

## Aptima™ HCV Quant Dx Assay

Per uso diagnostico *in vitro*.

Solo per l'esportazione dagli USA

<b>Informazioni generali</b> .....	<b>2</b>
Utilizzo previsto .....	2
Riepilogo e spiegazione del test .....	2
Principi della procedura .....	3
Avvertenze e precauzioni .....	4
Requisiti di conservazione e manipolazione dei reagenti .....	7
Raccolta e conservazione dei campioni .....	7
Campioni caricati sul Panther System .....	11
Trasporto dei campioni .....	11
<b>Panther System</b> .....	<b>12</b>
Reagenti e materiali forniti .....	12
Materiali richiesti ma disponibili separatamente .....	14
Materiali opzionali .....	15
Procedura di analisi del Panther System .....	15
Note procedurali .....	19
<b>Controllo della qualità</b> .....	<b>21</b>
Calibrazione del test .....	21
Controlli positivi e negativi .....	21
Calibratore interno/Controllo interno .....	21
<b>Interpretazione dei risultati</b> .....	<b>22</b>
<b>Limiti</b> .....	<b>23</b>
<b>Prestazioni</b> .....	<b>24</b>
Limite di rilevamento (LoD) utilizzando il Secondo Standard Internazionale dell'OMS .....	24
Limite di rilevamento nei genotipi dell'HCV .....	25
Range lineare .....	26
Linearità nei genotipi dell'HCV .....	27
Limite inferiore di quantificazione utilizzando il Secondo Standard Internazionale dell'OMS .....	27
Determinazione del limite inferiore di quantificazione (LLoQ) nei genotipi dell'HCV .....	29
Precisione .....	31
Sostanze potenzialmente interferenti .....	32
Specificità .....	33
Specificità analitica .....	34
Campioni clinici contenenti virus diversi dall'HCV .....	35
Ripetibilità dei campioni clinici .....	35
Diluizione dei campioni con il diluente per campioni biologici .....	36
Correlazione fra metodi .....	38
Concordanza diagnostica .....	38
Contaminazione crociata .....	39
Pannello di sieroconversione .....	39
<b>Bibliografia</b> .....	<b>40</b>

## **Informazioni generali**

### **Utilizzo previsto**

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

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

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

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

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

### **Riepilogo e spiegazione del test**

L'HCV è un patogeno a trasmissione ematica e un problema di salute pubblica mondiale con 170 milioni di persone infettate a livello mondiale e 350.000 decessi annuali dovuti a patologie associate all'HCV, tra cui cirrosi e carcinoma epatico.<sup>1,2</sup> La trasmissione dell'HCV avviene attraverso l'esposizione al sangue, ai prodotti ematici o ad attività con un potenziale di esposizione percutanea.<sup>3,4</sup> Geneticamente, l'HCV contiene un genoma RNA a filamento positivo di circa 9500 nucleotidi che codificano le proteine strutturali (glicoproteine core, E1 ed E2, proteina canale ionico p7) e le proteine non strutturali (NS2, NS3, NS4A/B, NS5A/B); queste ultime sono proteine replicative virali fondamentali e i bersagli degli antivirali ad azione diretta.<sup>4,5</sup> Due regioni non tradotte (UTR) del genoma, 5'UTR e 3'UTR, hanno dei ruoli nella traduzione genomica e nella replicazione/impacchettamento rispettivamente.<sup>5</sup> La regione 5'UTR è la regione genomica più altamente conservata nei sei principali genotipi dell'HCV.<sup>6</sup>

Clinicamente, vi è un'elevata prevalenza di infezione da HCV asintomatica e, nonostante l'anticorpo rilevabile (generalmente entro 5-12 settimane), l'infezione da HCV cronica si verifica nel 75% dei pazienti.<sup>2</sup> Gli algoritmi dei test di laboratorio per l'HCV richiedono una diagnosi di infezioni da HCV attive negli individui positivi agli anticorpi tramite il rilevamento dell'RNA dell'HCV nel plasma o nel siero per consentire il collegamento appropriato alla cura.<sup>7,8,9</sup>

La quantificazione dell'RNA dell'HCV (carica virale) ha giocato un ruolo fondamentale nella definizione e nel monitoraggio del trattamento di successo dell'HCV. La risposta virologica sostenuta (SVR), definita come RNA dell'HCV non rilevato dopo una terapia con esito positivo, è un indicatore chiave per una cura dell'HCV.<sup>10,11</sup> Nella terapia a base di interferone, una risposta virologica precoce (EVR), definita come una riduzione 2 log o superiore della carica virale dell'HCV dopo 12 settimane di terapia, e una risposta virologica rapida (RVR), definita come livelli non rilevabili di RNA dell'HCV dopo 4 settimane di terapia, hanno dimostrato di essere predittori positivi della SVR.<sup>10,12,13</sup> Questi indicatori di cinetica virale sono utilizzati in approcci basati sulla risposta che personalizzano le opzioni di trattamento per interrompere o prolungare la terapia per ottenere l'SVR.<sup>14</sup> Inoltre, gli studi di follow-up a lungo termine hanno dimostrato la persistenza dell'SVR dopo il trattamento efficace, mentre l'eradicazione virale previene la progressione dell'epatopatia.<sup>10</sup>

Nell'era degli antivirali ad azione diretta (DAA), le misurazioni della carica virale dell'HCV vengono effettuate prima della terapia per stabilire la carica virale al basale, durante il trattamento per le risposte in corso di trattamento e dopo la terapia per valutare l'SVR (o recidiva). Quasi tutti i pazienti ottengono risposte virologiche in corso di trattamento ai DAA definite come al di sotto del limite inferiore di quantificazione (< LLoQ) del test, seguite da tassi di SVR superiori al 90% dopo 12 settimane dalla terapia con la maggior parte dei regimi.<sup>8,11</sup> La rilevazione e la quantificazione dell'RNA dell'HCV continuerà a giocare un ruolo fondamentale nella diagnosi dell'HCV e nella gestione dei pazienti sottoposti a terapia antivirale.

## Principi della procedura

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

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

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

L'amplificazione del target avviene tramite TMA, che è un metodo di amplificazione degli acidi nucleici mediato da trascrizione che utilizza due enzimi, la trascrittasi inversa del virus della leucemia murina di Moloney (MMLV) e la polimerasi dell'RNA T7. La trascrittasi inversa viene usata per generare una copia di DNA (contenente una sequenza promotrice della polimerasi dell'RNA T7) della sequenza target. La polimerasi dell'RNA T7 produce copie multiple di amplicone di RNA dal modello della copia di DNA. L'Aptima HCV Quant Dx Assay utilizza il metodo TMA per amplificare una porzione della regione 5'UTR del genoma

dell'HCV. L'amplificazione di questa regione si ottiene utilizzando primer specifici progettati per amplificare i genotipi dell'HCV 1, 2, 3, 4, 5 e 6.

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

## Avvertenze e precauzioni

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

## Pertinenti al laboratorio



- B. **ATTENZIONE:** i controlli di questo test contengono plasma umano. Il plasma è negativo all'antigene di superficie dell'epatite B (HBsAg), agli anticorpi anti-HCV, agli anticorpi anti-HIV-1 e anti-HIV-2 e all'antigene dell'HIV quando analizzato con le procedure autorizzate dalla US Food and Drug Administration. Inoltre, il plasma non è reattivo all'RNA dell'HCV e all'RNA dell'HIV-1 quando analizzato con test degli acidi nucleici autorizzati che utilizzano campioni combinati in pool. Tutti i materiali provenienti dal sangue umano devono essere considerati potenzialmente infettivi ed essere maneggiati rispettando le Precauzioni universali.<sup>15,16,17</sup>
- C. Solo il personale adeguatamente formato nell'utilizzo dell'Aptima HCV Quant Dx Assay e nella manipolazione di materiali potenzialmente infettivi deve eseguire questa procedura. Se si verifica un versamento, disinfettare immediatamente seguendo le procedure del centro appropriate.
- D. Usare solo contenitori da laboratorio monouso forniti o indicati in modo specifico come monouso.
- E. Adottare le consuete precauzioni di laboratorio. Non pipettare con la bocca. Non mangiare, bere né fumare nelle aree di lavoro designate. Quando si maneggiano campioni e reagenti del kit, indossare guanti monouso senza talco, occhiali protettivi e camici da laboratorio. Lavarsi accuratamente le mani dopo aver maneggiato campioni e reagenti del kit.
- F. Le superfici di lavoro, le pipette e le altre apparecchiature devono essere decontaminate regolarmente con una soluzione di ipoclorito di sodio al 2,5% – 3,5% (da 0,35 M a 0,5 M).

- G. Smaltire tutti i materiali che sono venuti a contatto con i campioni biologici e con i reagenti in conformità alle normative locali, statali e federali.<sup>15,16,17,18</sup> Pulire e disinfettare accuratamente tutte le superfici di lavoro.
- H. I controlli contengono azoturo di sodio come conservante. Non utilizzare tubi metallici per il trasferimento dei reagenti. Se soluzioni contenenti composti dell'azoturo di sodio vengono smaltite in un sistema idraulico, devono essere diluite e scaricate con abbondanti quantità di acqua corrente. Queste precauzioni sono consigliate per evitare l'accumulo di depositi nelle tubazioni metalliche in cui potrebbero svilupparsi condizioni esplosive.
- I. Le buone pratiche standard per i laboratori molecolari includono il monitoraggio ambientale. Per monitorare l'ambiente di un laboratorio, si consiglia la seguente procedura:
1. Munirsi di un bastoncino di ovatta e abbinarlo a una provetta per aliquota di campione (SAT) Aptima.
  2. Etichettare in maniera appropriata ogni SAT.
  3. Riempire ogni SAT con 1 ml di diluente dei campioni Aptima.
  4. Per raccogliere i campioni dalle superfici, inumidire leggermente un bastoncino di ovatta con acqua deionizzata priva di nucleasi.
  5. Passare il bastoncino di ovatta sulla superficie di interesse con un movimento verticale dall'alto verso il basso. Ruotare il bastoncino di ovatta di circa mezzo giro mentre lo si passa sulla superficie.
  6. Collocare immediatamente nella provetta il bastoncino con il campione e roteare delicatamente il bastoncino nel diluente per estrarre gli eventuali materiali prelevati. Strizzare il bastoncino sul lato della provetta di trasporto per far fuoriuscire quanto più liquido possibile. Gettare il bastoncino e tappare la provetta.
  7. Ripetere queste fasi per i rimanenti bastoncini con i campioni.
  8. Analizzare il bastoncino con il test molecolare.

### **Pertinenti ai campioni**

- J. I campioni potrebbero essere infettivi. Durante l'esecuzione di questo test, adottare le Precauzioni universali<sup>15,16,17</sup>. È necessario stabilire metodi di manipolazione e smaltimento adeguati in conformità alle normative locali.<sup>18</sup> Solo il personale adeguatamente formato nell'utilizzo dell'Aptima HCV Quant Dx Assay e nella manipolazione di materiali potenzialmente infettivi deve eseguire questa procedura.
- K. Mantenere le corrette condizioni di conservazione durante la spedizione del campione per assicurarne l'integrità. La stabilità del campione in condizioni di spedizione diverse da quelle raccomandate non è stata determinata.
- L. Evitare la contaminazione crociata durante i procedimenti di manipolazione dei campioni. Prestare particolare attenzione a evitare la contaminazione provocata dalla diffusione degli aerosol quando si allentano o si tolgono i tappi dei contenitori dei campioni. I campioni possono contenere livelli di organismi estremamente alti. Assicurarsi che i

contenitori dei campioni non vengano in contatto tra di loro ed eliminare i materiali usati senza farli passare sopra i contenitori aperti. Cambiare i guanti se vengono a contatto con i campioni.

**Pertinenti al test**

- M. Non utilizzare il kit di reagenti, il calibratore o i controlli dopo la data di scadenza.
- N. Non scambiare, mescolare o combinare reagenti del test provenienti da kit con numeri di lotto master diversi. I liquidi del test possono avere numeri di lotto diversi. I controlli e il calibratore possono avere numeri di lotto diversi.
- O. Evitare la contaminazione microbica e da nucleasi dei reagenti.
- P. Tappare e conservare tutti i reagenti del test alle temperature specificate. L'uso di reagenti conservati in modo improprio può influire sulle prestazioni del test. Consultare *Requisiti di conservazione e manipolazione dei reagenti e Procedura di analisi del Panther System* per maggiori informazioni.
- Q. Non combinare reagenti o liquidi del test senza istruzioni specifiche. Non rabboccare i flaconi di reagenti o liquidi. Il Panther System verifica i livelli dei reagenti.

## Requisiti di conservazione e manipolazione dei reagenti

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

Reagente	Conservazione a confezione chiusa	Kit aperto (ricostituito)	
		Conservazione	Stabilità
Reagente di amplificazione qHCV	da 2 °C a 8 °C		
Soluzione di ricostituzione amplificazione qHCV	da 2 °C a 8 °C	da 2 °C a 8 °C	30 giorni <sup>a</sup>
Reagente enzimatico qHCV	da 2 °C a 8 °C		
Soluzione di ricostituzione enzimatica qHCV	da 2 °C a 8 °C	da 2 °C a 8 °C	30 giorni <sup>a</sup>
Reagente promotore qHCV	da 2 °C a 8 °C		
Soluzione di ricostituzione promotrice qHCV	da 2 °C a 8 °C	da 2 °C a 8 °C	30 giorni <sup>a</sup>
Reagente di cattura del target qHCV	da 2 °C a 8 °C	da 2 °C a 8 °C	30 giorni <sup>a</sup>
qHCV NC CONTROL – (Controllo negativo)	da -15 °C a -35 °C	da 15 °C a 30 °C	Fiala monouso Utilizzare entro 24 ore
qHCV LPC CONTROL + (Controllo positivo basso)	da -15 °C a -35 °C	da 15 °C a 30 °C	Fiala monouso Utilizzare entro 24 ore
qHCV HPC CONTROL + (Controllo positivo alto)	da -15 °C a -35 °C	da 15 °C a 30 °C	Fiala monouso Utilizzare entro 24 ore
qHCV PCAL (Calibratore positivo)	da -15 °C a -35 °C	da 15 °C a 30 °C	Fiala monouso Utilizzare entro 24 ore

<sup>a</sup> Quando i reagenti vengono rimossi dal Panther System, devono essere immediatamente riportati alle loro temperature di conservazione appropriate.

- B. Smaltire qualsiasi reagente ricostituito inutilizzato e il reagente di cattura del target (TCR) dopo 30 giorni o dopo la data di scadenza del lotto master, a seconda di quale data cada per prima.
- C. I reagenti conservati sul Panther System sono stabili per 72 ore quando sono conservati sullo strumento. I reagenti possono essere caricati nel Panther System fino a 5 volte. Il Panther System registra ogni volta che i reagenti vengono caricati.
- D. Dopo lo scongelamento del calibratore, la soluzione deve essere trasparente, ossia non torbida o con precipitati.
- ⚠ E. Il reagente promotore e il reagente promotore ricostituito sono fotosensibili. Proteggere questi reagenti dalla luce durante la conservazione e la preparazione per l'uso.

## Raccolta e conservazione dei campioni

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

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

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

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

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

#### A. Raccolta dei campioni

Il sangue intero può essere conservato a una temperatura di 2 °C – 30 °C e deve essere centrifugato entro 6 ore dalla raccolta del campione. Separare il plasma o il siero dal pellet di globuli rossi seguendo le istruzioni del produttore della provetta utilizzata. Il plasma o il siero possono essere analizzati sul Panther System nella provetta primaria o essere trasferiti in una provetta per aliquota di campione (SAT) Aptima secondaria. Per ottenere il volume di reazione di 500 µl, il volume minimo di siero o di plasma per le provette di raccolta primarie è 1200 µl, mentre per le SAT il volume minimo è 700 µl.

Se non analizzati immediatamente, il plasma e il siero possono essere conservati in conformità alle specifiche riportate in basso. Se trasferiti nella SAT, il plasma o il siero possono essere congelati a -20 °C. Non superare 3 cicli di congelamento/scongelo. Non congelare i campioni in provette di raccolta primarie contenenti EDTA, ACD o siero.

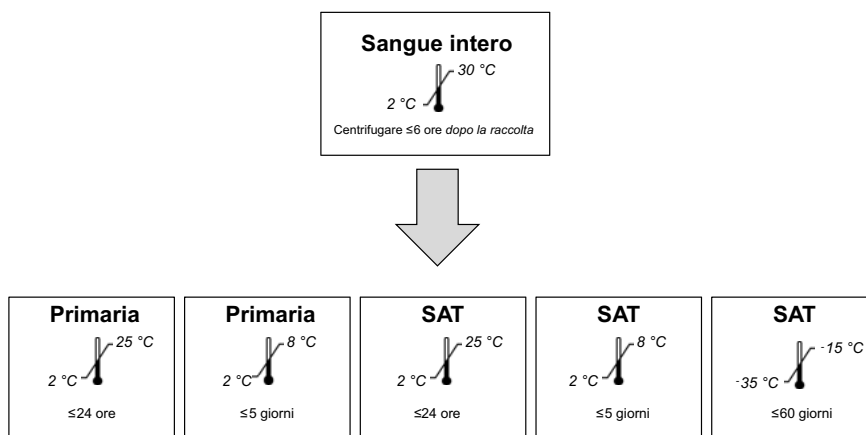
#### B. Condizioni di conservazione dei campioni

##### 1. Campioni di plasma con EDTA e ACD

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

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



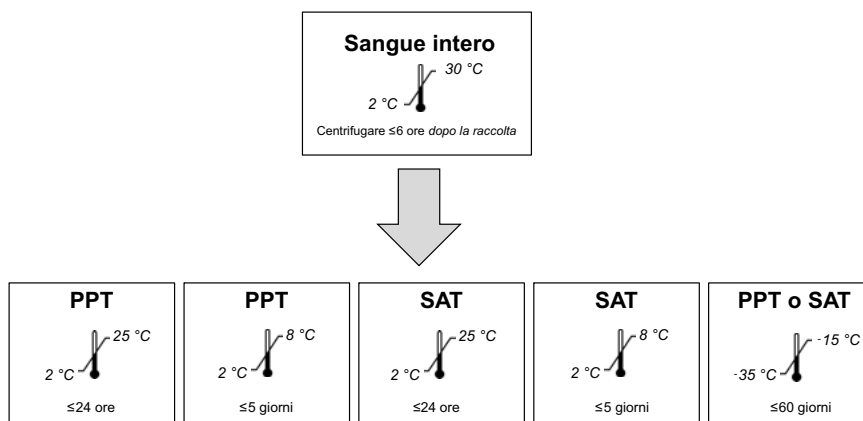


**Figura 1. Condizioni di conservazione delle provette con EDTA/ACD**

## 2. Campioni nelle PPT

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

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



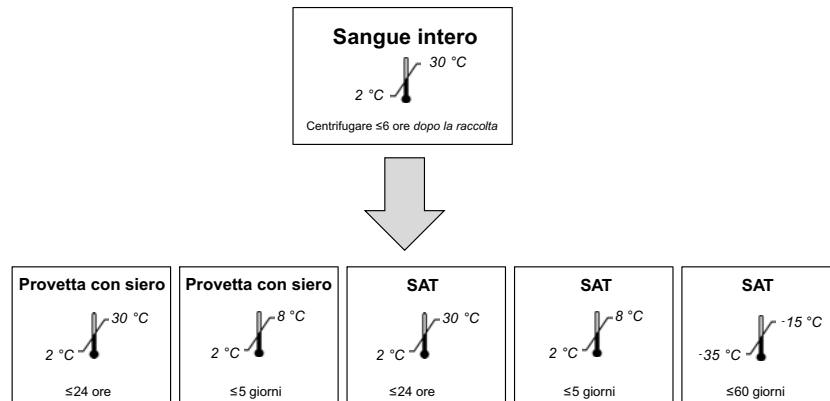
**Figura 2. Condizioni di conservazione per le PPT**

## 3. Campioni in provette con siero

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

- Nella provetta di raccolta primaria o nella SAT a 2 °C – 30 °C per un periodo massimo di 24 ore,

- Nella provetta di raccolta primaria o nella SAT a 2 °C – 8 °C per un periodo massimo di 5 giorni oppure
- Nella SAT a -20 °C per un periodo massimo di 60 giorni.

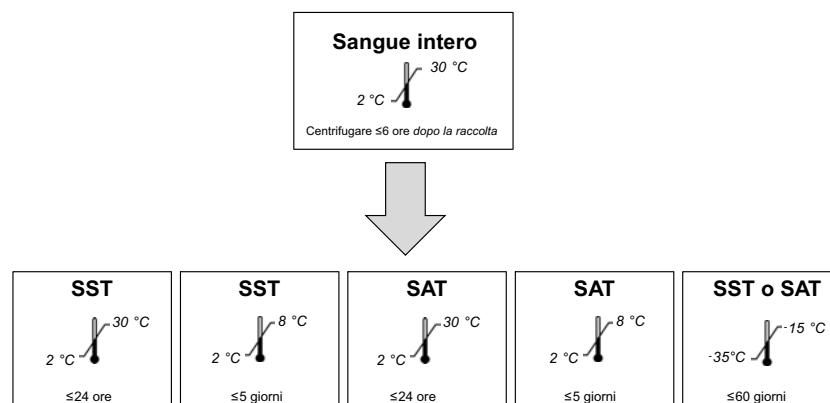


**Figura 3. Condizioni di conservazione delle provette contenenti siero**

4. Campioni nelle SST

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

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



**Figura 4. Condizioni di conservazione delle SST**

C. Conservazione in congelatore a lungo termine

I campioni di plasma o di siero possono essere conservati a -70 °C per un periodo massimo di 60 giorni nelle SAT.

#### D. Diluizione di campioni di plasma e siero

I campioni di plasma e di siero possono essere diluiti nella SAT per l'analisi sul Panther System. Consultare *Procedura di analisi del Panther System*, Passaggio E.6 in basso per maggiori informazioni.

⚠ *La diluizione di campioni di sangue e di siero può essere utilizzata esclusivamente per risultati quantitativi. Non diluire campioni di plasma o di siero per risultati diagnostici.*

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

### Campioni caricati sul Panther System

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

### Trasporto dei campioni

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

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

## Panther System

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

### Reagenti e materiali forniti

**Nota:** per informazioni sulle dichiarazioni relative a pericoli e precauzioni che possono essere associate ai reagenti, consultare la libreria delle schede dei dati sulla sicurezza reperibile sul sito web [www.hologic.com/sds](http://www.hologic.com/sds).

**Kit Aptima HCV Quant Dx Assay**, 100 test, n. di cat. PRD-03506

(1 scatola del test, 1 kit calibratore e 1 kit controlli)

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

#### Scatola dell'Aptima HCV Quant Dx Assay

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

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

**Kit calibratore Aptima HCV Quant Dx** (n. di cat. PRD-03507)  
(alla consegna, conservare a una temperatura compresa fra -15 °C e -35 °C)

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

**Kit controlli Aptima HCV Quant Dx** (n. di cat. PRD-03508)  
(alla consegna, conservare a una temperatura compresa fra -15 °C e -35 °C)

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

**Materiali richiesti ma disponibili separatamente**

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

<b>Materiale</b>	<b>N. di cat.</b>
Panther System	—
Kit sessione analitica Panther per test in tempo reale (esclusivamente per test in tempo reale)	PRD-03455 (5000 test)
<i>Kit di liquidi per l'Aptima Assay (noto anche come kit dei liquidi universale) contiene soluzione di lavaggio Aptima, tampone Aptima per liquidi di disattivazione e reagente oleoso Aptima</i>	303014 (1000 test)
<i>Unità multiprovetta (MTU)</i>	104772-02
<i>Kit di sacchetti per rifiuti Panther</i>	902731
<i>Coperchio del contenitore per rifiuti Panther</i>	504405
Oppure Kit sessione analitica Panther System <i>(durante l'esecuzione di test TMA non in tempo reale in parallelo con test TMA in tempo reale) contiene MTU, sacchetti per rifiuti, coperchi del contenitore per i rifiuti, rilevamento automatico e liquidi del test</i>	303096 (5000 test)
Puntali, 1000 µl conduttivi, rilevatori di liquido	10612513 (Tecan)
Candeggina, soluzione di ipoclorito di sodio al 5% – 7% (da 0,7 M a 1,0 M)	—
Guanti monouso senza talco	—
Tappi non penetrabili di ricambio	103036A
Tappi di ricambio per reagenti	
<i>Flaconi di ricostruzione reagente di amplificazione, enzimatico e promotore</i>	CL0041 (100 tappi)
<i>Flacone TCR</i>	CL0040 (100 tappi)
Teli da banco di laboratorio plastificati	—
Panni che non lasciano pelucchi	—
Pipettatore	—
Puntali	—
È consentito usare provette di raccolta primarie delle seguenti dimensioni:	—
<i>13 mm x 100 mm</i>	
<i>13 mm x 75 mm</i>	
<i>16 mm x 100 mm</i>	
Centrifuga	—
Miscelatore vortex	—

## Materiali opzionali

Materiale	N. di cat.
Provette per aliquota di campione (SAT) (confezione da 100)	503762
Tappo per provette di trasporto (confezione da 100) <i>tappo per SAT</i>	504415
Diluente del campione Aptima	PRD-03003
Kit diluente del campione Aptima <i>contiene diluente per campioni, 100 SAT e 100 tappi</i>	PRD-03478
Pipette di trasferimento	—
Pannelli disponibili in commercio, tra cui, ad esempio: <i>HCV di Quality Control for Molecular Diagnostics (QCMD) oppure pannelli ACCURUN HCV di SeraCare</i>	—
Bastoncini di ovatta	—
Agitatore oscillante per provette	—

## Procedura di analisi del Panther System

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

### A. Preparazione dell'area di lavoro

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

### B. Preparazione del calibratore e dei controlli

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

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

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

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

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

C. Ricostituzione del reagente/preparazione di un nuovo kit

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

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

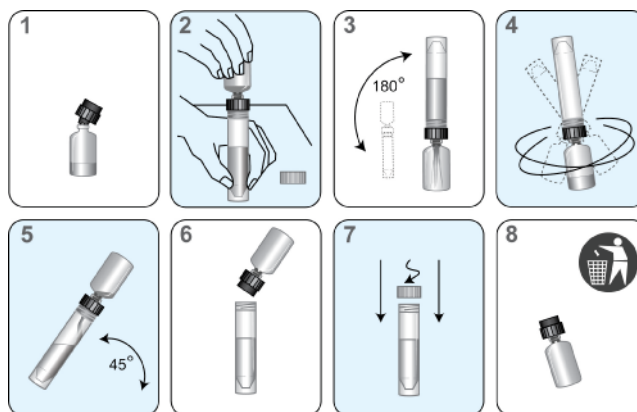
**Opzione.** Il flacone può essere preparato su un agitatore oscillante per provette attenendosi a queste istruzioni: rimuovere il TCR dal luogo in cui è conservato (a 2 °C – 8 °C) e agitarlo immediatamente in modo vigoroso per 10 volte. Collocare il flacone di TCR su un agitatore oscillante per provette e lasciare il TCR a riscaldarsi a 15 °C – 30 °C per almeno 45 minuti.

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



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

**Avvertenza:** evitare la formazione di schiuma eccessiva durante la ricostituzione dei reagenti. La schiuma pregiudica la sensibilità di rilevamento dei livelli nel Panther System.



**Figura 5. Processo di ricostituzione dei reagenti**

**D. Preparazione di reagenti per i reagenti precedentemente preparati**

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

**E. Manipolazione dei campioni**

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

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

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

6. Diluizione di un campione di plasma o siero nella SAT

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

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

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

- a. Diluizione di campioni con volume ridotto

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

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

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

- b. Diluizione di campioni con alto titolo

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

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

I campioni diluiti 1:100 possono essere analizzati utilizzando l'Opzione 1:100 sul Panther System. Per ulteriori informazioni vedere il *Panther System Operator's Manual* (Manuale per l'operatore del Panther System). Il software riporterà automaticamente il risultato per il campione non diluito applicando il fattore di diluizione. Questi campioni saranno segnalati come campioni diluiti.

**Nota:** per i campioni diluiti con concentrazioni di campioni non diluiti maggiori dell'ULoQ, i risultati saranno riportati utilizzando la notazione scientifica.

## F. Preparazione del sistema

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

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

**Nota:** se contemporaneamente si eseguono altri test e si analizzano altri tipi di campioni, fissare il fermo campioni prima di caricare la rastrelliera campioni in uno scomparto campioni.
  - g. Ripetere i passaggi da 2.a a 2.f per la successiva rastrelliera campioni.

**Note procedurali**

## A. Calibratore e controlli

1. Le provette del calibratore positivo qHCV, del controllo positivo basso qHCV, del controllo positivo alto qHCV e del controllo negativo qHCV possono essere caricate in una posizione qualsiasi nella rastrelliera campioni e in una corsia qualsiasi dello scomparto campioni sul Panther System. Il pipettaggio dei campioni inizierà quando verrà soddisfatta una delle due seguenti condizioni:
  - a. Il calibratore e i controlli sono in fase di trattamento sul sistema.
  - b. Nel sistema vengono registrati risultati validi per il calibratore e per i controlli.
2. Quando le provette del calibratore e dei controlli sono state pipettate e sono in fase di trattamento per il kit reagenti Aptima HCV Quant Dx Assay, i campioni biologici possono essere analizzati con il kit ricostituito ad essi associato per un massimo di 24 ore **a meno che:**
  - a. Il risultato del calibratore o i risultati dei controlli risultino non validi.
  - b. Il kit di reagenti del test associato venga rimosso dal sistema.
  - c. Il kit di reagenti del test associato abbia superato i limiti di stabilità.

3. La provetta del calibratore e la provetta di ogni controllo possono essere utilizzate solo una volta. Se si tenta di utilizzare la provetta più di una volta, è possibile che si verifichino errori di trattamento.

B. Talco dei guanti

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

## **Controllo della qualità**

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

### **Calibrazione del test**

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

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

### **Controlli positivi e negativi**

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

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

### **Calibratore interno/Controllo interno**

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

Il software del Panther System è progettato per verificare in maniera accurata i processi quando le procedure vengono eseguite rispettando le istruzioni fornite in questo inserto informativo e nel *Panther System Operator's Manual* (Manuale per l'operatore del Panther System).

## Interpretazione dei risultati

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

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

Il Panther System non fornisce un risultato qualitativo (cioè, "Reattivo" oppure "Non reattivo") per uso diagnostico. L'operatore deve interpretare in un risultato qualitativo la concentrazione di RNA dell'HCV riportata (Tabella 1). I campioni biologici con risultati elencati come "Non rilevato" sono non reattivi per l'RNA dell'HCV. I campioni biologici con risultati elencati come "<10 rilevati", con risultati che rientrano nel range lineare e >100.000.000 (limite superiore di quantificazione) indicano rilevamento del RNA dell'HCV e questi campioni sono reattivi per l'RNA dell'HCV.

Tabella 1: Interpretazione dei risultati.

Risultato Aptima HCV Quant Dx Assay riportato		Interpretazione Della Concentrazione Dell'rna Dell'hcv	Interpretazione diagnostica qualitativa dell'utilizzatore <sup>a</sup>
UI/ml	Valore $\log_{10}$ <sup>b</sup>		
Non rilevato	Non rilevato	Rna Dell'hcv Non Rilevato.	Non reattivo per l'RNA dell'HCV.
<10 rilevati	<1,00	L'rna Dell'hcv È Stato Rilevato, Ma A Un Livello Inferiore Al LLoQ.	Reattivo per l'RNA dell'HCV.
da 10 a 100.000.000	da 1,00 a 8,00	La Concentrazione Di Rna Dell'hcv Rientra Nel Range Lineare Compreso Fra 10 E 100.000.000 UI/ml.	Reattivo per l'RNA dell'HCV.
>100.000.000	>8,00	La Concentrazione Di Rna Dell'hcv È Superiore All'ULoQ.	Reattivo per l'RNA dell'HCV.
Non valido. <sup>c</sup>	Non valido. <sup>c</sup>	Si È Verificato Un Errore Nella Generazione Del Risultato. Il Campione Biologico Deve Essere Rianalizzato.	Non valido.

<sup>a</sup> L'interpretazione diagnostica può essere effettuata con campioni di siero o di plasma che non sono stati diluiti.

<sup>b</sup> Il valore viene troncato a due posizioni decimali.

<sup>c</sup> I risultati non validi vengono visualizzati in blu.

**Limiti**

- A. L'uso di questo test va limitato al personale che è stato addestrato nella relativa procedura. La mancata osservanza delle istruzioni fornite in questo foglietto illustrativo può determinare risultati erranei.
- B. L'affidabilità dei risultati è subordinata alla raccolta, al trasporto, alla conservazione e al trattamento adeguati del campione.

## **Prestazioni**

### **Limite di rilevamento (LoD) utilizzando il Secondo Standard Internazionale dell'OMS**

Si definisce limite di rilevamento (LoD) la concentrazione di RNA dell'HCV rilevata con una probabilità del 95% o maggiore in conformità alla linea guida CLSI EP17-A2.<sup>19</sup>

Il LoD è stato determinato analizzando pannelli che consistevano di diluizioni del Secondo Standard Internazionale dell'OMS per l'RNA del virus dell'epatite C (NIBSC 96/798, genotipo 1) in plasma e siero umano negativi all'HCV. Un minimo di 36 replicati di ciascuna diluizione sono stati analizzati con ciascuno dei tre lotti di reagenti per un minimo di 108 replicati per ciascuna diluizione. È stata eseguita l'analisi Probit per generare i limiti di rilevamento previsti. I valori LoD mostrati nella Tabella 2 sono i risultati del lotto di reagenti con il limite di rilevamento previsto più alto. Il LoD per l'Aptima HCV Quant Dx Assay utilizzando il Secondo Standard Internazionale dell'OMS è 4,3 UI/ml per il plasma e 3,9 UI/ml per il siero.

Tabella 2: Limite di rilevamento utilizzando il Secondo Standard Internazionale dell'OMS per l'HCV

Limite di rilevamento previsto	Concentrazione (UI/ml)	
	Plasma	Siero
10%	0,3	0,3
20%	0,4	0,5
30%	0,5	0,6
40%	0,7	0,8
50%	0,9	1,0
60%	1,1	1,2
70%	1,5	1,5
80%	2,0	2,0
90%	3,0	2,9
95%	4,3	3,9



### Limite di rilevamento nei genotipi dell'HCV

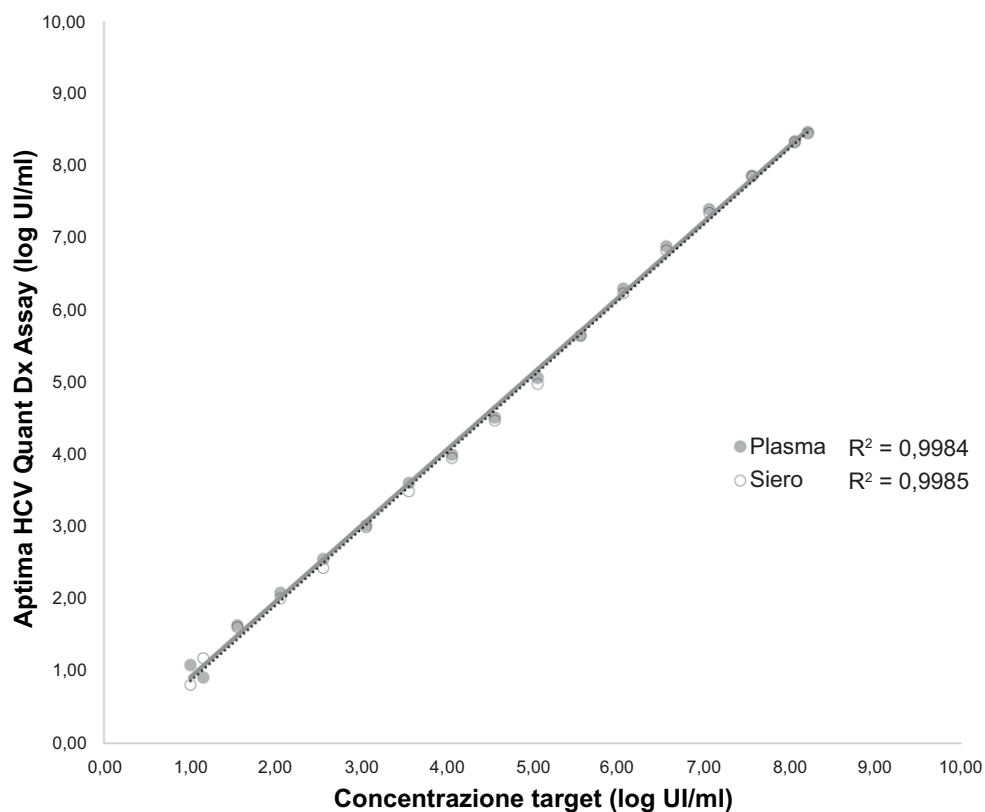
Il LoD è stato determinato analizzando diluizioni di campioni biologici clinici positivi all'HCV per i genotipi 1, 2, 3, 4, 5 e 6 in plasma e siero umani negativi all'HCV. Le concentrazioni sono state determinate utilizzando un test di confronto con marcatura CE. Un minimo di 20 replicati di ogni elemento del pannello sono stati analizzati con ciascuno dei tre lotti di reagenti per un minimo di 60 replicati per ogni elemento del pannello. L'analisi Probit è stata eseguita per generare limiti di rilevamento previsti del 50% e 95%. I valori LoD mostrati nella Tabella 3 sono i risultati del lotto di reagenti con il limite di rilevamento previsto più alto.

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

Genotipo	Limite di rilevamento previsto	Concentrazione (UI/ml)	
		Plasma	Siero
1	50%	0,8	1,3
	95%	3,8	5,1
2	50%	1,0	1,1
	95%	2,8	4,0
3	50%	1,1	1,0
	95%	4,3	3,4
4	50%	1,3	0,7
	95%	4,8	2,3
5	50%	0,8	0,9
	95%	2,1	3,2
6	50%	0,6	0,9
	95%	3,9	3,9

## Range lineare

Il range lineare è stato stabilito analizzando pannelli di Armored RNA dell'HCV diluito in plasma o siero umani negativi all'HCV in conformità alle linee guida CLSI EP06-A.<sup>20</sup> La concentrazione dei pannelli era compresa fra 1,0 log UI/ml e 8,2 log UI/ml. L'Aptima HCV Quant Dx Assay ha dimostrato linearità nel range analizzato con un limite superiore di quantificazione (ULoQ) di 8,0 log UI/ml come mostrato nella Figura 6.



**Figura 6. Linearità nel plasma e nel siero**

### Linearità nei genotipi dell'HCV

La risposta lineare per i genotipi 1, 2, 3, 4, 5 e 6 è stata confermata dall'analisi dei pannelli costituiti da trascritto di HCV diluito in tampone a concentrazioni comprese fra 1,36 log UI/ml e 7,36 log UI/ml. L'analisi è stata eseguita su tre Panther System utilizzando tre lotti di reagenti. La linearità è stata dimostrata nel range testato per tutti i genotipi analizzati come illustrato nella Figura 7.

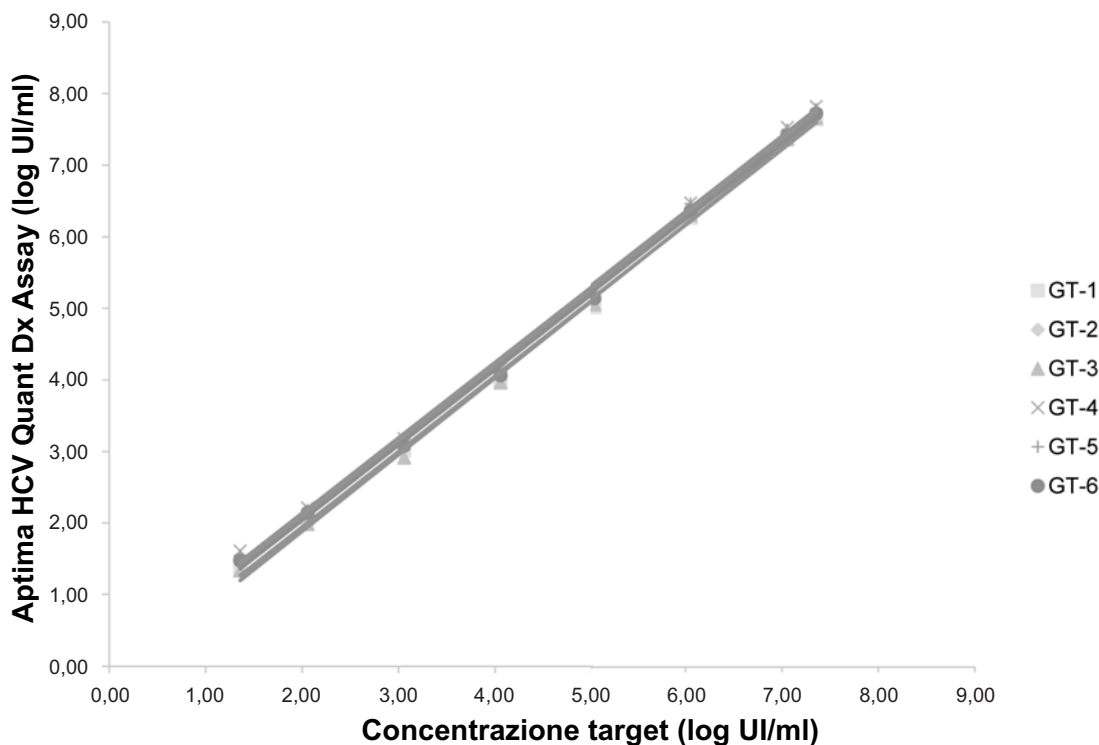


Figura 7. Linearità nei genotipi dell'HCV 1-6

### Limite inferiore di quantificazione utilizzando il Secondo Standard Internazionale dell'OMS

Si definisce limite inferiore di quantificazione (LLoQ) la concentrazione più bassa alla quale l'RNA dell'HCV viene quantificato in modo affidabile nei limiti di un errore totale in conformità alla linea guida CLSI EP17-A2.<sup>19</sup> L'errore totale è stato stimato mediante due metodi: errore totale analitico (TAE) = bias + 2DS ed errore totale (TE) = SQRT(2) x 2DS. Per garantire l'accuratezza e la precisione delle misurazioni, l'errore totale dell'Aptima HCV Quant Dx Assay è stato impostato a 1 log UI/ml (vale a dire che al LLoQ, la differenza tra due misurazioni di più di 1 log UI/ml ha significatività statistica).

Il LLoQ è stato determinato analizzando pannelli che consistevano di diluizioni del Secondo Standard Internazionale dell'OMS per l'RNA del virus dell'epatite C (NIBSC 96/798, genotipo 1) in plasma e siero umano negativi all'HCV. Un minimo di 36 replicati di ciascuna diluizione sono stati analizzati con ciascuno dei tre lotti di reagenti per un minimo di 108 replicati per ciascuna diluizione. I risultati del lotto di reagenti con la concentrazione più elevata pari o superiore al LoD che soddisfa i requisiti di TE e TAE sono illustrati nella Tabella 4 per il plasma e nella Tabella 5 per il siero. Il LLoQ per il Secondo Standard Internazionale dell'OMS è di 7 UI/ml (0,82 log UI/ml) per il plasma e 9 UI/ml (0,93 log UI/ml) per il siero, come riepilogato nella Tabella 6. Il LLoQ è stato determinato nei genotipi [consultare la prossima sezione "Determinazione del limite inferiore di quantificazione (LLoQ) nei genotipi dell'HCV"]. Questi dati sul genotipo stabiliscono che il LLoQ complessivo per il test è 10 UI/ml.

Tabella 4: LLoQ utilizzando diluizioni del Secondo Standard Internazionale dell'OMS per l'HCV in plasma

Lotto reagenti	Concentrazione target	Concentrazione target	Aptima HCV Quant Dx	DS	Bias	TE calcolato	TAE calcolato
	(UI/ml)	(log UI/ml)	(log UI/ml)	(log UI/ml)	(log UI/ml)	(log UI/ml)	(log UI/ml)
1	3	0,48	0,53	0,30	0,05	0,85	0,65
	6	0,78	0,73	0,31	-0,04	0,88	0,67
	8	0,90	1,08	0,23	0,18	0,65	0,64
2	3	0,48	0,37	0,32	-0,11	0,92	0,75
	6	0,78	0,82	0,27	0,04	0,78	0,59
	8	0,90	0,96	0,26	0,06	0,74	0,58
3	3	0,48	0,46	0,25	-0,01	0,71	0,52
	6	0,78	0,76	0,34	-0,02	0,95	0,69
	8	0,90	0,89	0,26	-0,01	0,73	0,53

DS = deviazione standard

Tabella 5: Determinazione del LLoQ utilizzando il Secondo Standard Internazionale dell'OMS per l'HCV diluito nel siero

Lotto reagenti	Concentrazione target	Concentrazione target	Aptima HCV Quant Dx	DS	Bias	TE calcolato	TAE calcolato
	(UI/ml)	(log UI/ml)	(log UI/ml)	(log UI/ml)	(log UI/ml)	(log UI/ml)	(log UI/ml)
1	3	0,48	0,65	0,33	0,17	0,94	0,84
	6	0,78	0,93	0,32	0,15	0,90	0,79
	8	0,90	1,08	0,28	0,18	0,80	0,74
2	3	0,48	0,52	0,36	0,04	1,02	0,76
	6	0,78	0,89	0,32	0,11	0,90	0,75
	8	0,90	1,01	0,21	0,11	0,60	0,53
3	3	0,48	0,47	0,39	-0,01	1,11	0,79
	6	0,78	0,71	0,30	-0,06	0,86	0,67
	8	0,90	0,95	0,29	0,05	0,83	0,63

DS = deviazione standard

Tabella 6: Riepilogo del LLoQ utilizzando il Secondo Standard Internazionale dell'OMS per l'HCV

Lotto reagenti	LLoQ plasma		LLoQ siero	
	(log UI/ml)	(UI/ml)	(log UI/ml)	(UI/ml)
1	0,73	5	0,93	9
2	0,82	7	0,89	8
3	0,76	6	0,71	5

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

Il LLoQ è stato determinato analizzando diluizioni di campioni biologici clinici positivi all'HCV per i genotipi 1, 2, 3, 4, 5 e 6 in plasma e siero umani negativi all'HCV. L'assegnazione della concentrazione dei campioni biologici clinici è stata determinata utilizzando un test di confronto con marcatura CE. Un minimo di 36 replicati di ogni elemento del pannello sono stati analizzati con ciascuno dei tre lotti di reagenti per un minimo di 108 replicati per ogni elemento del pannello. I risultati del lotto di reagenti con la concentrazione più elevata pari o superiore al LoD che soddisfa i requisiti di TE e TAE sono illustrati nella Tabella 7 per il plasma e nella Tabella 8 per il siero. Il LLoQ per i genotipi 1-6 nel plasma e nel siero è indicato nella Tabella 9. Questo stabilisce che il LLoQ complessivo per il test è 10 UI/ml.

Tabella 7: Determinazione del LLoQ nei genotipi nel plasma

Genotipo	Concentrazione target	Concentrazione target	Aptima HCV Quant Dx	DS	Bias	TE calcolato	TAE calcolato
	(UI/ml)	(log UI/ml)	(log UI/ml)	(log UI/ml)	(log UI/ml)	(log UI/ml)	(log UI/ml)
1	3	0,48	0,65	0,38	0,17	1,08	0,94
	6	0,78	0,88	0,35	0,11	1,00	0,82
	8	0,90	0,99	0,24	0,09	0,68	0,56
2	3	0,48	0,63	0,40	0,16	1,13	0,95
	4	0,60	0,76	0,29	0,15	0,81	0,73
	6	0,78	1,12	0,30	0,34	0,86	0,94
3	6	0,78	0,52	0,30	-0,26	0,85	0,86
	10	1,00	0,80	0,21	-0,20	0,59	0,62
	12	1,08	0,89	0,26	-0,19	0,74	0,71
4	8	0,90	0,61	0,39	-0,29	1,11	1,07
	10	1,00	0,82	0,31	-0,18	0,87	0,80
	12	1,08	1,01	0,29	-0,07	0,83	0,65
5	3	0,48	0,57	0,37	0,10	1,06	0,85
	6	0,78	0,87	0,31	0,09	0,89	0,72
	10	1,00	1,15	0,16	0,15	0,44	0,46
6	2	0,30	0,66	0,36	0,36	1,02	1,08
	3	0,48	0,79	0,28	0,31	0,80	0,87
	6	0,78	1,14	0,26	0,36	0,74	0,89

DS = deviazione standard

Tabella 8: Determinazione del LLoQ nei genotipi nel siero

Genotipo	Concentrazione target	Concentrazione target	Aptima HCV Quant Dx	DS	Bias	TE calcolato	TAE calcolato
	(UI/ml)	(log UI/ml)	(log UI/ml)	(log UI/ml)	(log UI/ml)	(log UI/ml)	(log UI/ml)
1	6	0,78	0,75	0,36	-0,03	1,02	0,75
	8	0,90	0,88	0,32	-0,02	0,89	0,65
	10	1,00	1,04	0,29	0,04	0,81	0,61
2	3	0,48	0,48	0,35	0,00	0,99	0,70
	6	0,78	0,80	0,31	0,02	0,86	0,63
	10	1,00	1,04	0,25	0,04	0,72	0,54
3	6	0,78	0,45	0,25	-0,33	0,72	0,84
	10	1,00	0,67	0,22	-0,33	0,63	0,78
	12	1,08	0,92	0,19	-0,16	0,54	0,54
4	1	0,00	0,19	0,27	0,19	0,77	0,73
	2	0,30	0,65	0,32	0,35	0,91	0,99
	3	0,48	0,65	0,34	0,17	0,96	0,85
5	3	0,46	0,48	0,37	0,02	1,04	0,76
	6	0,76	0,72	0,29	-0,04	0,81	0,61
	9	0,94	1,04	0,27	0,10	0,77	0,65
6	3	0,48	0,58	0,37	0,11	1,04	0,84
	6	0,78	0,99	0,22	0,21	0,61	0,64
	10	1,00	1,25	0,22	0,25	0,63	0,70

DS = deviazione standard

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

Genotipo HCV	LLoQ plasma		LLoQ siero	
	(log UI/ml)	(UI/ml)	(log UI/ml)	(UI/ml)
1	0,88	8	0,88	8
2	0,76	6	0,80	6
3	0,80	6	0,67	5
4	0,82	7	0,65	4
5	0,87	7	0,72	5
6	0,79	6	0,99	10

## Precisione

Per valutare la precisione, un pannello di 10 elementi è stato realizzato diluendo campioni biologici clinici positivi all'HCV o aggiungendo Armored RNA nel plasma e nel siero negativi all'HCV. Il pannello è stato analizzato da tre operatori utilizzando tre lotti di reagenti su tre Panther System nell'arco di 21 giorni.

La Tabella 10 mostra la precisione dei risultati del test (in log UI/ml) tra gli strumenti, tra gli operatori, tra i lotti, tra le sessioni analitiche, all'interno delle sessioni analitiche e complessiva. La variabilità totale è stata  $\leq 13,31\%$  in tutti gli elementi del pannello, principalmente a causa della variabilità all'interno della sessione analitica (cioè, errore casuale).

Tabella 10: Precisione dell'Aptima HCV Quant Dx Assay

Matrice	N	Concentrazione media (log UI/ml)	Tra strumenti		Tra operatori		Tra lotti		Tra sessioni analitiche		Nella sessione analitica		Totale	
			DS	CV (%)	DS	CV (%)	DS	CV (%)	DS	CV (%)	DS	CV (%)	DS	CV (%)
Plasma	98 <sup>a</sup>	1,23	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	3,35	0,06	4,54	0,12	9,84	0,14	11,34
Plasma	162	2,06	0,05	2,23	0,00	0,00	0,07	3,20	0,03	1,47	0,10	4,91	0,14	6,88
Plasma	162	3,02	0,03	0,89	0,01	0,24	0,04	1,47	0,01	0,33	0,09	3,08	0,11	3,77
Plasma	162	4,87	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,60	0,04	0,86	0,06	1,13	0,10	2,04
Plasma	162	7,16	0,02	0,21	0,01	0,20	0,04	0,52	0,00	0,00	0,05	0,75	0,09	1,27
Siero	132 <sup>a</sup>	1,27	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07	5,16	0,00	0,00	0,15	12,17	0,17	13,31
Siero	162	2,17	0,02	0,99	0,04	1,71	0,07	3,01	0,05	2,15	0,08	3,53	0,12	5,61
Siero	162	3,09	0,02	0,67	0,00	0,00	0,06	1,79	0,03	0,90	0,07	2,26	0,11	3,44
Siero	161	4,86	0,00	0,00	0,04	0,78	0,08	1,67	0,00	0,00	0,08	1,72	0,13	2,65
Siero	162	7,16	0,00	0,00	0,05	0,70	0,05	0,73	0,02	0,31	0,04	0,55	0,10	1,35

CV = coefficiente di variazione, DS = deviazione standard

<sup>a</sup> Numero di risultati validi all'interno del range lineare del test.

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

### Sostanze potenzialmente interferenti

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

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

Campioni di plasma clinici di pazienti con elevati livelli di sostanze definite o di pazienti affetti dalle patologie elencate nella Tabella 11 sono stati analizzati con l'Aptima HCV Quant Dx Assay. Non è stata osservata interferenza nelle prestazioni del test.

Tabella 11: Tipi di campioni clinici testati

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



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

Tabella 12: Sostanze esogene

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

### Specificità

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

Tabella 13: Specificità nei campioni di plasma e di siero

	Plasma appena preparato	Plasma congelato	Plasma totale	Siero appena preparato	Siero congelato	Siero totale	Combinato
Replicati validi (n)	100	270	370	98	268	366	736
Non rilevato	100	270	370	98	268	366	736
<b>Specificità (IC 95%)</b>	100% (97,1-100)	100% (98,9-100)	100% (99,2-100)	100% (97,0-100)	100% (98,9-100)	100% (99,2-100)	100% (99,6-100)

IC = intervallo di confidenza

## Specificità analitica

La potenziale reattività crociata con i patogeni elencati nella Tabella 14 è stata valutata nel plasma umano negativo all'HCV in presenza o assenza di 3,3 log UI/ml di HCV. Non è stata osservata alcuna reattività crociata. Non è stata osservata alcuna interferenza in presenza dei patogeni.

Tabella 14: Patogeni analizzati per la specificità analitica

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

Patogeno	Concentrazione	
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	1.000.000	CFU/ml <sup>f</sup>
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1.000.000	CFU/ml
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.000.000	CFU/ml
<i>Propionibacterium acnes</i>	1.000.000	CFU/ml
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1.000.000	CFU/ml
<i>Candida albicans</i>	1.000.000	CFU/ml
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1.000.000	CFU/ml
<i>Chlamydia trachomatis</i>	1.000.000	IFU/ml <sup>g</sup>
<i>Trichomonas vaginalis</i>	1.000.000	cellule/ml

<sup>a</sup> UI/ml = Unità internazionali per ml.

<sup>b</sup> PFU/ml = Unità formanti placche per ml.

<sup>c</sup> TCID50 U/ml = Unità di dose infettante le colture tissutali per ml.

<sup>d</sup> vp/ml = Particelle virali per ml.

<sup>e</sup> LD/ml = Dose letale per ml.

<sup>f</sup> CFU/ml = Unità formanti colonie per ml.

<sup>g</sup> IFU/ml = Unità formanti inclusioni per ml.

### Campioni clinici contenenti virus diversi dall'HCV

I patogeni elencati nella Tabella 15 sono stati valutati ottenendo campioni clinici naturalmente infettati. Questi sono stati analizzati in presenza o assenza di 3,3 log UI/ml di RNA dell'HCV. Non è stata osservata alcuna reattività crociata. Non è stata osservata alcuna interferenza.

Tabella 15: Campioni clinici analizzati per la specificità analitica

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

### Ripetibilità dei campioni clinici

La ripetibilità è stata valutata analizzando tre replicati di campioni clinici di plasma e siero positivi all'HCV infettati naturalmente. La concentrazione media e la deviazione standard dei campioni di plasma e siero analizzati sono riportate nelle Tabelle 16 e 17.

Tabella 16: Ripetibilità dei campioni di plasma clinici

ID campione di plasma	Concentrazione media (log UI/ml)	DS
1	1,68	0,05
2	1,69	0,17
3	1,73	0,06
4	1,73	0,06
5	1,84	0,05
6	2,30	0,10
7	2,71	0,09
8	2,80	0,06
9	3,22	0,04
10	3,80	0,05
11	4,12	0,08
12	4,21	0,11
13	4,90	0,14
14	6,94	0,11
15	7,05	0,04

Tabella 17: Ripetibilità dei campioni di siero clinici

ID campione di siero	Concentrazione media (log UI/ml)	DS
1	1,67	0,07
2	1,74	0,10
3	1,86	0,15
4	1,67	0,07
5	2,00	0,07
6	2,51	0,08
7	3,12	0,23
8	3,29	0,02
9	3,70	0,18
10	3,99 <sup>a</sup>	0,13
11	4,35	0,05
12	5,48	0,12
13	5,74	0,07
14	5,80	0,13
15	7,15	0,10

<sup>a</sup> Risultato di due dei tre replicati analizzati. Un replicato anomalo è stato rimosso.

### Diluizione dei campioni con il diluente per campioni biologici

Per valutare il recupero dell'RNA dell'HCV nei campioni diluiti con il diluente per campioni biologici Aptima, i campioni di plasma e di siero che rientravano nel range lineare sono stati diluiti 1:3 con il diluente per campioni biologici Aptima. Inoltre, i campioni clinici infettati naturalmente con alto titolo e i campioni corretti con Armored RNA con concentrazioni superiori all'ULoQ sono stati diluiti 1:100 con il diluente per campioni biologici Aptima. Ogni campione è stato analizzato non diluito e diluito (1:3 o 1:100) in triplicato. Le differenze tra la concentrazione media riportata (fattore di diluizione applicato al risultato del campione diluito) e la concentrazione media del campione non diluito sono indicate nella Tabella 18 per il plasma e nella Tabella 19 per il siero. Le concentrazioni dei campioni sono state accuratamente recuperate nei campioni diluiti.

Tabella 18: Diluizione dei campioni con il diluente per campioni biologici Aptima: plasma

Diluizione	Concentrazione media del campione non diluito (log UI/ml)	Concentrazione media riportata <sup>a</sup> (log UI/ml)	Differenza
1:3	1,68	1,89	-0,21
	1,69	1,69	0,00
	1,73	2,11	-0,38
	1,73	1,78	-0,05
	1,84	1,80	0,04
	2,30	2,23	0,07
	2,71	2,76	-0,05
	2,80	2,76	0,04
	3,22	3,28	-0,06
	3,80	3,71	0,09
	4,12	4,06	0,06
	4,21	4,07	0,14
	4,90	4,68	0,22
	6,94	6,72	0,22
	7,05	6,91	0,14
1:100	7,05	6,59	0,46
	>8,00 (8,45) <sup>b</sup>	8,38	0,07

<sup>a</sup> La concentrazione riportata è il valore calcolato dopo che è stato applicato il fattore di diluizione.

<sup>b</sup> Campione biologico corretto.

**Nota:** tutti i risultati >8,00 log UI/ml sono stati stimati utilizzando un'analisi addizionale.

Tabella 19: Diluizione dei campioni con il diluente per campioni biologici Aptima: siero

Fattore di diluizione	Concentrazione media del campione non diluito (log UI/ml)	Concentrazione media riportata <sup>a</sup> (log UI/ml)	Differenza
1:3	1,67	1,85	-0,18
	1,74	1,72	0,02
	1,86	1,66	0,20
	1,67	1,85	-0,18
	2,00	1,91	0,09
	2,51	2,37	0,14
	3,12	3,01	0,11
	3,29	3,35	-0,06
	3,70	3,53	0,17
	3,99 <sup>c</sup>	3,87	0,12
	4,35	4,30	0,05
	5,48	5,25	0,23
	5,74	5,62	0,12
	5,80	5,50	0,30
	7,15	6,86	0,29
1:100	7,15	6,65	0,50
	>8,00 (8,44) <sup>b</sup>	8,46	-0,02

<sup>a</sup> La concentrazione riportata è il valore calcolato dopo che è stato applicato il fattore di diluizione.

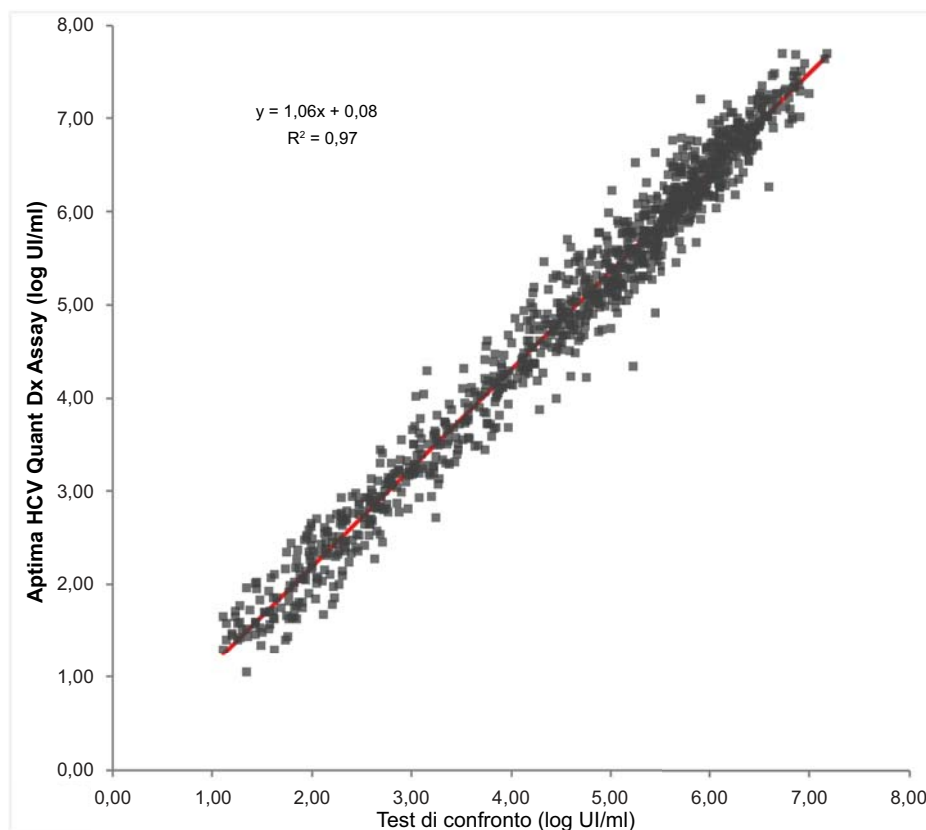
<sup>b</sup> Campione biologico corretto.

<sup>c</sup> Risultato di due dei tre replicati analizzati. Un replicato anomalo è stato rimosso.

**Nota:** tutti i risultati >8,00 log UI/ml sono stati stimati utilizzando un'analisi addizionale.

## Correlazione fra metodi

Le prestazioni dell'Aptima HCV Quant Dx Assay sono state determinate confrontandole con quelle di un test di confronto con marcatura CE analizzando campioni clinici non diluiti provenienti da pazienti con infezione da HCV, utilizzando tre Panther System con quattro lotti di reagenti. Un totale di 1058 campioni di plasma e di siero (872 campioni di plasma, 186 campioni di siero) in tutti i genotipi dell'HCV all'interno del range lineare comune a entrambi i test sono stati utilizzati per la regressione lineare come illustrato nella Figura 8.



**Figura 8. Correlazione fra l'Aptima HCV Quant Dx Assay e il test di confronto**

## Concordanza diagnostica

Per determinare la concordanza diagnostica, 227 campioni di plasma e di siero di soggetti positivi all'HCV sono stati analizzati utilizzando l'Aptima HCV Quant Dx Assay e un test qualitativo di confronto con marcatura CE. I risultati con risultato quantificabile o rilevabile sono stati categorizzati come "Rilevato". Tutti i risultati di target non rilevato sono stati categorizzati come "Target non rilevato". La concordanza diagnostica tra i test è stata del 100% come illustrato nella Tabella 20.

*Tabella 20: Concordanza diagnostica fra l'Aptima HCV Quant Dx Assay e il test di confronto*

		Aptima HCV Quant Dx Assay	
		Rilevato	Target non rilevato
Test di confronto	Rilevato	99	0
	Target non rilevato	0	128

## Contaminazione crociata

Per stabilire che il Panther System riduce al minimo il rischio di risultati falsi positivi causati da contaminazione crociata, è stato condotto uno studio utilizzando pannelli corretti su tre Panther System. La contaminazione crociata è stata valutata utilizzando campioni di plasma corretti con Armored RNA ad alto titolo (7 log UI/ml) disseminati fra campioni negativi all'HCV in una disposizione a scacchiera. L'analisi è stata eseguita nel corso di cinque sessioni analitiche. Il tasso generale di contaminazione crociata era dello 0,14% (1/704).

## Pannello di sieroconversione

Sono stati analizzati undici set di pannelli di sieroconversione per HCV per un totale di 72 campioni. I risultati dell'Aptima HCV Quant Dx Assay sono stati confrontati con i risultati dei test degli anticorpi anti-HCV. Il numero di giorni al primo risultato reattivo è elencato nella Tabella 21. L'Aptima HCV Quant Dx Assay ha rilevato la presenza di HCV in media 20 giorni prima dei test degli anticorpi.

Tabella 21: Riepilogo dei dati dei pannelli di sieroconversione

ID pannello	Numero di elementi testati	Numero di elementi reattivi			Giorni al primo risultato reattivo			Differenza in giorni al primo risultato reattivo (in base alla data del prelievo)		
		Aptima HCV Quant Dx	Test anticorpi anti-HCV 1	Test anticorpi anti-HCV 2	Aptima HCV Quant Dx	Test anticorpi anti-HCV 1	Test anticorpi anti-HCV 2	Giorni di rilevamento in anticipo rispetto al test degli anticorpi anti-HCV 1	Giorni di rilevamento in anticipo rispetto al test degli anticorpi anti-HCV 2	
PHV911	4	4	3	3	3 <sup>a</sup>	14	14	11	11	
PHV913	4	4	0	2	0	9 <sup>b</sup>	7	9	7	
PH919	7	4	3	3	25	28	28	3	3	
PH920	9	9	7	6	0 <sup>c</sup>	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	
PH926	5	5	1	0	0	14	14 <sup>b</sup>	14	14	
6227	7	4	2	2	42	74	74	32	32	
6229	8	8	4	3	0	17	20	17	20	
Totale	72	66	35	32				Media	19,36	20,73
								Mediana	14	18

Il test degli anticorpi anti-HCV 1 è stato completato con il test Abbot Prism HCV.

Il test degli anticorpi anti-HCV 2 è stato completato con il test Ortho Enhanced SAVE con le seguenti eccezioni:

Panelli 6227 e 6229, che sono stati entrambi analizzati con il test Ortho ELISA Anti-HCV 3.0.

<sup>a</sup> Il primo prelievo non è stato analizzato a causa dell'indisponibilità del campione dal fornitore.

<sup>b</sup> Tutti i prelievi di questo pannello sono risultati non reattivi per l'anticorpo anti-HCV. Il giorno dell'ultimo prelievo è stato usato come il valore "Giorni al primo risultato reattivo".

<sup>c</sup> Il secondo prelievo non è stato analizzato a causa dell'indisponibilità del campione dal fornitore.

## **Bibliografia**

1. Averhoff FM, Glass N and Holtzman D. Global Burden of Hepatitis C: Considerations for Healthcare Providers in the United States. *Clinical Infectious Diseases* 2012; 55 (S1): S10-15.
2. Current and Future Disease Progression of the Chronic HCV Population in the United States (2013) PLOS ONE Volume 8: Edizione 5; 1-10.
3. Engle RE, Bukh J, Alter HJ et al., <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24797372> Transfusion-associated hepatitis before the screening of blood for hepatitis risk factors. *Transfusion*. 5 maggio 2014.
4. Lee M-H, Yang, H-I, Yuan Y et al., Epidemiology and natural history of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterology* 2014; 20 ( 28): 9270-9280.
5. Hepatitis C Viruses: Genome and Molecular Biology (2006); Horizon Biosciences.
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*. Gennaio 2014; 59(1):318-27.
7. EASL Recommendations on treatment of Hepatitis C 2014: [www.easl.eu/\\_clinical-practice-guideline](http://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) 2014: [www.hcvguidelines.org](http://www.hcvguidelines.org).
9. CDC. Testing for HCV infection: An update for clinicians and laboratories. *MMWR* 2013; 62 (18).
10. Rutter, K, Hofer H, Beinhardt, S et al., Durability of SVR in chronic hepatitis C patients treated with peginterferon- $\alpha$ 2a/ribavirin in combination with a direct acting antiviral. *Aliment Pharmacol Ther*. Luglio 2013; 38(2):118-23.
11. Treatment of Hepatitis C, A Systemic Review (2014) *JAMA* Volume 312: N.6; 631-640.
12. EASL International Consensus Conference on Hepatitis C. Consensus Statement. *J Hepatol* 1999; 30; 956-61.
13. NIH Consensus and State-of-the-Science Statements. Management of Hepatitis C: 2002; 19 (3):1-46.
14. Peiffer K-H and Sarrazin C. The importance of HCV RNA measurement in tailoring treatment duration: *Digestive and Liver Disease* 45S (2013) S323-S331.
15. **Clinical and Laboratory Standards Institute**. 2005. Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods; Approved Guideline. CLSI Document MM13-A. Wayne, PA.
16. **CFR 29 Parte 1910.1030**. Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens; versione corrente.
17. **Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health**. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL); versione corrente.
18. **Clinical and Laboratory Standards Institute**. 2002. Clinical Laboratory Waste Management. Documento CLSI GP5-A2. Villanova, PA.
19. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)**. 2012. Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline—Second Edition. Documento CLSI EP17-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
20. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)**. 2003. Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline. Documento CLSI EP06-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.





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

**Assistenza clienti:** +1 844 Hologic (+1 844 465 6442)  
customersupport@hologic.com

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

Per ulteriori informazioni di contatto visitare il sito [www.hologic.com](http://www.hologic.com).



EMERGO EUROPE  
Molenstraat 15  
2513 BH, L'Aia  
Paesi Bassi

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

Armored RNA è un marchio commerciale di Asuragen, Inc.

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

Questo prodotto potrebbe essere protetto da uno o più brevetti USA identificati nel sito [www.hologic.com/patents](http://www.hologic.com/patents).

© 2015 Hologic, Inc. Tutti i diritti riservati.

AW-13249-701 Rev. 001  
2015-08