71	0,60
Serum	7	0,85	100 %	9	0,96	0,21	0,12	0,60	0,54

Preciznost razrijeđenih uzoraka

Panel za preciznost kvantifikacijskog testa Aptima HCV Dx izrađen je razrjeđivanjem HCV pozitivne kliničke plazme i HCV aRNA-a u HCV negativnoj kliničkoj plazmi. Oni su dodatno razrijeđeni u razrjeđivaču za ispitke Aptima. Pozitivni paneli razrijeđeni su u razrjeđivaču za ispitke Aptima. Testirao ih je jedan rukovatelj u tri replikata po ciklusu pomoću jedne pilot serije reagensa na jednom sustavu Panther tijekom 21 dana testiranja, s dva ciklusa dnevno.

Tablica 22 prikazuje preciznost rezultata testa (u $\log_{10}$ IU/mL) između ciklusa, unutar ciklusa, između dana i ukupno. Ukupna varijabilnost bila je ≤ 0,15 za sve sastavnice panela, prvenstveno zbog varijabilnosti unutar ciklusa (tj. slučajne pogreške)

Tablica 22: Preciznost panela razrijeđenih u razrjeđivaču za ispitke Aptima

Razrjeđivanje	N	Srednja koncentracija ($\log_{10}$ IU/mL)	Standardna devijacija			
			Međudnevno	Među ciklusima	Unutar ciklusa	Ukupno
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] Broj valjanih rezultata unutar linearnog raspona testa

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

Prijenos

Kako bi se utvrdilo da sustav Panther umanjuje rizik od lažno pozitivnih rezultata koji proizlaze iz prijenosne kontaminacije, provedeno je ispitivanje pomoću obogaćenih panela na tri sustava Panther. Prijenos je procijenjen pomoću obogaćenih uzoraka plazme s visokim titrom aRNA-a (7 $\log_{10}$ IU/mL) raspoređenih između HCV negativnih uzoraka u uzorku šahovske ploče. Testiranje je provedeno u petnaest ciklusa. Ukupna stopa prijenosa bila je 0,14 % (1/704).

Serokonverzijski panel

Testirano je jedanaest HCV serokonverzijskih panel setova, ukupno 72 ispitka. Rezultati kvantifikacijskog testa Aptima HCV Dx uspoređeni su s rezultatima testa na HCV protutijela. Broj dana do prvog reaktivnog rezultata naveden je u Tablica 23. Kvantifikacijski test Aptima HCV Dx je otkrio prisutnost HCV-a u prosjeku 20 dana ranije od testova na protutijela.

Tablica 23: Sažetak podataka za serokonverzijski panel

ID panela	Broj ispitanih sastavnica panela	Broj reaktivnih sastavnica panela			Dani do prvog reaktivnog rezultata			Razlika u danima do prvog reaktivnog rezultata (na temelju datuma uzimanja krvi)	
		Kvantifikacijski test Aptima HCV Dx	Test HCV protutijela 1	Test HCV protutijela 2	Kvantifikacijski test Aptima HCV Dx	Test HCV protutijela 1	Test HCV protutijela 2	Dana ranije od testa HCV protutijela 1	Dana ranije od testa HCV protutijela 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
PH924	6	6	3	3	0	59	59	59	59
PH925	5	5	1	1	0	27	27	27	27

Tablica 23: Sažetak podataka za serokonverzijski panel (nastavak)

ID panela	Broj ispitanih sastavnica panela	Broj reaktivnih sastavnica panela			Dani do prvog reaktivnog rezultata			Razlika u danima do prvog reaktivnog rezultata (na temelju datuma uzimanja krvi)	
		Kvantifikacijski test Aptima HCV Dx	Test HCV protutijela 1	Test HCV protutijela 2	Kvantifikacijski test Aptima HCV Dx	Test HCV protutijela 1	Test HCV protutijela 2	Dana ranije od testa HCV protutijela 1	Dana ranije od testa HCV protutijela 2
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
Ukupno	72	66	35	32			Srednja vrijednost	19,36	20,73
							Medijan	14	18

Test HCV protutijela 1 proveden je testom Abbott Prism HCV.

Test HCV protutijela 2 završen je Ortho Enhanced SAVE testom, uz sljedeće iznimke:

Paneli 6227 i 6229, koji su oba testirani testom Ortho ELISA Anti-HCV 3.0

[a] Prvo uzimanje krvi nije testirano zbog nedostupnosti uzorka od dobavljača.

[b] Nijedno uzimanje krvi u ovom panelu nije bilo reaktivno na HCV protutijela. Posljednji dan krvarenja upotrijebljen je kao „Dani do prvog reaktivnog rezultata".

[c] Drugo uzimanje krvi nije testirano zbog nedostupnosti uzorka od dobavljača.

Studija obnovljivosti

Obnovljivost je procijenjena na sustavu Panther u trima vanjskim centrima u SAD-u. Dva rukovatelja provodila su testiranje na svakoj lokaciji. Svaki je rukovatelj izvodio dva ciklusa dnevno tijekom triju dana uporabom triju serija reagensa tijekom testiranja. U svakom ciklusu bila su 3 replikata svakog člana panela. Ukupno je testirano 108 replikata svake sastavnice panela.

Obnovljivost je testirana pomoću sastavnica panela izrađenih od HCV negativne plazme. Pozitivne sastavnice panela bile su pozitivne na genotip 1, genotip 2 ili genotip 3 HCV-a. Koncentracije HCV RNA-a obuhvaćale su linearni raspon testa. Tablica 24 prikazuje obnovljivost i preciznost rezultata testa za svaku pozitivnu sastavnicu panela između centara, između rukovatelja, između serija, između dana, između ciklusa, unutar ciklusa i ukupno te udio replikata s rezultatima izvan prijavljivog raspona kvantifikacijskog testa Aptima HCV Dx.

Koeficijent varijacije izračunat je s pomoću sljedeće jednadžbe, pri čemu je σ_2 varijancija uzorka podataka nakon pretvorbe $\log_{10}$.

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

Za sastavnicu panela negativnu na HCV testirano je 108 replikata i HCV RNA nije detektiran ni u jednom od 108 replikata (negativno slaganje = 100 %, 95 %-tni CI: od 96,6 % do 100 %). Za sve HCV pozitivne sastavnice panela vrijednosti slaganja bile su 100 %.

Tablica 24: Obnovljivost razina HCV RNA-a za kvantifikacijski test Aptima HCV Dx na sustavu Panther u pozitivnim sastavnicama panela

GT	N	Opažena srednja vrijednost IU/mL	Opažena srednja vrijednost Log_{10} IU/mL	Između centara SD (%CV)	Između serija SD (%CV)	Između rukovatelja/dana[a] SD (%CV)	Između ciklusa SD (%CV)	Unutar ciklusa SD (%CV)	Ukupno SD (%CV)	Ispod LLoQ -a n (%)	Iznad ULoQ -a 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	22.710,9	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	4.195.539,0	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	58.549.271,2	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 (5,69)	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 (2,48)	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	14.519,2	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	5.810.012,3	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	77.499.195,7	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)

GT	N	Opažena srednja vrijednost IU/mL	Opažena srednja vrijednost Log_{10} IU/mL	Između centara SD (%CV)	Između serija SD (%CV)	Između rukovatelja/dana[a] SD (%CV)	Između ciklusa SD (%CV)	Unutar ciklusa SD (%CV)	Ukupno SD (%CV)	Ispod LLoQ -a n (%)	Iznad ULoQ -a n (%)
3	107	8,6	0,9	0,049 (11,32)	0,103 (24,05)	0,056 (12,95)	0,000 (0,0)	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	4.128.761,4	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	63.813.728,0	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 = log-normalni koeficijent varijacije, GT = genotip, SD = standardna devijacija (log_{10} IU/mL)

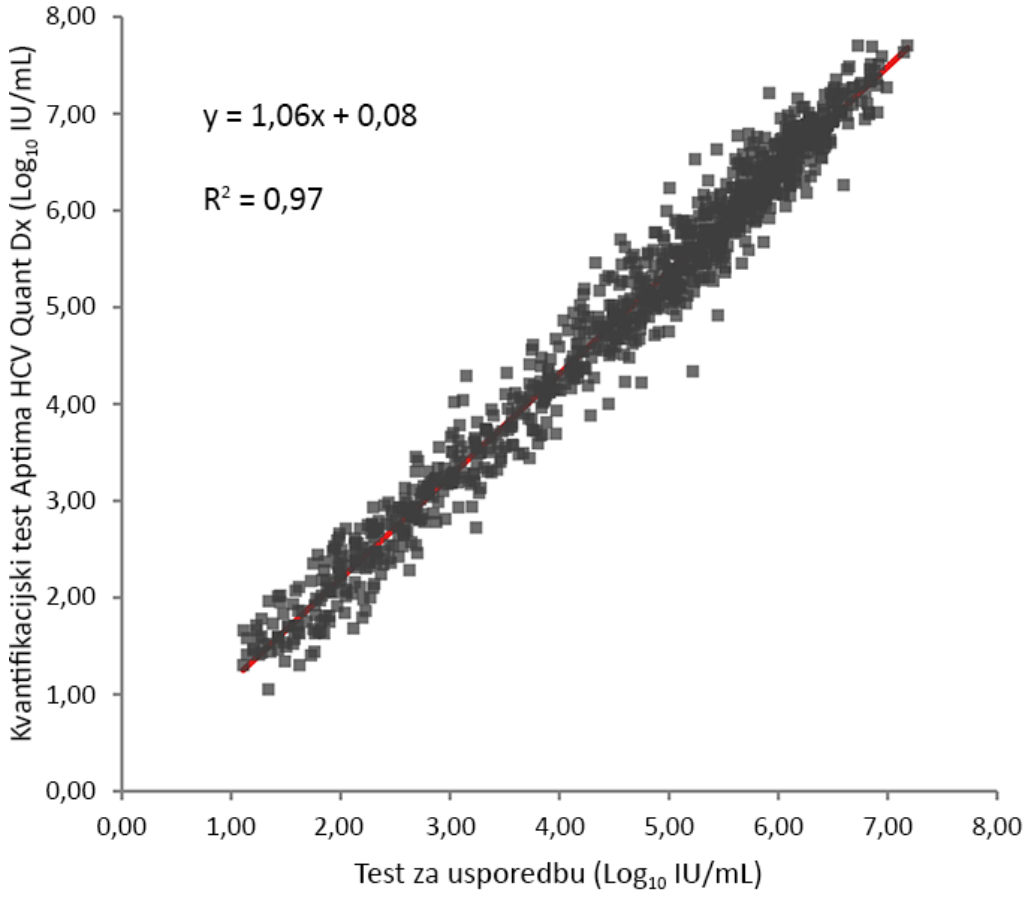
Napomena: Varijabilnost izazvana nekim čimbenicima može biti brojčano negativna. To se može dogoditi ako je varijabilnost zbog tih čimbenika vrlo mala. U tim se slučajevima SD i CV prikazuju kao 0.

[a]Između rukovatelja može se preklapati s Između dana; stoga se procjene Između rukovatelja i Između dana kombiniraju u Između rukovatelja/dana.

Klinička učinkovitost

Korelacija metoda

Učinkovitost kvantifikacijskog testa Aptima HCV Dx procijenjena je u odnosu na usporedni test s oznakom CE testiranjem nerazrijeđenih kliničkih ispitaka bolesnika zaraženih HCV-om na tri Panther sustava korištenjem četiri serije reagensa. Za linearnu regresiju upotrijebljeno je ukupno 1058 uzoraka plazme i seruma (872 uzorka plazme, 186 uzoraka seruma) za sve genotipove HCV-a unutar linearnog raspona zajedničkog za oba testa, kao što je prikazano na slika 10.



Slika 10. Korelacija između kvantifikacijskog testa Aptima HCV Dx i usporednog testa

Studija kliničke korisnosti

Studija je osmišljena kako bi se dokazala klinička korisnost procjenom karakteristika učinkovitosti za postizanje održivog virološkog odgovora (SVR) ili neodrživog virološkog odgovora (NSVR) u utvrđenim klinički relevantnim vremenskim točkama tijekom antivirusnog liječenja od 8, 12 ili 24 tjedna. U studiji je ujedno procijenjen utjecaj kovarijate (tj. dobi, spola, rase, početne razine HCV RNA-a, prisutnosti ili odsutnosti ciroze) na SVR odgovor.

Ispitci su prospektivno prikupljeni od ispitanika kronično zaraženih HCV-om genotipa 1, 2 i 3 koji su započeli terapiju od 8, 12 ili 24 tjedna na bazi sofosbuvira uzimanjem lijekova koje je odobrila agencija FDA, propisanih u skladu s oznakama koje je odobrila agencija FDA i/ili smjernicama za liječenje HCV-a organizacija AASLD/IDSA.[20,21] Ispitanici koji nisu prethodno primali liječenje za HCV ili su već primali liječenje te ispitanici bez ciroze ili s kompenziranom cirozom ispunjavali su uvjete za sudjelovanje, kako je bilo primjenjivo za svaki režim liječenja.

Određivanje količine virusa u krvi za HCV RNA provedeno je na početku, u 1. tjednu, 2. tjednu, 4. tjednu, 8. tjednu, 12. tjednu i 24. tjednu s pomoću kvantifikacijskog testa Aptima HCV Dx. Rezultati praćenja na kraju liječenja (EOT) te nakon liječenja u 4. i 12. tjednu određeni su s pomoću kvantifikacijskog testa Aptima HCV Dx i dva odobrena kvantitativna testa za HCV RNA. SVR je definiran kao razina HCV RNA-a < LLoQ, kako je određena odobrenim kvantitativnim testom za uzorak u 12. tjednu nakon liječenja.

Od 352 ispitanika uključena iz 35 kliničkih centara u SAD-u, 274 ispitanika imalo je konačan SVR status i ispunjavalo je uvjete za analizu. Pedeset i šest (56) ispitanika imalo je status SVR-a koji se nije mogao procijeniti i nisu bili uključeni u analizu. Dodatna 22 ispitanika imala su konačan status SVR-a, ali nisu se mogli procijeniti zbog nedostatka rezultata prije liječenja / početnih rezultata, svih rezultata tijekom liječenja < LLoQ ili nedetektiranih ili zato što genotipovi nisu utvrđeni odobrenim testom. U ovoj studiji 90,5 % (248/274) ispitanika postiglo je SVR, a 9,5 % (26/274) postiglo je NSVR (pogledajte od Tablica 31 do Tablica 33 za brojčane podatke prema genotipu i DRA-u). Najveća početna količina virusa u krvi bila je 7,58 $\log_{10}$ IU/mL, kako je utvrđeno kvantifikacijskim testom Aptima HCV Dx. Svi ispitanici koji su se mogli procijeniti završili su terapiju, bez neuspjeha tijekom liječenja (npr. izostanka odgovora). Ukupno 2449 uzoraka prikupljenih u različitim vremenskim točkama od svakog ispitanika testirano je u trima centrima za testiranje u SAD-u.

Tablica 25 prikazuje demografske podatke i kliničke karakteristike 274 ispitanika koji su se mogli procijeniti.

Tablica 25: Demografski podaci i kliničke karakteristike

Karakteristike		
Ukupno	N	274
Spol	Ženski, n (%)	112 (40,9)
	Muški, n (%)	162 (59,1)
Dob (godine)	n	274
	Srednja vrijednost	55,1
	Medijan	56,0
	SD	10,40
	Minimalno	23
	Maksimalno	83
	21 – 49, n (%)	61 (22,3)
	50 – 70, n (%)	203 (74,1)
	> 70, n (%)	10 (3,6)
Etnička pripadnost	n	274
	Hispanoamerikanci ili Latinoamerikanci, n (%)	65 (23,7)
	Nisu Hispanoamerikanci ili Latinoamerikanci, n (%)	202 (73,7)
	Nepoznato, n (%)	6 (2,2)
	Odbijeno, n (%)	1 (0,4)
Rasa[a]	n	274
	Bijelci, n (%)	223 (81,4)
	Crnci ili Afroamerikanci, n (%)	43 (15,7)
	Azijci, n (%)	1 (0,4)
	Američki Indijanci / domoroci Aljaske, n (%)	3 (1,1)
	Havajci / domoroci Pacifika, n (%)	0 (0,0)
	Ostalo, n (%)	3 (1,1)
	Nepoznato, n (%)	1 (0,4)
	Odbijeno, n (%)	0 (0,0)

Tablica 25: Demografski podaci i kliničke karakteristike (nastavak)

Karakteristike		
Genotip	n	274
	Genotip 1, n (%)	158 (57,7)
	Genotip 2, n (%)	66 (24,1)
	Genotip 3, n (%)	50 (18,2)
Status liječenja HCV-a	n	274
	Neliječeni, n (%)	232 (84,7)
	Liječeni, n (%)	42 (15,3)
	S relapsom, n (%)	32 (76,2)
	Bez odgovora, n (%)	1 (2,4)
	Bez očekivanog odgovora, n (%)	2 (4,8)
	S djelomičnim odgovorom, n (%)	3 (7,1)
	S probojem, n (%)	1 (2,4)
	Ponovni porast infekcije, n (%)	0 (0,0)
	Odgovor na liječenje nepoznat, n (%)	3 (7,1)
	Nedostaje, n (%)	0 (0,0)
Status ciroze	n	274
	Cirotični, n (%)	98 (35,8)
	Necirotični, n (%)	176 (64,2)

[a] Ispitanici mogu navesti više rasa.

U Tablica 26 prikazuje se konačna dodjela režima lijekova za 274 ispitanika koji su se mogli procijeniti.

Tablica 26: Sažetak konačne dodjele režima lijekova ispitanika prema genotipu

Dodjela režima lijekova	**Genotip HCV-a, n (%)**		
	1	**2**	**3**
Sofosbuvir i peginterferon i ribavirin tijekom 12 tjedana	25 (15,8)	-	3 (6,0)
Sofosbuvir i simeprevir i/ili ribavirin tijekom 12 tjedana	63 (39,9)	-	-
Sofosbuvir i simeprevir i/ili ribavirin tijekom 24 tjedna	4 (2,5)	-	-
Sofosbuvir i ribavirin tijekom 12 tjedana	-	66 (100)	-
Sofosbuvir i ribavirin tijekom 24 tjedna	6 (3,8)	-	47 (94,0)
Ledipasvir i sofosbuvir tijekom 8 tjedana	14 (8,9)	-	-
Ledipasvir i sofosbuvir tijekom 12 tjedana	39 (24,7)	-	-
Ledipasvir i sofosbuvir tijekom 24 tjedna	7 (4,4)	-	-
Ukupan broj prihvatljivih ispitanika	158	66	50

U Tablica 27 procjenjuje se povezanost početnih kovarijata (dob, rasa, spol, početna količina virusa HCV-a u krvi [binarna varijabla] i status ciroze) i SVR-a pomoću omjera vjerojatnosti (OR) s univarijatnom (neprilagođenom) logističkom regresijskom analizom. Rezultati za 274 ispitanika koji su se mogli procijeniti procijenjeni su prema genotipu HCV-a. Za genotipove 1 i 2 cirotične osobe su imale manju vjerojatnost postizanja SVR-a u odnosu na necirotične osobe (OR = 0,16 [Waldov 95 %-tni CI: od 0,04 do 0,63], P = 0,009 odnosno OR = 0,13 [Waldov 95 %-tni CI: od 0,02 do 0,70], P = 0,017). Vrijednosti 95 %-tnog CI-ja za ostale kovarijate za genotip 1 i 2 te sve kovarijate za genotip 3 uključivale su vrijednost 1 i nisu bile statistički značajne.

Tablica 27: Procjena početnih prediktora SVR-a na početku

GT	Kategorija	N	Grupiranje	N(%)	Postotak koji je postigao SVR	Omjer vjerojatnosti (Waldov 95 %-tni CI) uz univarijatnu LR analizu	P-vrijednost
1	Dob	158	≥ 40 godina	146 (92,4)	91,8	0 [0 – ∞)	Nije moguć izračun
			< 40 godina	12 (7,6)	100		
	Spol	158	Muški	92 (58,2)	90,2	0,44 (0,11 - 1,69)	0,231
			Ženski	66 (41,8)	95,5		
	Rasa	158	Bijelci	116 (73,4)	94,0	2,10 (0,63 - 7,03)	0,227
			Nebijelci	42 (26,6)	88,1		
	Početna količina virusa u krvi za HCV RNA[a]	156	> 740.000 IU/mL	111 (71,2)	92,8	1,26 (0,36 - 4,40)	0,721
			≤ 740.000 IU/mL	45 (28,8)	91,1		
	Status ciroze	158	Cirotični	57 (36,1)	84,2	0,16 (0,04 - 0,63)	0,009
			Necirotični	101 (63,9)	97,0		
2	Dob	66	≥ 40 godina	60 (90,9)	88,3	1,51 (0,15 - 14,91)	0,722
			< 40 godina	6 (9,1)	83,3		
	Spol	66	Muški	36 (54,5)	86,1	0,69 (0,15 - 3,15)	0,631
			Ženski	30 (45,5)	90,0		
	Rasa	66	Bijelci	61 (92,4)	86,9	0 [0 – ∞)	Nije moguć izračun
			Nebijelci	5 (7,6)	100		
	Početna količina virusa u krvi za HCV RNA	66	> 740.000 IU/mL	44 (66,7)	84,1	0,25 (0,03 - 2,19)	0,211
			≤ 740.000 IU/mL	22 (33,3)	95,5		
	Status ciroze	66	Cirotični	22 (33,3)	72,7	0,13 (0,02 - 0,70)	0,017
			Necirotični	44 (66,7)	95,5		
3	Dob	50	≥ 40 godina	44 (88,0)	86,4	0 [0 – ∞)	NC
			< 40 godina	6 (12,0)	100		
	Spol	50	Muški	34 (68,0)	85,3	0,39 (0,04 – 3,62)	0,405
			Ženski	16 (32,0)	93,8		
	Rasa	50	Bijelci	46 (92,0)	87,0	0 [0 – ∞)	Nije moguć izračun
			Nebijelci	4 (8,0)	100		
	Početna količina virusa u krvi vza HCV RNA[a]	49	> 740.000 IU/mL	30 (61,2)	83,3	0,28 (0,03 – 2,59)	0,261
			≤ 740.000 IU/mL	19 (38,8)	94,7		
	Status ciroze	50	Cirotični	19 (38,0)	78,9	0,26 (0,04 – 1,58)	0,143
			Necirotični	31 (62,0)	93,5		

CI = interval pouzdanosti, GT = genotip, LR = logistička regresija

[a] Kovarijata početne količine virusa u krvi za HCV RNA ne uključuje ispitanike od kojih nije dobivena kvantitativna količina virusa u krvi za HCV RNA prije početka terapije.

Odgovor na antivirusnu terapiju

Karakteristike učinkovitosti testa utvrđene su za osobe liječene određenim DAA režimima. Nema dostupnih informacija o prediktivnoj vrijednosti testa kada se upotrebljavaju druge kombinirane DAA terapije.

Definicije:

Količina virusa u krvi (VL) u 1. tjednu = HCV RNA < LLoQ = 10 IU/mL u 1. tjednu antivirusne terapije

VL u 2. tjednu = HCV RNA < LLoQ = 10 IU/mL u 2. tjednu antivirusne terapije

VL u 4. tjednu = HCV RNA < LLoQ = 10 IU/mL u 4. tjednu antivirusne terapije

VL u 8. tjednu = HCV RNA < LLoQ = 10 IU/mL u 8. tjednu antivirusne terapije

VL u 8. tjednu (EOT): HCV RNA < LLoQ u 8. tjednu antivirusne terapije

VL u 12. tjednu = HCV RNA < LLoQ = 10 IU/mL u 12. tjednu antivirusne terapije

VL u 12. tjednu (EOT): HCV RNA < LLoQ u 12. tjednu antivirusne terapije

VL u 24. tjednu (EOT): HCV RNA < LLoQ u 24. tjednu antivirusne terapije

Održivi virološki odgovor (SVR) 12: HCV RNA < LLoQ u 12. tjednu nakon završetka antivirusne terapije, mjereno neovisnim testom za HCV RNA.

Tablica 28 i Tablica 29 prikazuju učestalost SVR odgovora i izostanka odgovora prema genotipu odnosno režimu lijekova općenito te za cirotične, necirotične, prethodno neliječene i liječene ispitanike. Većina ispitanika postigla je SVR u svim genotipovima: 92,4 % za genotip 1, 87,9 % za genotip 2 i 88,0 % za genotip 3. Među genotipovima, stope SVR-a općenito su bile više u necirotičnih ispitanika nego u ispitanika s cirozom te slične između prethodno neliječenih i liječenih ispitanika.

Tablica 28: Učestalost SVR odgovora prema genotipu i režimu lijekova

GT	DRA	Ispitanici koji su postigli SVR n (%)				
		Ukupno	Cirotični	Necirotični	Neliječeni	Liječeni
1	Ledipasvir i sofosbuvir tijekom 8 tjedana	13/14 (92,9)	N/P	13/14 (92,9)	13/14 (92,9)	N/P
	Ledipasvir i sofosbuvir tijekom 12 tjedana	39/39 (100)	9/9 (100)	30/30 (100)	34/34 (100)	5/5 (100)
	Ledipasvir i sofosbuvir tijekom 24 tjedna	6/7 (85,7)	6/7 (85,7)	N/P	N/P	6/7 (85,7)
	Sofosbuvir i peginterferon i ribavirin tijekom 12 tjedana	24/25 96,0)	7/7 (100)	17/18 (94,4)	22/23 (95,7)	2/2 (100)
	Sofosbuvir i ribavirin tijekom 24 tjedna	6/6 (100)	1/1 (100)	5/5 (100)	5/5 (100)	1/1 (100)
	Sofosbuvir i simeprevir i/ili ribavirin tijekom 12 tjedana	54/63 (85,7)	21/29 (72,4)	33/34 (97,1)	45/54 (83,3)	9/9 (100)
	Sofosbuvir i simeprevir i/ili ribavirin tijekom 24 tjedna	4/4 (100)	4/4 (100)	N/P	2/2 (100)	2/2 (100)
2	Sofosbuvir i ribavirin tijekom 12 tjedana	58/66 (87,9)	16/22 (72,7)	42/44 (95,5)	53/60 (88,3)	5/6 (83,3)
3	Sofosbuvir i peginterferon i ribavirin tijekom 12 tjedana	3/3 (100)	3/3 (100)	N/P	1/1 (100)	2/2 (100)
	Sofosbuvir i ribavirin tijekom 24 tjedna	41/47 (87,2)	12/16 (75,0)	29/31 (93,5)	35/39 (89,7)	6/8 (75,0)

DRA = dodjela režima lijekova, GT = genotip, N/P = režim lijekova nije primjenjiv za ovu skupinu bolesnika

Tablica 29: Učestalost izostanka SVR-a prema genotipu i režimu lijekova

GT	DRA	Ispitanici koji nisu postigli SVR n (%)				
		Ukupno	**Cirotični**	**Necirotični**	**Neliječeni**	**Liječeni**
1	Ledipasvir i sofosbuvir tijekom 8 tjedana	1/14 (7,1)	N/P	1/14 (7,1)	1/14 (7,1)	N/P
	Ledipasvir i sofosbuvir tijekom 12 tjedana	0/39 (0,0)	0/9 (0,0)	0/30 (0,0)	0/34 (0,0)	0/5 (0,0)
	Ledipasvir i sofosbuvir tijekom 24 tjedna	1/7 (14,3)	1/7 (14,3)	N/P	N/P	1/7 (14,3)
	Sofosbuvir i peginterferon i ribavirin tijekom 12 tjedana	1/25 (4,0)	0/7 (0,0)	1/18 (5,6)	1/23 (4,3)	0/2 (0,0)
	Sofosbuvir i ribavirin tijekom 24 tjedna	0/6 (0,0)	0/1 (0,0)	0/5 (0,0)	0/5 (0,0)	0/1 (0,0)
	Sofosbuvir i simeprevir i/ili ribavirin tijekom 12 tjedana	9/63 (14,3)	8/29 (27,6)	1/34 (2,9)	9/54 (16,7)	0/9 (0,0)
	Sofosbuvir i simeprevir i/ili ribavirin tijekom 24 tjedna	0/4 (0,0)	0/4 (0,0)	N/P	0/2 (0,0)	0/2 (0,0)
2	Sofosbuvir i ribavirin tijekom 12 tjedana	8/66 (12,1)	6/22 (27,3)	2/44 (4,5)	7/60 (11,7)	1/6 (16,7)
3	Sofosbuvir i peginterferon i ribavirin tijekom 12 tjedana	0/3 (0,0)	0/3 (0,0)	N/P	0/1 (0,0)	0/2 (0,0)
	Sofosbuvir i ribavirin tijekom 24 tjedna	6/47 (12,8)	4/16 (25,0)	2/31 (6,5)	4/39 (10,3)	2/8 (25,0)

DRA = dodjela režima lijekova, GT = genotip, N/P = režim lijekova nije primjenjiv za ovu skupinu bolesnika

U Tablica 30 prikazuje se postotak ispitanika s virološkim odgovorom (definiranim kao rezultati kvantifikacijskog testa Aptima HCV Dx < LLoQ) za svaki genotip i dodjelu režima lijekova pri svakom posjetu tijekom tjedna liječenja i tjedna nakon liječenja. Većina ispitanika postigla je SVR do 4. tjedna u svim genotipovima, a svi ispitanici postigli su SVR do 8. tjedna.

Tablica 30: Vjerojatnost postizanja SVR-a tijekom tjedna liječenja i tjedna nakon liječenja

GT	DRA	N	Postignut SVR, % (n)	Nije postignut SVR, % (n)	Postotak ispitanika s virološkim odgovorom do posjeta[a] n (%)						
					Tjedni					EOT	PT04
					1	2	4	8	12		
1	LDV + SOF (8 tjedana)	14	92,9 (13/14)	7,1 (1/14)	42,9 (6/14)	76,9 (10/13)	100 (14/14)	N/P	N/P	100 (14/14)	90 (9/10)
	LDV + SOF (12 tjedana)	39	100 (39/39)	0,0 (0/39)	11,1 (4/36)	52,6 % (20/38)	92,1 (35/38)	100 (36/36)	N/P	100 (39/39)	100 (33/33)
	LDV + SOF (24 tjedna)	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 tjedana)	25	96,0 (24/25)	4,0 (1/25)	40,0 (10/25)	80,0 (20/25)	100 (25/25)	100 (25/25)	N/P	100 (25/25)	100 (25/25)
	SOF+RBV (24 tjedna)	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 tjedana)	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/P	96,6 (57/59)	90,0 (54/60)
	SOF+SIM+RBV (24 tjedna)	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 tjedna)	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/P	98,5 (64/65)	93,5 (58/62)
3	SOF+PEG+RBV (12 tjedana)	3	100 (3/3)	0,0 (0/3)	33,3 (1/3)	100 (2/2)	100 (3/3)	100 (2/2)	N/P	100 (3/3)	100 (3/3)
	SOF+RBV (24 tjedna)	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 = dodjela režima liječenja, EOT = kraj liječenja, N/P = nije primjenjivo jer posjet odgovara EOT-u za određeno liječenje ili je izvan vremenskog okvira liječenja, PT04 = 4. tjedan nakon liječenja

[a] Virusni odgovor tijekom liječenja i nakon liječenja definiran kao < 10 IU/mL.

Napomena: EOT nije uključen u tjedan liječenja.

U ispitanika s genotipom 1 95,5 % (150/157) procijenjenih ispitanika imalo je virusni odgovor tijekom liječenja do 4. tjedna. Sedam (7) ispitanika s genotipom 1 u kojih nije bilo odgovora do 4. tjedna (3 ispitanika liječena lijekovima LDV + SOF [12 tjedana], 2 ispitanika liječena lijekovima LDV + SOF [24 tjedna], 1 ispitanik liječen lijekovima SOF + RBV [24 tjedna] ili SOF + SIM ± RBV [12 tjedana]) imali su virusni odgovor tijekom liječenja do 8. tjedna. Dva (2) ispitanika liječena lijekovima SOF + SIM ± RBV (12 tjedana) imala su relaps do kraja liječenja, a 6 ispitanika (1 ispitanik liječen lijekovima LDF + SOF [8 tjedana], 1 ispitanik liječen lijekovima LDF + SOF [24 tjedna] i 4 ispitanika liječena lijekovima SOF + SIM ± RBV [12 tjedana]) imali su relaps do 4. tjedna nakon liječenja.

U ispitanika s genotipom 2 95,4 % (62/65) procijenjenih ispitanika imalo je virusni odgovor tijekom liječenja do 4. tjedna. Tri (3) ispitanika s genotipom 2 u kojih nije bilo odgovora do 4. tjedna imala su virusni odgovor tijekom liječenja do 8. tjedna. Jedan (1) ispitanik liječen lijekovima SOF + RBV (12 tjedana) imao je relaps do kraja liječenja, a 4 ispitanika s istom dodjelom režima lijekova imala su relaps do 4. tjedna nakon liječenja.

U ispitanika s genotipom 3, 100 % (49/49) procijenjenih ispitanika imalo je virusni odgovor tijekom liječenja do 4. tjedna. Nijedan (0) ispitanik nije imao relaps do kraja liječenja, a 5 ispitanika liječenih lijekovima SOF + RBV (24 tjedna) imalo je relaps do 4. tjedna nakon liječenja.

Na temelju rezultata ove studije kvantifikacijski test Aptima HCV Dx može se upotrebljavati kao pomoć u liječenju bolesnika zaraženih HCV-om koji se podvrgavaju antivirusnoj terapiji na bazi sofosbuvira te se može upotrebljavati za određivanje SVR odgovora i izostanka odgovora. Rezultati testa mogu se upotrebljavati za kvantitativno mjerenje razine HCV RNA-a u ljudskoj plazmi na početku i tijekom liječenja.

Studija dijagnostičke korisnosti

Osjetljivost je procijenjena u 338 ispitanika pozitivnih na HCV protutijela iz populacije visokog rizika. Tablica 31 prikazuje demografske i kliničke karakteristike ispitanika.

Tablica 31: Demografske i kliničke karakteristike ispitanika pozitivnih na HCV protutijela

Karakteristike		
Ukupno	*N*	338
Spol	Ženski, n (%)	80 (23,7)
	Muški, n (%)	258 (76,3)
Dob (godine)	Srednja vrijednost	48,2
	Medijan	51,0
	SD	11,01
	< 21, n (%)	2 (0,6)
	21-49, n (%)	152 (45,0)
	50-70, n (%)	182 (53,8)
	> 70, n (%)	2 (0,6)
Rasa / etnička pripadnost[a]	Bijelci, n (%)	86 (25,4)
	Crnci, n (%)	118 (34,9)
	Azijci, n (%)	1 (0,3)
	Hispanoamerikanci, n (%)	123 (36,4)
	Miješane etničke skupine, n (%)	4 (1,2)
	Ostalo, n (%)	10 (3,0)
	Nepoznato, n (%)	0 (0,0)
Čimbenici rizika[b]	Injekcijska uporaba droga, n (%)	294 (87,0)
	Primatelji faktora zgrušavanja proizvedenih prije 1990., n (%)	0 (0,0)
	Dijagnosticiran/liječen hepatitis, n (%)	172 (50,9)
	Dijagnosticiran/liječen HIV, n (%)	13 (3,8)
	Povijest boravka u zatvoru, n (%)	311 (92,0)
	Primanje transfuzije krvi ili krvnih sastojaka, n (%)	39 (11,5)
	Primanje transplantata, n (%)	0 (0,0)
	Hemodijaliza, n (%)	3 (0,9)
	Trajno povišene razine ALT-a, n (%)	2 (0,6)
	Rođeni između 1945. i 1965., n (%)	192 (56,8)
Status infekcije HCV-om	Pozitivni na HCV RNA, n (%)	259 (76,6)
	Negativni na HCV RNA, n (%)	79 (23,4)

ALT = alanin aminotransferaza, HIV = virus humane imunodeficijencije

[a] Može se navesti više rasa.

[b] Može se navesti više čimbenika rizika.

Ispitci su testirani odobrenim kvalitativnim testom na HCV RNA, odobrenim testom na HCV protutijela i kvantifikacijskim testom Aptima HCV Dx. Studija je obuhvatila 338 ispitanika reaktivnih na HCV protutijela. Prema trenutačnim smjernicama AASLD-a, za potvrdu pozitivnog statusa infekcije HCV-om nakon reaktivnog rezultata testa na HCV protutijela treba se upotrebljavati NAAT koji je odobrila agencija FDA s razinom detekcije od 25 IU/mL ili nižom.[20] Slaganje između statusa infekcije bolesnika i rezultata kvantifikacijskog testa Aptima HCV Dx određeno je pomoću granične vrijednosti od 25 IU/mL. Ispitci < 25 IU/mL smatrali su se „nedetektiranima", a ispitci s rezultatima ≥ 25 IU/mL smatrali su se „detektiranima". Pogledajte Tablica 32.

Rezultati kvantifikacijskog testa Aptima HCV Dx uspoređeni su sa statusom infekcije bolesnika na temelju odobrenih rezultata testa na HCV protutijela i odobrenih rezultata kvalitativnog RNA testa. Status infekcije bolesnika smatrao se HCV pozitivnim ako su i odobreni test na HCV protutijela i odobreni kvalitativni test imali reaktivne rezultate. Status infekcije bolesnika smatrao se HCV negativnim ako je odobreni test na HCV protutijela imao nereaktivan rezultat.

Od 338 ispitanika s reaktivnim rezultatima na HCV protutijela, 256 je detektirano kvantifikacijskim testom Aptima HCV Dx (% pozitivnog slaganja = 98,8 %). Od triju ispitanika u kojih je HCV RNA kvantificiran ispod 25 IU/mL ili nije detektiran, dva ispitanika imala su detektiran, ali ne i kvantificiran rezultat (HCV RNA < 10 IU/mL), a jedan ispitanik imao je kvantitativni rezultat za HCV RNA od 12 IU/mL.

Tablica 32: Slaganje između rezultata kvantifikacijskog testa Aptima HCV Dx sa statusom infekcije bolesnika pomoću granične vrijednosti od 25 IU/mL

Rezultat kvantifikacijskog testa Aptima HCV Dx	**Status infekcije bolesnika**		**Ukupno**
	HCV pozitivni	**HCV negativni**	
HCV RNA kvantificiran na ili iznad 25 IU/mL	256	0	256
HCV RNA kvantificiran ili detektiran ispod 25 IU/mL ili nije detektiran	3[a]	79	82
Ukupno	259	79	338
% pozitivnog slaganja (95 %-tni CI rezultata)	98,8 (96,7 – 99,6)	N/P	N/P
% negativnog slaganja (95 %-tni CI rezultata)	N/P	100 (95,4 – 100)	N/P

CI = interval pouzdanosti, N/P = nije primjenjivo

[a] Kvantifikacijski test Aptima HCV Dx detektirao je, ali nije kvantificirao HCV RNA (< 10 IU/mL) kod dvaju ispitanika, a treći ispitanik imao je kvantificirani HCV RNA od 12 IU/mL.

Ova studija pokazuje kliničku korisnost kvantifikacijskog testa Aptima HCV Dx za ispravno dijagnosticiranje u ispitanika s aktivnom HCV RNA infekcijom i za njihovo razlikovanje od ispitanika s neaktivnim infekcijama u populaciji s prethodnom izloženošću HCV-u (serologija pozitivna na HCV protutijela).

Križna reaktivnost u ispitanika s bolešću jetre koja nije povezana s HCV-om

Uzeti su uzorci seruma i plazme (n = 214) od osoba s drugim bolestima jetre (za koje aktivna infekcija HCV-om nije bila naznačena kao temeljni uzrok). Uzorci su testirani odobrenim anti-HCV testom i odobrenim kvalitativnim testom za HCV RNA kako bi se potvrdilo da su uzorci HCV negativni. Isključeno je 17 HCV pozitivnih uzoraka (s pozitivnim rezultatima anti-HCV testa i/ili reaktivnim rezultatima kvalitativnog testa za HCV RNA) i tri uzorka koji nisu ispunjavali uvjete. Testiranje kvantifikacijskim testom Aptima HCV Dx provedeno je interno uz tri serije kompleta reagensa. Tablica 33 prikazuje demografske podatke i status bolesti jetre ispitanika za 194 ispitanika koji su se mogli procijeniti.

Tablica 33: Demografske karakteristike ispitanika i status bolesti jetre

Karakteristike		Sve
Ukupno	N	194
Spol	n	193
	Ženski, n (%)	116 (60,1)
	Muški, n (%)	77 (39,9)
Dob (godine)	n	194
	Srednja vrijednost	55,2
	Medijan	56,0
	SD	12,19
	Minimalno	25
	Maksimalno	82
	21 – 49, n (%)	60 (30,9)
	50 – 70, n (%)	114 (58,8)
	> 70, n (%)	20 (10,3)
Etnička pripadnost	n	194
	Hispanoamerikanci ili Latinoamerikanci, n (%)	9 (4,6)
	Nisu Hispanoamerikanci ili Latinoamerikanci, n (%)	147 (75,8)
	Nepoznato, n (%)	38 (19,6)
	Odbijeno, n (%)	0 (0,0)
Rasa[a]	n	194
	Bijelci, n (%)	122 (62,9)
	Crnci ili Afroamerikanci, n (%)	20 (10,3)
	Azijci, n (%)	17 (8,8)
	Američki Indijanci / domoroci Aljaske, n (%)	0 (0,0)
	Havajci / domoroci Pacifika, n (%)	1 (0,5)
	Ostalo, n (%)	34 (17,5)
	Nepoznato, n (%)	2 (1,0)
	Odbijeno, n (%)	0 (0,0)
Bolest jetre[b]	n	194
	Autoimuni hepatitis, n (%)	31 (16,0)
	Alkoholna bolest jetre, n (%)	51 (26,3)
	Kronični HBV, n (%)	34 (17,5)
	Primarna bilijarna ciroza, n (%)	37 (19,1)
	NASH, n (%)	39 (20,1)
	Prijavljene višestruke bolesti jetre, n (%)	2 (1,0)

HBV = virus hepatitisa B, NASH = nealkoholni steatohepatitis

[a] Ispitanici su mogli navesti više rasa.

[b] Ispitanici s višestrukim bolestima jetre naveli su i autoimuni hepatitis i primarnu bilijarnu cirozu.

Tablica 34 prikazuje specifičnost kvantifikacijskog testa Aptima HCV Dx prema bolesti jetre i distribuciju rezultata kvantifikacijskog testa Aptima HCV Dx po kategorijama količine virusa u krvi. Specifičnost je iznosila 100 % u ispitanika s kroničnim virusom hepatitisa B (HBV), primarnom bilijarnom cirozom, nealkoholnim steatohepatitisom (NASH) i višestrukim bolestima jetre. HCV RNA detektiran je u vrlo niskim razinama u 1 ispitanika s autoimunim hepatitisom (< 10 IU/mL) i 4 ispitanika s alkoholnom bolešću jetre (< 10 IU/mL za 3 ispitanika i 16 IU/mL za 1 ispitanika). U jednog od 5 ispitanika HCV RNA detektiran je odobrenim kvantitativnim testom za HCV.

Tablica 34: Specifičnost kvantifikacijskog testa Aptima HCV Dx i rezultati distribucije u ispitanika negativnih na HCV protutijela i RNA s bolestima jetre koje nisu povezane s HCV-om

Bolest jetre	Specifičnost (%) 95-tni CI[a]	Nije detektirano	< 10 IU/mL	Od 10 do < 25 IU/mL	Od 25 do 100.000.000 IU/mL	> 100.000.000 IU/mL	Ukupno
Autoimuni hepatitis	96,8 (83,8-99,4)	30 (96,8)	1 (3,2)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	31
Alkoholna bolest jetre	92,2 (81,5-96,9)	47 (92,2)	3 (5,9)[b]	1 (2,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	51
Kronični HBV	100 (89,8-100)	34 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	34
Primarna bilijarna ciroza	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
Višestruke bolesti jetre[c]	100 (34,2-100)	2 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2
Ukupno	97,4 (94,1-98,9)	189 (97,4)	4 (2,1)	1 (0,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	194

HBV = virus hepatitisa B, NASH = nealkoholni steatohepatitis

[a] Interval pouzdanosti rezultata.

[b] U jednog ispitanika HCV RNA detektiran je kvantitativnim testom za HCV koji je odobrila agencija FDA.

[c] Ispitanici su imali i autoimuni hepatitis i primarnu bilijarnu cirozu.

Bibliografija

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. Objavljeno na hcvguidelines.org, pristupljeno 11. veljače 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; aktualna verzija.
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. CLSI Document 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. CLSI document 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. Ažurirano 21. ožujka 2014. Pristupljeno 1. ožujka 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.

Kontaktni podaci i povijest revizija



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

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

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

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

Armored RNA zaštitni je znak društva Asuragen, Inc.

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

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

©2016–2025 Hologic, Inc. Sva prava pridržana.

AW-28216-2501 Rev. 001

2025-12

Povijest revizija	Datum	Opis
AW-28216-2501 Rev. 001	Prosinac 2025.	• Početno izdanje.