

Testy Elecsys[®] Anti-HCV II, Elecsys[®] HIV combi PT, Elecsys[®] HBsAg II, Elecsys[®] HBsAg Confirmatory Test oraz Elecsys[®] Syphilis wykonywane na analizatorze cobas e 601 firmy Roche — ocena ich przydatności w badaniach przeglądowych dawców krwi

Evaluation of fully automated Elecsys[®] Anti-HCV II, Elecsys[®] HIV combi PT, Elecsys[®] HBsAg II, Elecsys[®] HBsAg Confirmatory Test and Elecsys[®] Syphilis performed on cobas e 601 Roche analyzer — immune assays used for donor screening

Aneta Kopacz, Dorota Kubicka-Russel, Grzegorz Liszewski, Paulina Zwolińska, Ewa Sulkowska, Magdalena Łętowska, Piotr Grabarczyk

Instytut Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie

Streszczenie

Wstęp. Testy Elecsys[®] Anti-HCV II, HBsAg II, HIV combi PT oraz Syphilis firmy Roche są oparte na metodzie elektrochemiluminescencji (ECLIA) i przeznaczone do prowadzenia badań przeglądowych u dawców krwi oraz badań diagnostycznych. Oznaczenia prowadzi się przy użyciu w pełni automatycznego analizatora cobas e 601.

Celem pracy była ocena przydatności testów Elecsys[®] do badań przeglądowych w krwiodawstwie. Analizowano swoistość, czułość testów oraz powtarzalność i odtwarzalność wartości S/CO.

Materiał i metody. Swoistość testów oszacowano na podstawie badania 2508 donacji od dawców pierwszorazowych i wielokrotnych. Czułość kliniczną oceniano na podstawie wyników badania: 1) paneli serokonwersyjnych (SeraCare, BBI); 2) paneli próbek serododatnich (potwierdzonych), zakażonych genotypami najczęściej występującymi u dawców krwi w Polsce, oraz paneli rozcieńczeń kilku z nich; 3) donacji dodatnich w badaniu NAT-ujemnych w serologicznym badaniu przeglądowym (NAT yields). Wszystkie badania oprócz próbek NAT yields wykonywano równolegle testem odniesienia CMIA.

Wyniki. Swoistość testu Anti-HCV II wynosiła 99,8%, testu HBsAg II — 100%, HIV combi PT — 99,6%, Syphilis — 99,9%. W badaniach paneli serokonwersji w ocenianych testach HBsAg II, HIV combi PT, Syphilis oraz w teście odniesienia uzyskiwano taką samą liczbę wyników reaktywnych. Test Anti-HCV II w panelach serokonwersyjnych SeraCare wykrył przeciwciała anty-HCV dodatkowo w dwóch wcześniejszych próbkach panelu w porównaniu do testu odniesienia. Czułość kliniczna wynosiła 100% dla nierozcieńczonych próbek serododatnich.

Wyniki reaktywne uzyskiwano w próbkach zakażonych HCV rozcieńczonych od 50 do 1,6 tys. razy (18 reaktywnych/18 rozcieńczeń badanych), podczas gdy w teście odniesienia CMIA wyniki reaktyw-

ne otrzymywano do rozcieńczenia 200-krotnego (9 reaktywnych/18 rozcieńczeń badanych). W przypadku HIV reaktywnych było 9/18 badanych rozcieńczeń, w przypadku HBV — 11/15, a w przypadku kiły — 7/9. Testy odniesienia wykrywały rzadziej odpowiednie markery zakażenia: 7/18, 10/15 i 6/9. Czulość kliniczna wyznaczona na podstawie wyników badania próbek NAT yields wynosiła 12% dla HCV (11/91), 6% dla HBV (6/99) oraz 14% dla HIV (1/7). Współczynnik zmienności CV dla powtarzalności i odtwarzalności wyników wyrażonych przez S/CO wynosił < 20%. W trakcie oceny nie odnotowano żadnego wyniku nieważnego ani awarii analizatora cobas e601.

Wnioski. Testy Anti-HCV II, HBsAg II, HIV combi PT oraz Syphilis firmy Roche wykonywane na analizatorze cobas e601 charakteryzują się dobrą swoistością, czulością oraz odtwarzalnością i powtarzalnością wartości S/CO i mogą być stosowane do prowadzenia badań przeglądowych u polskich krwiodawców.

Słowa kluczowe: anti-HCV, anti-HIV 1/2, antygen p24 HIV, antygen HBs, *Treponema pallidum*, badania przeglądowe dawców

J. Transf. Med. 2017; 10: 35–51

Summary

Background. Electrochemiluminescence (ECLIA) immunoassays Elecsys®: Anti-HCV II, HBsAg II, HIV and Syphilis combi PT produced by Roche Diagnostics are dedicated to blood donor screening and clinical sample testing on a fully automated cobas e 601 analyzer.

The aim was to evaluate the usefulness of the Elecsys® assays for blood donor screening in Poland; analysis of assay specificity, sensitivity, repeatability and reproducibility (S/CO).

Material and methods. Specificity evaluation was based on analysis of 2 508 donations from first-time and repeat donors. Clinical sensitivity was estimated on the basis of test results of: 1) seroconversion panels (SeraCare, BBI), 2) panel of seropositive samples (confirmed) infected with genotypes most common in Poland; panels included dilutions of several seropositive samples, 3) donations positive in NAT Assays/negative in routine serological screening (NAT yields). With the exception of NAT yield samples, all studies were performed in parallel with reference CMIA tests.

Results. Test specificity was as follows: anti-HCV II — 99.8%, HBsAg II — 100%, HIV combi PT — 99.6%, Syphilis — 99.9%. The number of reactive results obtained with HBsAg II, HIV combi PT and Syphilis assays in seroconversion panels was the same as with reference tests. In SeraCare seroconversion panels the Anti-HCV II assay detected HCV antibodies in two earlier panel samples which went undetected in the reference test. For undiluted seropositive samples, the clinical sensitivity was estimated at 100%.

Reactive results were obtained in HCV infected samples with dilutions from 1 : 50 to 1 : 1600 (18 reactive /18 tested dilutions), whereas in the reference CMIA test reactive results were reported in samples diluted up to 1 : 200 (9 reactive/18 tested dilutions). For HIV reactivity was detected in 9/18 dilutions, for HBV in 11/15, and for Syphilis in 7/9. The reference test detected infectious markers less frequently; 7/18, 10/15 and 6/9 for HIV, HBV and Syphilis respectively.

Clinical sensitivity based on NAT yields was 12% for HCV (11/91), 6% for HBV (6/99) and 14% for HIV (1/7). The coefficient variation (CV) for repeatability and reproducibility of results expressed in S/CO was < 20%. During the evaluation period no invalid result was obtained and no analyzer failure was reported.

Conclusions. Automated Elecsys® assays: Anti-HCV II, HBsAg II, HIV and Syphilis combi PT performed on the cobas e601 analyzer (Roche) present satisfactory specificity, sensitivity and reproducibility and repeatability of results (S/CO). They can therefore be used for screening of Polish blood donors.

Key words: anti-HCV, anti-HIV 1/2, antigen p24 HIV, antigen HBs, *Treponema pallidum*, blood donor screening

J. Transf. Med. 2017; 10: 35–51

Wstęp

Pierwszym markerem serologicznym czynników zakaźnych przenoszonych drogą krwi analizowanym u polskich dawców był antygen HBs (HBsAg), który zaczęto badać w latach 70. zeszłego stulecia. W 1987 roku wprowadzono obowiązek badania anty-HIV, a w 1992 roku — anty-HCV [1]. Badania przeglądowe służą przede wszystkim zapewnieniu bezpieczeństwa transfuzji, zapobiegając przypadkom potransfuzyjnego zapalenia wątroby (typu B i C) oraz zakażeniom HIV. Jak ważny jest to element bezpieczeństwa, pokazują statystyki dotyczące epidemiologii czynników zakaźnych wykrywanych u dawców krwi. Rocznie identyfikuje się łącznie około 1,3 tys. dawców z markerami serologicznymi wskazującymi na trwające lub przebyte zakażenie (wyniki powtarzalnie reaktywne [RR, *repeat reactive*] w badaniu przeglądowym). W 2014 roku u dawców pierwszorazowych częstość wyników RR badania przeciwciał anty-HCV wynosiła około 0,8%, a antygeny HBs — 0,3%. Częstość seropozytywnych/serododatnich zakażeń HIV (RR, potwierdzonych w badaniach weryfikacji) w latach 2008–2013 to 7–9 przypadków na 100 tys. dawców [2]. Z drugiej strony należy pamiętać, że w trakcie badań prowadzonych w krwiodawstwie na szeroką skalę (obecnie blisko 1,3 mln donacji rocznie pobieranych od blisko 600 tys. dawców [3]) uzyskuje się również istotną liczbę wyników biologicznie fałszywie reaktywnych (BFR, *biologically false reactives*). Wyniki BFR wynikają między innymi ze swoistości testów na poziomie poniżej 100%. Uzyskanie wyniku reaktywnego badania przeglądowego obliguje do wykonania oznaczenia w dwóch powtórzeniach. Jeśli wynik reaktywny się nie powtórzy, wynik pierwotny zostaje uznany za fałszywy i donacja taka może być użyta do leczenia. W przypadku uzyskania wyniku RR (min. 2 wyniki reaktywne na 3 przeprowadzone badania) konieczne jest wykonanie testów potwierdzenia/uzupełniających, które pozwalają na identyfikację wyników dodatnich. Tylko dodatni wynik testu potwierdzenia/uzupełnienia świadczy o zakażeniu.

Z 582 próbek HBsAg RR zgromadzonych przez Instytut Hematologii i Transfuzjologii (IHIT) w 2015 roku potwierdzono 326, a wśród 550 anty-HIV RR dodatni wynik testu potwierdzenia/uzupełnienia uzyskano dla 45. Niepotwierdzone wyniki w liczbie 761 (67,2%) to najprawdopodobniej wyniki BFR, które mimo braku potwierdzenia zakażenia skutkowały czasową dyskwalifikacją dawcy.

W trosce o zapewnienie wysokiego bezpieczeństwa transfuzji, a jednocześnie zabezpieczenie

przed utratą dawców z wynikami niepotwierdzonymi/nieswoistymi, istotne znaczenie ma wykonywanie badań przeglądowych za pomocą testów o jak największej czułości i swoistości. Zgodnie z ustawodawstwem polskim i europejskim testy do badań HCV, HBV i HIV przed wprowadzeniem na rynek muszą uzyskać znak CE IVD [4, 5]. Ocena działania testu przedstawiana przez producenta w instrukcji użytkownika bywa fragmentaryczna, na przykład czułość analityczna jest określana jedynie względem standardów międzynarodowych przygotowanych z jednej formy polimorficznej danego wirusa. Powszechnie wiadomo, że swoistość może być charakterystyczna dla określonej populacji; na różnych obszarach dominują poszczególne formy polimorficzne, które mogą być wykrywane z czułością inną niż ta reprezentowana w standardzie międzynarodowym [6, 7]. Dlatego w naszym kraju przed wprowadzeniem do badań przeglądowych krwiodawców każdy test jest poddawany ocenie czułości (analitycznej, klinicznej) i swoistości z uwzględnieniem specyfiki epidemiologicznej oraz organizacyjnej dotyczącej prowadzenia rutynowych badań w polskiej służbie krwi [8, 9].

Celem przedstawionych badań była ocena przydatności do prowadzenia badań krwiodawców za pomocą:

- testów przeglądowych *Anti-HCV II, HIV combi PT, HBsAg II* i *Syphilis* firmy Roche;
- testu weryfikacyjnego *HBsAg Confirmatory* firmy Roche;
- analizatora *cobas e 601* firmy Roche.

Materiał i metody

Charakterystyka testów podlegających ocenie

Przedmiotem oceny były: *Elecsys® Anti-HCV II*, *Elecsys® HIV combi PT*, *Elecsys® HBsAg II* i *Elecsys® Syphilis* — immunochemiczne testy *in vitro*, służące do jakościowego wykrywania w ludzkim osoczu lub surowicy przeciwciał przeciwko wirusowi zapalenia wątroby typu C, antygenowi HIV-1 p24, łącznie z przeciwciałami przeciwko HIV-1, w tym z grupy O oraz HIV-2, antygenowi powierzchniowego wirusa zapalenia wątroby typu B (HBsAg) i przeciwciał przeciwko krętkowi blademu (*Treponema pallidum*). Testy te są oparte na metodzie elektrochemiluminescencji (ECLIA).

Immunochemiczny test *Elecsys® HBsAg Confirmatory*, potwierdzający obecność antygenowi powierzchniowego zapalenia wątroby typu B, jest oparty na zasadzie neutralizacji HBsAg swoistymi przeciwciałami. Test neutralizacji *HBsAg Con-*

firmary wymaga wcześniejszego manualnego przygotowania materiału do przeprowadzenia badania. W zależności od wartości S/CO (*sample/cut off*) otrzymanej w teście *HBsAg II* próbka badana oraz próbki kontrolne podlegają rozcieńczeniu odczynnikiem *confirmatory reagent* i *control reagent* według algorytmu podanego w ulotce testu. Na podstawie odczytu wartości S/CO próbki kontrolnej i próbek poddawanych neutralizacji, zgodnie z instrukcją zawartą w ulotce, wylicza się odsetek (%) neutralizacji.

Dla testów *Anti-HCV II, HIV combi PT, HBsAg II* oprócz wyników niereaktywnych (S/CO < 0,9) i reaktywnych (S/CO ≥ 1) wydzielona jest strefa graniczna (*border*) o zakresie S/CO od 0,9 do 1. Otrzymanie wyniku granicznego wymaga realizacji takiego samego algorytmu postępowania, jak w przypadku uzyskania wyniku reaktywnego. Strefy granicznej nie ma w teście *Syphilis*.

Część kalibratorów i kontroli używanych w systemie ma postać liofilizatów (HIV i kiła), wymagających odpowiedniego przygotowania przed rozpoczęciem badania. Dzięki przygotowaniu kalibratorów i kontroli z liofilizatu zachowują one ważność przez dłuższy czas, jeśli są przechowywane w temperaturze 2–8°C: kalibrator HIV — przez 12 tygodni; kalibrator kiły — 28 dni; kontrola do HIV i kontrola do kiły — przez 8 tygodni po rozpuszczeniu.

Parametry i sposób prowadzenia oceny testów

Ocenę przydatności testów *Anti-HCV II, HIV combi PT, HBsAg II* oraz *Syphilis* do wykrywania odpowiednio przeciwciał anty-HCV, antygeny p24 wirusa HIV-1 wraz z przeciwciałami anty-HIV-1 oraz anty-HIV-2, antygeny HBsAg, przeciwciał anty-TP w krwiodawstwie przeprowadzono na podstawie oznaczenia ich czułości, swoistości, powtarzalności i odtwarzalności wartości S/CO.

Wszystkie badania — z wyjątkiem próbek *NAT yields* (tj. pochodzących od osób zakażonych, w których podczas rutynowych przeglądowych badań serologicznych nie wykryto przeciwciał/antygenów, wykryto natomiast materiał genetyczny wirusów w badaniach molekularnych [*NAT, Nucleid Acid Testing*]) oraz badań powtarzalności i odtwarzalności wartości S/CO — wykonywano równolegle z testami odniesienia (tj. testami ze znakiem CE IVD i pozytywną oceną IHiT uzyskaną przed ich wprowadzeniem do krwiodawstwa, stosowanymi rutynowo do wirusologicznych badań przeglądowych polskich krwiodawców).

Swoistość testów

Dla określania swoistości oznaczono ocenianymi testami 2508 próbek od dawców pierwszorazowych i wielokrotnych pochodzących z bieżących przeglądowych badań krwiodawców. Badania prowadzono równolegle w dwóch Regionalnych Centrach Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa (RCKiK) stosujących odmienne testy wykrywające serologiczne markery zakażeń HCV, HIV, HBV i TP. Spośród 2508 próbek badanych ocenianym testem 1504 pochodziło z RCKiK w Warszawie (I test odniesienia), natomiast 1004 — z RCKiK w Bydgoszczy (II test odniesienia). W trakcie badań przeglądowych, zgodnie z obowiązującym w polskim krwiodawstwie algorytmem postępowania [10], w przypadku uzyskania wyniku reaktywnego (IR, *initial reactive*) badanie w tej samej próbce powtarzano dwukrotnie. Zgodnie z zaleceniami producenta wyniki graniczne traktowano tak samo jak wyniki reaktywne. Uzyskanie wyniku RR (reaktywnego S/CO ≥ 1 lub granicznego, tj. S/CO 0,9–1, dla min. 1 powtórzenia) zobowiązywało do wykonania testów potwierdzenia/uzupełniających.

Powtarzalnie reaktywne/graniczne wyniki testów uzyskane w badaniu przeglądowym 2508 bieżących próbek od dawców pierwszorazowych i wielokrotnych weryfikowano w następujący sposób:

- *Anti-HCV II* — badaniem NAT RNA HCV (*Ultrio Elite*, Grifols — Hiszpania); jeśli nie stwierdzono RNA HCV, swoistość wyniku uzyskanego w trakcie badania przeglądowego weryfikowano testem uzupełniającym typu *Western blot HCV (recomLine HCV IgG*, Mikrogen Diagnostyk — Niemcy);
- *HIV combi PT* — testami NAT RNA HIV (*Ultrio Elite*, Grifols; *Confirmatory HIV-1*, GFE Blut — Niemcy) oraz w badaniu *Western blot HIV (recomLine HIV-1 & HIV-2 IgG*, Mikrogen Diagnostyk; lub *INNO-LIA HIV I/II Score*, Innogenetics — Belgia);
- *Syphilis* — testem TPHA (*Treponema Pallium Haemagglutination Assay*, Nadal — Niemcy) i *Western blot Treponema (recomLine Treponema IgG, IgM*, Mikrogen Diagnostyk).

Swoistość testów oszacowano na podstawie wyników uzyskanych w badaniach dawców prowadzonych ocenianymi testami i wyliczono ze wzoru: liczba próbek prawdziwie ujemnych / ogólna liczba próbek badanych (próbki prawdziwie ujemne oraz fałszywie reaktywne) × 100%.

Czułość testów

Czułość poszczególnych testów określono na podstawie wyników badania:

1. paneli serokonwersyjnych: HCV (*SeraCare PHV 915* i *SeraCare PHV 925*), HBV (*SeraCare PHM 934(M)* i *BBI PHM 919*), HIV (*SeraCare PRB 966* i *BBI PRB 958*), kiła (*SeraCare PSS 901* i *SeraCare TP 901*);
 2. paneli próbek serododatnich (panel próbek archiwalnych IHiT), z potwierdzonym zakażeniem (odpowiednio w badaniu *Western blot*, NAT, w teście neutralizacji) oraz szczegółowo scharakteryzowanych (m.in. z określonym genotypem i wiremią):
 - z anty-HCV — panel 10 próbek (6 zidentyfikowanych w 2009 r. i 4 z 2010 r., zbadanych testami *Architect* [Abbott] i *Procleix Ultrio* [Grifols], n = 10), w tym zakażone: genotypem 1a (4 szt.), genotypem 1b (4 szt.), genotypem 3a (1 szt.) i genotypem 4a/4c/4d (1 szt.). Ustalenia genotypu dokonano wcześniej testem *Versant HCV Genotype 2.0 — LiPA* (Simens);
 - z HBsAg (potwierdzona obecność DNA HBV) — panel 11 próbek (5 z 2009 r. i 6 z 2010 r.; badania przeglądowe wykonano testem *Architect* (Abbott) i *Procleix Ultrio* (Grifols), n = 11), w tym zakażone: genotypem H (4 szt.), genotypem A (4 szt.) i genotypem D (3 szt.). Ustalenia genotypu dokonano wcześniej testem *INNO-LiPA HBV Genotyping* (Innogenetics). Stężenie DNA było znane w ośmiu próbkach — badanie metodą *real-time PCR* [11]; zakres wirerii od 0,5–108,7 IU/ml;
 - seropozytywne HIV — panel trzech próbek, w których potwierdzono swoistość przeciwciał w teście *Western blot* oraz przez wykrycie RNA HIV (*Ultrio Elite* [Grifols], *Confirmatory HIV-1* [GFE Blut]); jedna próbka (nr 2445/2014) była RR w teście IV generacji (*anty-HIV/p24*) z wykrytym RNA HIV, jednak negatywna w badaniu *Western blot*;
 - z markerami zakażenia TP — panel 11 próbek z 2014 roku, dodatnich w teście *Architect* (Abbott) (n = 11) i *TPHA* (Nadal) (n = 6) oraz *INNO-LIA Syphilis Score* (Innogenetics) (n = 11);
 3. paneli rozcieńczeń wybranych próbek z poprzedniego punktu (pkt 2); do wszystkich rozcieńczeń używano osocza z ujemnymi wynikami badań w kierunku serologicznych i molekularnych markerów wirusologicznych oraz *anty-T.pallidum*.

Próbki panelowe HCV o genotypie 1a, 1b i 3a rozcieńczono 50-, 100-, 200-, 400-, 800- i 1600-krotnie; próbki panelowe HBV z genotypem A, D i H — 100-, 1000-, 10 000-, 100 000- i 1 000 000-krotnie. Panel rozcieńczeniowy próbek zakażonych HIV zawierał trzy elementy — próbki o numerach: 1, 2 i 3. Próbka 1 (2445/2014): S/CO — 12,5 w *Architect* (Abbott); RNA HIV — dodatnia w *Ultrio Elite* (Grifols) i *Confirmatory HIV-1* (GFE Blut) oraz ujemna w *WB — recomLine HIV-1&HIV-2 IgG* (Mikrogen Diagnostik); próbka 2 (2454/2014): S/CO — 62,9 w *Vitros* (Ortho); RNA HIV — dodatnia w *Ultrio Elite* (Grifols) oraz dodatnia w *WB (recomLine HIV-1&HIV-2 IgG* [Mikrogen Diagnostik]); próbka 3 (561/2011): S/CO — 24,2 w *Vitros* (Ortho); RNA HIV — dodatnia w *Ultrio Elite* (Novartis); WB — dodatni w *INNO-LIA HIV I/II Score* w rozcieńczeniu 1 : 1, 1 : 5, 1 : 10, 1 : 100, 1 : 1000, 1 : 10 000, 1 : 100 000.

Próbkę panelową *Treponema pallidum* (2014/08; S/CO — 21,13 w *Architect* [Abbott]; S/CO — 171 w *Vitros* [Ortho]; dodatni wynik w *TPHA BioMerieux* (+); wynik silnie dodatni w *TPHA Biorad*) rozcieńczono 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8, 1 : 16, 1 : 32, 1 : 64, 1 : 128, 1 : 256, 1 : 512.
- Powtarzalność i odtwarzalność wartości S/CO**
- W celu określenia powtarzalności wartości S/CO wykonano oznaczenia trzech próbek:
- zdecydowanie/silnie dodatniej — próbka nr HCV 01: zakażona genotypem 1 a, S/CO — 14,9 w teście *Architect* (Abbott), RNA wykryte w *Procleix Ultrio* (Novartis), HBV 01 — z genotypem H, 57,1 IU HBsAg/ml, DNA wykryte testem *Procleix Ultrio* (Novartis); próbka nr HIV 01: S/CO — 62,9 w teście *Vitros* (Ortho), RNA wykryte testem *Ultrio Elite* (Grifols), swoistość przeciwciał potwierdzona testem *WB recomLine HIV-1&HIV-2 IgG* (Mikrogen Diagnostik); próbka oznaczona jako kiła 01: S/CO — 31 w teście *Architect* (Abbott), wynik dodatni w teście *TPHA* (Nadal), swoistość przeciwciał potwierdzona w *WB recomLine Treponema IgG Mikrogen Diagnostyk*;
 - słabo dodatniej — próbka HCV 02: S/CO — 6,81 w teście *Architect* (Abbott), RNA wykryte w teście *Ultrio Elite* (Grifols); próbka HBV 02: z genotypem H, S/CO — 6,2 w teście *Architect* (Abbott), DNA wykryte w teście *Ultrio* (Novartis); próbka HIV 02: S/CO — 12,5 w teście *Architect* (Abbott), RNA wykryte w teście *Ultrio Elite* (Grifols) oraz *Confirmatory HIV-1* (GFE Blut), WB ujemny w *recomLine HIV-1&HIV-2 IgG* (Mikrogen Diagnostyk); próbka kiła 02: S/CO — 5,9 w teście *Architect* (Abbott), wynik dodatni w teście *TPHA* (Nadal), swoistość przeciwciał potwierdzona w *WB recomLine Treponema IgG* (Mikrogen Diagnostyk);
 - ujemnej — próbki oznaczone jako HCV 03, HBV 03, HIV 03, kiła 03: w teście *Architect* (Abbott), MPX 2.0 (Roche) oraz *Ultrio Elite* (Grifols).

Oznaczenie każdego z ocenianych markerów wykonywano na wyżej wymienionych próbkach trzykrotnie w ciągu jednego dnia, natomiast odtwarzalność oceniono na podstawie oznaczenia tych samych próbek w ciągu kolejnych trzech dni. Powtarzalność i odtwarzalność oceniono na podstawie wartości odchylenia standardowego (SD, *standard deviation*) i współczynnika zmienności (CV, *coefficient of variation*) [%], obliczonych na podstawie wyników trzech wymienionych próbek przeznaczonych dla każdego z ocenianych testów.

Test HBsAg Confirmatory

Test oceniano na podstawie wyników badania próbek wcześniej potwierdzonych w trakcie rutynowej weryfikacji (panel archiwalnych próbek serododatnich z pkt 2). Testu neutralizacji użyto także do potwierdzenia wyników powtarzalnie reaktywnych uzyskanych ocenianym testem *Elecsys® HBsAg II* w próbkach, które na podstawie wyników badań przeglądowych wykonanych w latach 2005–2011 zostały zaklasyfikowane jako *yield DNA HBV* (99 donacji seronegatywnych z wykrytym DNA HBV). Próbki obu grup badano równolegle testem potwierdzenia opartym na zasadzie neutralizacji antygeny HBs przez skierowane do niego przeciwciała, mającym znak CE IVD i rutynowo stosowanym w polskim krwiodawstwie.

Badania próbek NAT yields

Dodatkowo informacje o czułości klinicznej uzyskano na podstawie badania unikalnych próbek z wykrytym materiałem genetycznym (w osoczu badanym przeglądowo w minipulach [MP, *Minipool*] lub w pojedynczych donacjach [IDT, *Individual Donation Testing*], z dodatnim wynikiem molekularnego testu potwierdzenia RNA/DNA), a seronegatywnych — w pierwotnym badaniu przeglądowym technikami immunoenzymatycznymi. Próbki *NAT yields* obejmowały trzy panele:

— panel 91 próbek HCV *NAT yields* z lat 2000–2014, pierwotnie w trakcie badań przeglądowych badanych testem immunoenzymatycznym ELISA (Ortho, n = 63) lub testami chemiluminescencji: *Vitros* (Ortho, n = 9) lub *Architect* (Abbott, n = 19). Materiał genetyczny wirusa HCV wykryto za pomocą testów wykorzystujących PCR: w 43 przypadkach — testem *Cobas Amplicor* (Roche, MP48), w 10 — *Ampliscreen* (MP24), w 21 — MPX/MPX 2.0 (MP 6). W pozostałych 17 próbkach RNA HCV wykryto metodą TMA, z czego siedem — testem *Procleix HCV/HIV-1* (IDT, Chi-

ron, Novartis), pięć — *Ultrio HCV/HIV-1/HBV* (IDT, Novartis), cztery — *Ultrio Plus* (IDT, Novartis) i jeden — *Ultrio Elite* (IDT, Grifols). W przypadku 78 donacji znane były stężenia RNA HCV (*Cobas Amplicor HCV Monitor v2.0*, Roche), które wynosiły od $1,8 \times 10^2$ do $4,7 \times 10^7$ IU/ml). W 76 określono genotyp (*Versant HCV Genotype 2.0* [LiPA], Simens) — 33 były zakażone genotypem 1, 36 — genotypem 3a, a siedem — genotypem 4;

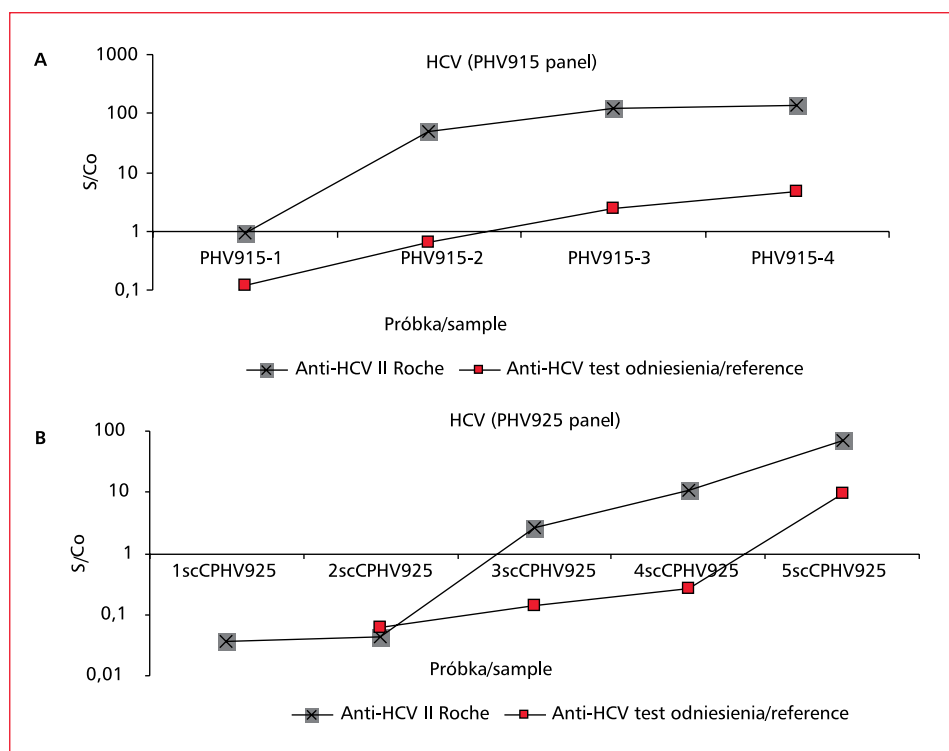
— panel 99 próbek HBV *NAT yields* z lat 2005–2011, w tym 18 zakażonych w tak zwanym pierwszym okienku serologicznym (I WP, *Pre-HBsAg Window Period*), pięć — z drugiego okienka serologicznego (II WP *Post-HBsAg Window Period*) i 76 — z ukrytym zakażeniem (OBI, *Occult hepatitis B Infection*). Wszystkie próbki były ujemne w badaniu przeglądowym wykonanym testem chemiluminescencji (*Architect* [Abbott, n = 65] lub *Vitros* [Ortho, n = 10]) lub immunoenzymatycznym: ELISA (Ortho, n = 14), *Hepanostica HBsAg Uni-form II* (Biomerieux, n = 19) albo *Monolisa HBsAg Ultra* (BioRad — Francja, n = 1). Materiał genetyczny wirusa wykryto testem *Cobas Ampliscreen* (Roche) łącznie w siedmiu próbkach (MP24), testem MPX (Roche) w 33 próbkach (MP6) oraz *Ultrio* (Novartis) w 59 donacjach;

— panel siedmiu próbek HIV *NAT yields*, z lat 2006–2014, ujemnych w badaniach przeglądowym testem immunoenzymatycznym ELISA (Ortho, n = 2) lub testem chemiluminescencji: *Vitros* (Ortho, n = 3) bądź *Architect* (Abbott, n = 2). Materiał genetyczny wirusa HIV wykryto w pięciu próbkach testem *Procleix Ultrio* (Novartis), a w dwóch próbkach — odpowiednio testami MPX oraz MPX 2.0 firmy Roche w puli z sześciu donacji.

Cobas e 601

Badania prowadzono przy użyciu *cobas e 601*, który jest w pełni automatycznym analizatorem immunochemicznym. Istnieje możliwość zestawienia dwóch pojedynczych modułów immunochemicznych w jednolitą, zintegrowaną platformę diagnostyczną. Możliwa jest także współpraca urządzenia z modulem przedanalizacyjnym *cobas p 312* [12].

Analizator *cobas e 601* składa się z dwóch jednostek: analitycznej (modułu immunochemicznego, układu scalającego [*core unit*], wraz z portami wejścia i wyjścia próbek, stacji uzdatniania wody i UPS) oraz sterującej (komputer i monitor dotykowy).



Rycina 1. Wyniki badania paneli serokonwersji HCV testem *Elecsys*® *Anti-HCV II* (Roche) i testem odniesienia

Figure 1. Results of seroconversion HCV panels tested with *Elecsys*® *Anti-HCV II* (Roche) and reference test

Producentem wszystkich odczynników, kalibratorów i kontroli jest Roche Diagnostics, a producentem analizatora *cobas e 601* — Hitachi High Technologies Corporation.

Wyniki

Test *Anti-HCV II*

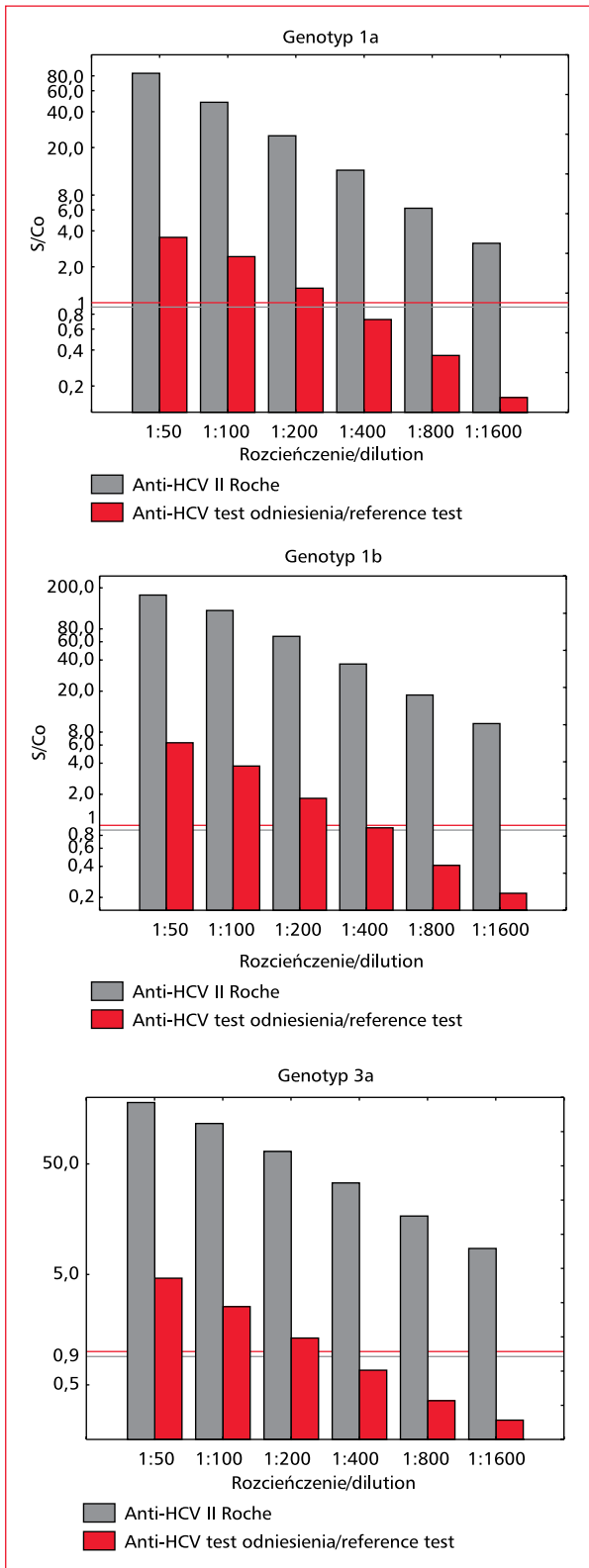
W trakcie oceny swoistości testu *Anti-HCV II* firmy Roche przy użyciu aparatu *cobas e 601* na 2508 próbek uzyskano wyniki niereaktywne w 2500 przypadkach oraz wyniki wstępnie reaktywne w ośmiu przypadkach (w tym 1 wynik graniczny). Po dwukrotnym powtórzeniu badań dla wszystkich ośmiu próbek otrzymano wyniki RR (w tym 1 wynik był powtarzalnie graniczny). Dla pięciu z ośmiu próbek (w tym również dla próbki z wynikiem granicznym w badaniu przeglądowym) uzyskano ujemne wyniki badania RNA HCV i testu uzupełniającego *Western blot HCV* (WB HCV). Dwie próbki były RNA HCV-ujemne z wynikiem „nieokreślony” w badaniu WB HCV, a w jednej wykryto RNA HCV. Biorąc pod uwagę próbki RR ujemne w badaniach weryfikacyjnych, swoistość ocenianego testu wyniosła 99,8% ($2500/2505 \times 100\% = 99,8\%$).

W panelu próbek *SeraCare PHV 915* (ryc. 1A) dla dwóch próbek otrzymano wyniki reaktywne

zarówno w ocenianym teście *Anti-HCV II*, jak i w teście odniesienia. Dla dwóch kolejnych próbek wyniki świadczące o toczącym się zakażeniu (wyniki reaktywny i graniczny) otrzymano tylko w ocenianym teście.

W panelu *SeraCare PHV 925* (ryc. 1B) próbka numer 5scC PHV 925 była reaktywna zarówno w ocenianym teście, jak i w teście odniesienia. Oceniany test umożliwił wykrycie dodatkowo przeciwciał anty-HCV w dwóch wcześniejszych próbkach panelu o numerach: 3scC PHV925 i 4scC PHV925. Wyniki badania obu paneli wskazują na wyższą czułość kliniczną testu ocenianego w porównaniu z testem odniesienia.

W panelu próbek archiwalnych IHiT w ocenianym teście *Anti-HCV II* firmy Roche, jak również w teście odniesienia dla wszystkich próbek, otrzymano wyniki zgodnie reaktywne (100%). W panelu rozcieńczeń tylko w ocenianym teście *Anti-HCV II* Roche dla wszystkich próbek wyniki były reaktywne. W teście odniesienia wyniki reaktywne otrzymano w rozcieńczeniach 1 : 50, 1 : 100 i 1 : 200 dla wszystkich badanych genotypów, natomiast w wyższych rozcieńczeniach (1 : 400, 1 : 800 i 1 : 1600) uzyskano wyniki niereaktywne (ryc. 2). Współczynniki zmienności CV dla powtarzalności i od-twarzalności wynosiły 2,5% i 6,3%, tym samym



Rycina 2. Czulość kliniczna testu *Elecsys*® *Anti-HCV II* (Roche) — wyniki badania paneli rozcieńczeniowych genotypów HCV w porównaniu do testu odniesienia

Figure 2. Clinical sensitivity of *Elecsys*® *Anti-HCV II* (Roche) — test results of plasma sample dilutions with HCV genotypes as compared to reference test

spełniły kryteria dla testów przeglądowych stosowanych w krwiodawstwie [10].

Spośród 91 próbek seronegatywnych zakaźnych HCV (*NAT yields* z lat 2000–2014) 11 (12%) było reaktywnych w ocenianym teście *Anti-HCV II* firmy Roche (tab. 1 i 2). Próbki reaktywne w teście *Anti-HCV II* Roche były wcześniej (tj. w trakcie rutynowego badania przeglądowego) badane testami immunoenzymatycznymi (EIA — ELISA [Ortho], n = 5) lub chemiluminescencji (*Architect* [Abbott], n = 5, i *Vitros* [Ortho], n = 1). RNA HCV wykryto w puli z 48 donacjami badanymi testem *Cobas Amplificor* (n = 4), w puli z sześcioma donacjami badanymi testami MPX (n = 2) lub MPX 2.0 (n = 2), a także w trzech próbkach badanych indywidualnie testami — odpowiednio: *Ultrio*, *Ultrio Plus*, *Ultrio Elite* (Grifols). W przypadku pięciu próbek genotyp był znany: cztery zostały zakażone genotypem 1b, jedna — genotypem 3a. W sześciu próbkach określono stężenie RNA HCV (*Cobas Amplificor HCV Monitor v2.0*), które wynosiło od $5,6 \times 10^4$ do $1,7 \times 10^6$ IU/ml.

Wyniki badania paneli serokonwersyjnych, paneli rozcieńczeń poszczególnych genotypów HCV oraz panelu unikalnych próbek RNA HCV dodatnich/seronegatywnych w pierwotnym badaniu przeglądowym wskazują na wysoką czulość ocenianego testu (tab. 2).

Test HBsAg II

W trakcie oceny swoistości testu *HBsAg II* firmy Roche w żadnej z ponad 2,5 tys. donacji nie uzyskano wyniku reaktywnego ani granicznego. Zatem swoistość ocenianego testu na podstawie wyników uzyskanych w badaniach przeglądowych bieżących dawców wyniosła 100% ($2508/2508 \times 100\% = 100\%$).

W panelu próbek *SeraCare PHM 934(M)* (ryc. 3A) dla wszystkich próbek otrzymano wyniki

Tabela 1. Czulość kliniczna ocenianych testów na podstawie wyników badania przypadków *NAT yield* zgromadzonych w latach 1999–2014

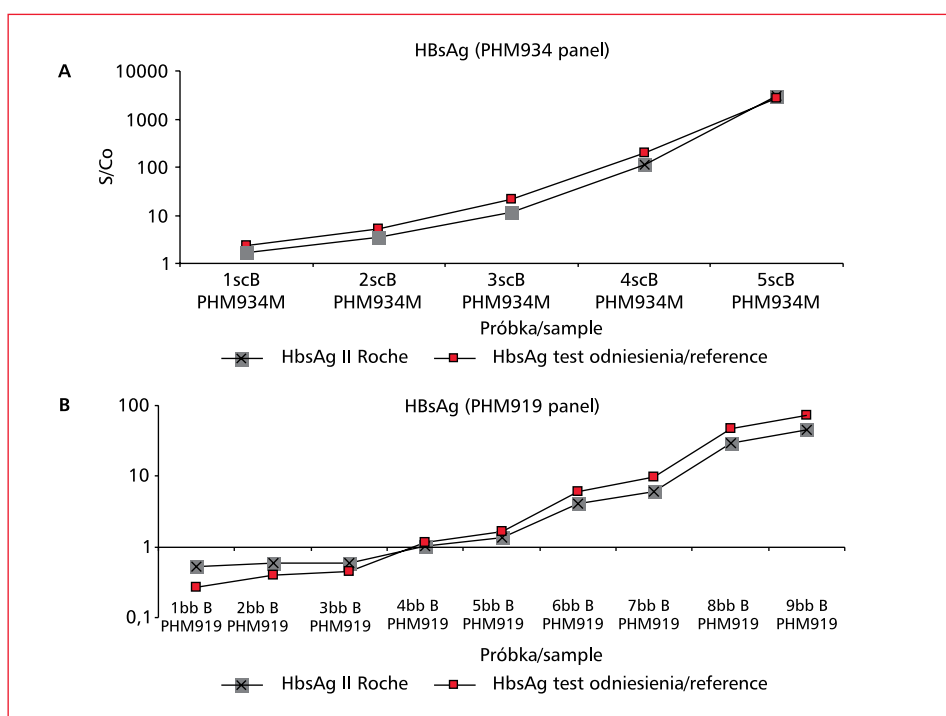
Table 1. Clinical sensitivity of evaluated assays based on *NAT yield* samples results of the 1999–2014 period

<i>NAT yields</i>	Liczba (%)	
	Przebadanych	Reaktywnych w teście ocenianym*
HCV	91	11 (12%)
HBV	99	6 (6%)
HIV	7	1 (14,3%)

*szczegóły zostały przedstawione w tabelach poniżej

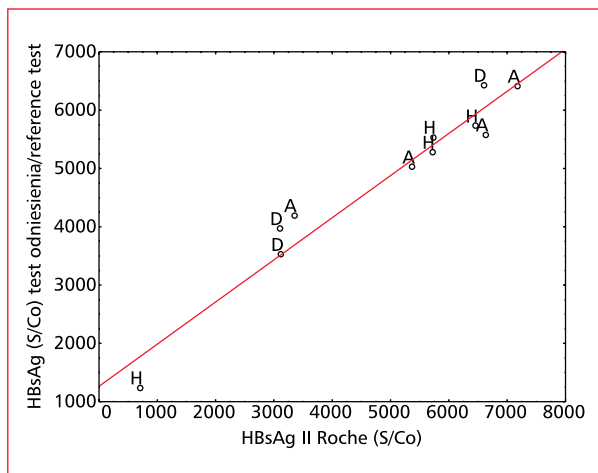
Tabela 2. Analiza reaktywności próbek RNA HCV yield ocenianym testem *Elecsys® Anti-HCV II* firmy Roche**Table 2.** Analysis of reactivity of RNA HCV yield samples tested in *Elecsys® Anti-HCV II* assay (Roche)

Numer próbki/test przeglądowy	Wyniki S/CO — test <i>Anti-HCV II</i> firmy Roche	Średnia arytmetyczna (S/CO)	Odchylenie standardowe	Współczynnik zmienności, CV (%)
21/EIA	1,84/1,49/1,57	1,63	0,183	11,23%
32/EIA	10,56/10,28/10,46	10,43	0,142	1,36%
41/EIA	3,15/3,08/3,01	3,08	0,07	2,27%
42/ELISA 3.0	3,15/3,13/3,14	3,14	0,01	0,32%
79/CMIA	6,82/6,66/6,79	6,76	0,08	1,26%
84/CMIA	3,23/3,18/3,22	3,21	0,026	0,82%
103/CMIA	1,71/1,68/1,65	1,68	0,03	1,79%
106/ECI	45,77/35,66/34,94	38,79	6,055	15,61%
114/ELISA 3.0	13,54/13,77/13,76	13,69	0,13	0,95%
118/CMIA	81,31/60,79/61,13	67,74	11,75	17,35%
119/CMIA	1,91/1,84/1,88	1,87	0,035	1,87%

**Rycina 3.** Badanie paneli serokonwersji HBV testem *Elecsys® HBsAg II* (Roche) i testem odniesienia**Figure 3.** Results of seroconversion HBV panels tested by *Elecsys® HbsAg II* (Roche) and reference test

zgodnie reaktywne (100%) w ocenianym teście *HBsAg II* Roche i w teście odniesienia. W panelu *BBI PHM 919* otrzymano zgodne wyniki testu ocenianego i testu odniesienia — ujemne dla próbek: 1bb B PHM919, 2bb B PHM919 i 3bb B PHM919; dla pozostałych próbek z tego panelu otrzymano wyniki reaktywne (ryc. 3B). Wyniki badania obu paneli wskazują na podobną czułość kliniczną testu

ocenianego oraz testu odniesienia. W panelu serodatnych próbek archiwalnych najczęściej wykrywanych genotypów w Polsce (ryc. 4) w ocenianym teście *HBsAg II* firmy Roche i w teście odniesienia dla wszystkich próbek ($n = 11$) otrzymano wyniki reaktywne (100% zgodności). W panelu rozcieńczeń próbek seropozytywnych (ryc. 5), zarówno w ocenianym teście *HBsAg II* Roche, jak i w teście



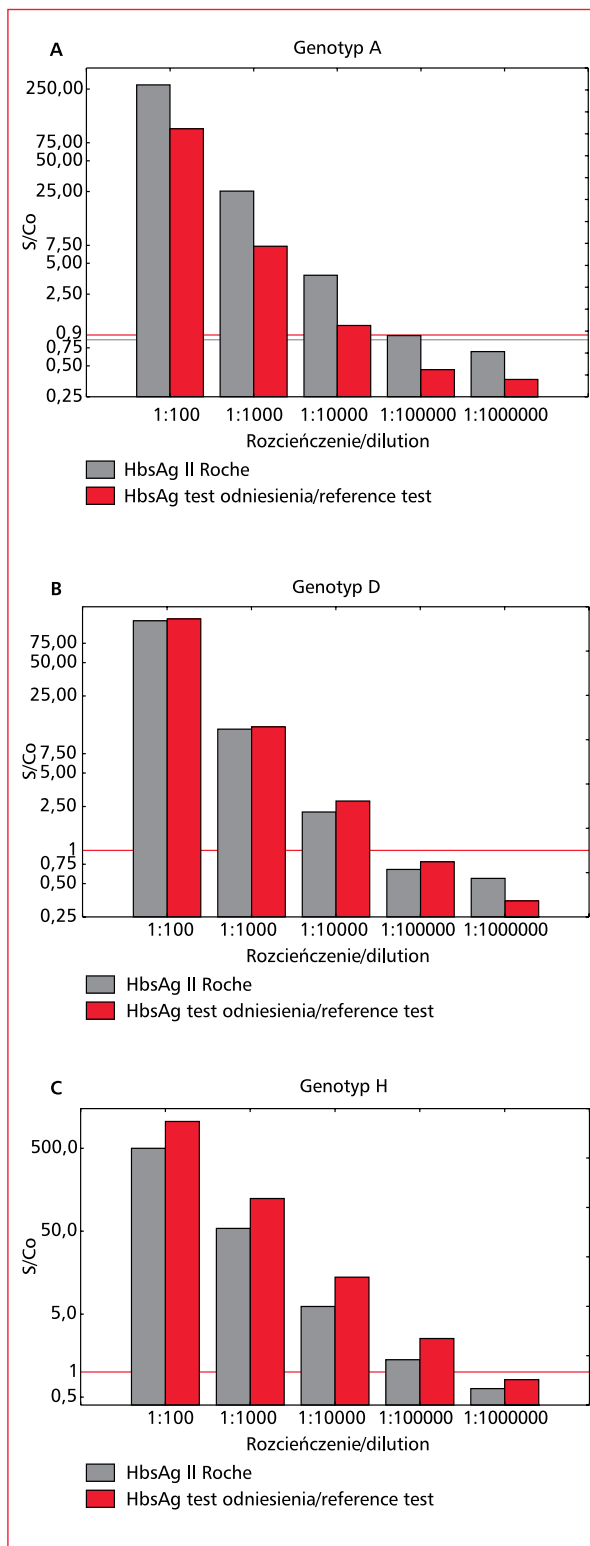
Rycina 4. Ocena czułości klinicznej testu — wyniki badania polskich próbek seropozytywnych zakażonych wirusem HBV. Każdy punkt obrazujący uzyskany wynik opisano literą oznaczającą genotyp wykrytego wirusa

Figure 4. Clinical sensitivity of *Elecsys*[®] *HBsAg II Test* (Roche) — test results of Polish HBV infected seropositive samples. Each point representing a test result is marked by the letter of the genotype

odniesienia, dla wszystkich próbek z wyjątkiem rozcieńczenia 1 : 100 000 (genotyp A) otrzymano wyniki zgodne. W rozcieńczeniu 1 : 100 000 (genotyp A) w ocenianym teście uzyskano wynik graniczny, a wynik badania testem odniesienia był ujemny. Wyniki badania panelu próbek rozcieńczonych wskazują na podobną czułość kliniczną testu ocenianego w porównaniu do testu odniesienia.

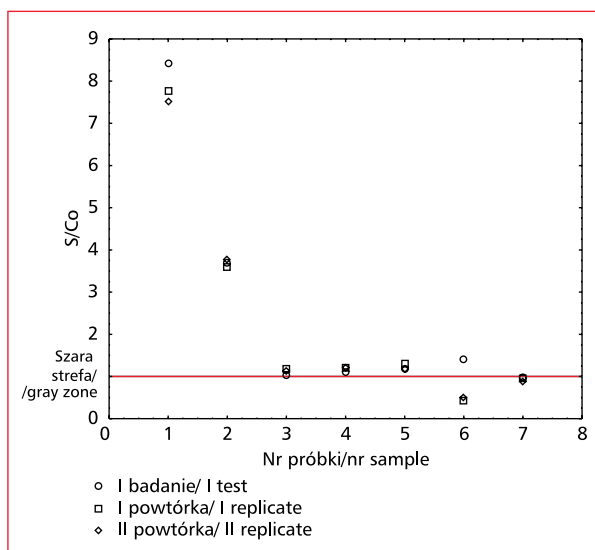
Współczynnik zmienności CV dla odtwarzalności wynosił poniżej 3,6%, a powtarzalności — 10,9%. Zarówno powtarzalność, jak i odtwarzalność wartości S/CO spełniają kryteria dla testów przeglądowych przeznaczonych do badania dawców krwi i wynoszą poniżej 20% [10].

W sześciu z 99 próbek (6,06%) panelu seronegatywnego HBV (donacje HBsAg ujemne w serologicznych badaniach przeglądowych, a dodatnie w DNA HBV) otrzymano wyniki powtarzalnie reaktywne przy użyciu ocenianego testu *HBsAg II* firmy Roche (ryc. 6, tab. 1 i 3). Próbki pochodziły z lat 2005–2011: dwie z fazy I WP, jedna z fazy II WP i trzy od dawcy z OBI. W serologicznym badaniu przeglądowym ujemne wyniki otrzymano testami immunoenzymatycznymi (*Hepanostica HBsAg Uniform II* [Biomerieux], n = 2, i ELISA [Ortho], n=3) oraz chemiluminescencji (*Architect* [Abbott], n = 1). W dwóch przypadkach materiał genetyczny został wykryty testem *Cobas Ampliscreen* (MP24, Roche), a w czterech — *Ultrio* (IDT, Novartis) (tab. 3).



Rycina 5. Wyniki badania testem *Elecsys*[®] *HBsAg II* (Roche) paneli rozcieńczeń donacji zakażonych najczęstszymi w Polsce genotypami HBV w porównaniu do testu odniesienia

Figure 5. *Elecsys*[®] *HBsAg II Test* (Roche) results of plasma sample dilutions of HBV genotypes most often identified in Poland as compared to reference test



Rycina 6. Ocena czułości klinicznej testu *Elecsys*® *HBsAg II* (Roche) — wyniki badania próbek seronegatywnych zakażonych wirusem HBV (tzw. *DNA HBV yield*)

Figure 6. Clinical sensitivity of *Elecsys*® *HBsAg II* (Roche) — results of *Polish HBV infected seronegative samples (DNA HBV yield)*

Wartości S/CO dla tych próbek przedstawiono na rycinie 6. Wszystkie powtarzalnie reaktywne wyniki w teście *HBsAg II* zostały potwierdzone testem *HBsAg Confirmatory* firmy Roche. Procent neutralizacji potwierdzający obecność antygenu powierzchniowego mieścił się w zakresie 45,9–89,9% (ryc. 7A).

Test neutralizacji

Po uzyskaniu wyników reaktywnych próbek panelowych (zarówno w ocenianym teście *HBsAg II* firmy Roche, jak i w teście odniesienia) — sero-

dotatnich próbek archiwalnych najczęściej wykrywanych genotypów w Polsce — wykonano badania potwierdzające obecność antygenu powierzchniowego zapalenia wątroby typu B za pomocą testu *HBsAg Confirmatory* firmy Roche (ryc. 7B) oraz testu odniesienia (ryc. 7C). Otrzymano dodatnie wyniki testu neutralizacji (zgodność 100%) dla wszystkich próbek — zarówno w ocenianym teście *HBsAg Confirmatory* firmy Roche, jak i w teście odniesienia. Procent neutralizacji potwierdzający obecność antygenu powierzchniowego w badanych próbkach wyniósł w ocenianym teście powyżej 97,4%.

Test HIV combi PT

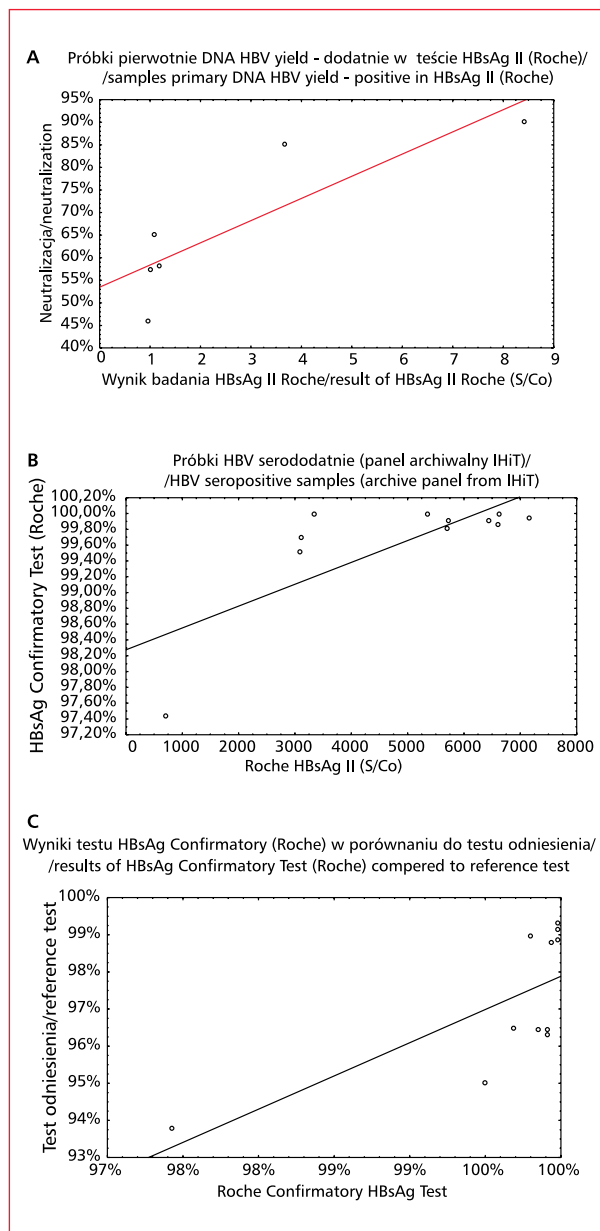
W trakcie badania swoistości *HIV combi PT* firmy Roche po przebadaniu 2508 próbek otrzymano wstępnie reaktywne wyniki dla 10 próbek (w tym 4 wyniki graniczne). Zgodnie z obowiązującym algorytmem dla badań przeglądowych dla próbek tych wykonano dwukrotne powtórzenie oznaczeń. Dla siedmiu z nich uzyskano wyniki RR, w tym dwa graniczne (w testach odniesienia donacje te generowały wyniki ujemne). Dla trzech próbek wstępnie reaktywnych w wykonanych dwóch powtórzeniach otrzymano wyniki niereaktywne. W żadnej z próbek RR w ocenianym teście nie otrzymano dodatnich wyników w testach potwierdzenia wykrywających RNA HIV oraz w badaniu *Western blot HIV*. Swoistość ocenianego testu w badaniu IHiT wyniosła 99,6%.

W panelu *SeraCare PRB 966* dla trzech próbek (8scI PRB966, 9scI PRB966 i 10scI PRB966) otrzymano wyniki zgodnie reaktywne (100%) zarówno w ocenianym teście *HIV combi PT* firmy Roche, jak i w teście odniesienia. Dla pozostałych próbek panelu otrzymano wyniki niereaktywne w obu testach (ryc. 8A). W panelu BBI PRB 958 dla dwóch

Tabela 3. Analiza reaktywności próbek *DNA HBV yield* w badaniu ocenianym testem *HBsAg II* firmy Roche — próbki reaktywne

Table 3. Analysis of reactivity of *DNA HBV yield* samples obtained in evaluated *HBsAg II* assay (Roche) — reactive samples

Numer próbki/ /test przeglądowy	Wyniki S/CO — test <i>HB sAg II</i> firmy Roche	Średnia arytmetyczna (S/CO)	Odchylenie standardowe	Współczynnik zmienności, CV (%)	% neutralizacji testem <i>HBsAg</i> <i>Confirmatory</i> firmy Roche
3/ELISA	8,42/7,79/7,51	7,91	0,466	5,89%	89,9%
16/ELISA	3,69/3,59/3,78	3,69	0,065	2,58%	85%
17/ELISA	1,03/1,18/1,14	1,17	0,077	6,96%	57,3%
18/ELISA	1,1/1,22/1,21	1,18	0,066	5,66%	65,1%
26/ELISA	1,19/1,32/1,19	1,23	0,75	6,09%	58,2%
140/CMIA	0,974/0,958/0,89	0,93	0,042	4,51%	45,9%



Rycina 7. Wyniki badania testem neutralizacji *Elecsys*[®] *HBsAg Confirmatory Test* (Roche) próbek pierwotnie seronegatywnych (tzw. *DNA HBV yields*) w rutynowych przeglądowych badaniach HBsAg wykonywanych w Regionalnym Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa (7A) oraz seropozytywnych (7B) w zależności od S/CO uzyskanego w badaniu testem przeglądowym *Elecsys*[®] *HBsAg II* (Roche) oraz porównanie procentu neutralizacji z wynikami uzyskanymi w teście odniesienia (7C — próbki seropoztywne)

Figure 7. Results of *Elecsys*[®] *HBsAg Confirmatory Test* (Roche) in primary seronegative samples (DNA HBV yields) (7A) and seropositive (7B) in relation to S/CO results of *Elecsys*[®] *HBsAg II Test* (Roche); comparison of neutralization % with reference to neutralization test results (7C — seropositive samples)

próbek — 1bb I PRB958 i 2bb I PRB958 — otrzymano wyniki niereaktywne zarówno w ocenianym teście *HIV combi PT* firmy Roche, jak i w teście odniesienia; w pozostałych próbkach panelu uzyskano wyniki zgodnie reaktywne w obu testach (ryc. 8B). Wyniki badania obu paneli wskazują na podobną czułość kliniczną testu ocenianego i testu odniesienia.

Wszystkie próbki (n = 3) panelu archiwalnego pierwotnie serododatnie w badaniu przeglądowym anti-HIV były zgodnie reaktywne w teście *HIV combi PT* firmy Roche oraz w teście odniesienia (czułość kliniczna — 100%).

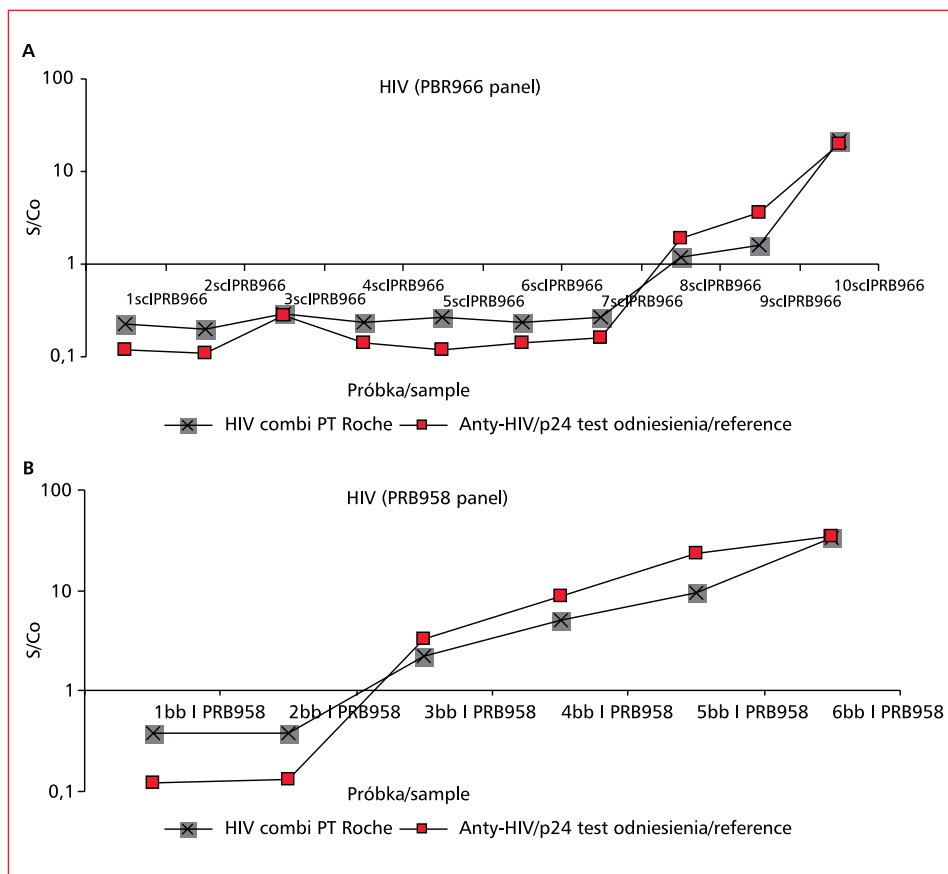
Na rycinie 9 przedstawiono wyniki badań paneli rozcieńczeń próbek serododatnich pochodzących z donacji pobranych w różnych fazach zakażenia HIV. Dla rozcieńczeń pierwszej próbki z donacji pochodzącej z wczesnego etapu zakażenia (RNA HIV+, WB-, prawdopodobnie p24+) w ocenianym teście oraz w teście odniesienia otrzymano wyniki zgodnie reaktywne (ryc. 9A). Pozostałe rozcieńczenia próbek panelowych (RNA HIV+, WB+) dawały wyniki zgodnie reaktywne aż do rozcieńczeń odpowiednio 1 : 1000 i 1 : 10. Wyniki reaktywne wyłącznie w ocenianym teście obserwowano w rozcieńczeniach odpowiednio 1 : 10.000 i 1 : 100 (ryc. 9B i 9C).

Współczynniki zmienności CV dla powtarzalności (3,6%) i odtwarzalności (6,4%) wartości S/CO wynosiły poniżej 20%, zatem spełniają kryteria dla testów przeznaczonych do prowadzenia badań przeglądowych w krwiodawstwie. W badaniu testem *HIV combi PT* firmy Roche siedmiu donacji seronegatywnych (anty-HIV-, RNA HIV+) otrzymano w pierwotnym serologicznym badaniu przeglądowym w jednej próbce (14,3%) wynik RR (ryc. 10, tab. 1 i 4). Była to próbka z 2008 roku, pierwotnie badana testem przeglądowym *Architect* (Abbott), a materiał genetyczny wykryto testem *Procleix Ultrio* (Novartis).

Test Syphilis

W trakcie oceny swoistości uzyskano wyniki RR w dwóch z 2508 próbek. Obie były ujemne w teście odniesienia i nie potwierdzono w nich obecności przeciwciał krętkowych testem TPHA i *WB Treponema*. W związku z tym swoistość testu *Syphilis* firmy Roche została oszacowana na 99,9% ($2506/2508 \times 100\% = 99,9\%$).

W panelu próbek *SeraCare PSS 901* (ryc. 11A) dla czterech próbek otrzymano wyniki zgodnie reaktywne (100%) w ocenianym teście i w teście odniesienia. Dla pozostałych próbek w tym panelu



Rycina 8. Wyniki badania paneli serokonwersyjnych HIV testem *Elecsys*® *HIV combi PT* (Roche) i testem odniesienia
Figure 8. Results of seroconversion HIV panels tested with *Elecsys*® *HIV Combi PT* (Roche) and reference test

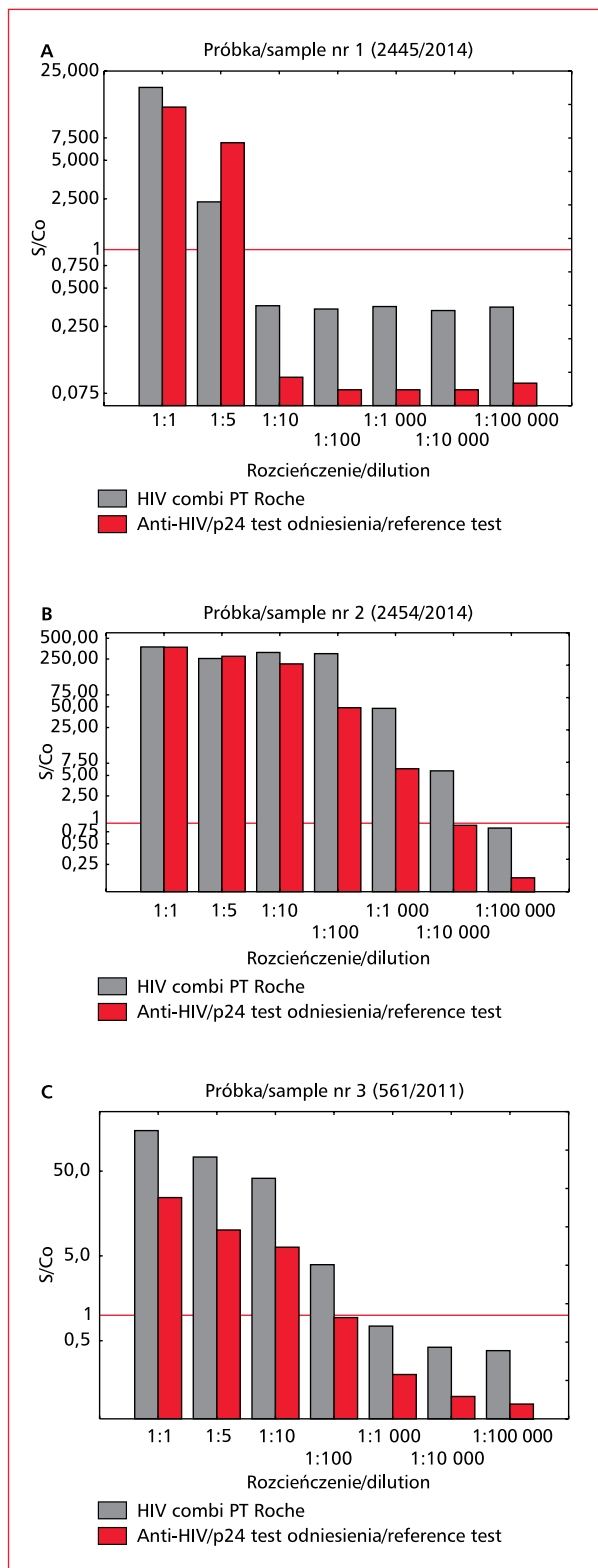
uzyskano w obu testach wyniki zgodnie niereaktywne. Podobnie w panelu TP 901 (ryc. 11B) dla czterech próbek otrzymano wyniki reaktywne zarówno w ocenianym teście *Syphilis* firmy Roche, jak i w teście odniesienia, a dla pozostałych próbek z tego panelu wyniki były zgodnie niereaktywne. Wyniki badania paneli serokonwersyjnych wskazują na podobną czułość kliniczną testu ocenianego i testu odniesienia.

Wartości S/CO wyników badania donacji wchodzących w skład panelu serododatnich próbek archiwalnych przedstawiono na rycinie 12. W przypadku wszystkich próbek zarówno w teście ocenianym, jak i w testach odniesienia otrzymano wyniki reaktywne (zgodność/czułość kliniczna — 100%).

Przedstawione na rycinie 13 wyniki badania panelu rozcieńzeniowego wskazują na porównywalną czułość ocenianego testu i testu odniesienia. Współczynniki zmienności CV dla powtarzalności i odtwarzalności nie przekraczały 20% i wynosiły odpowiednio 3,2% i 3,3%.

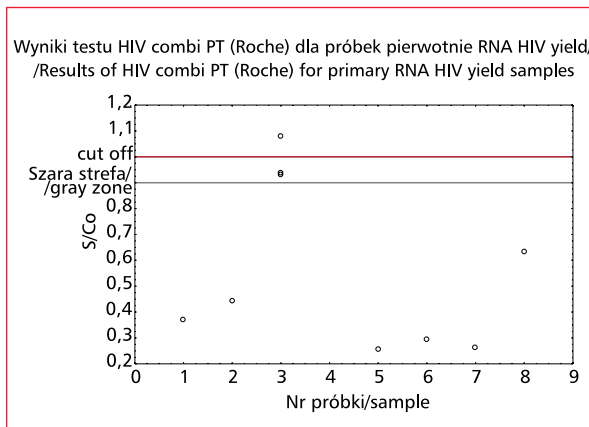
Obserwacje dotyczące analizatora cobas e 601

W trakcie badań potwierdzono, że aparat przystosowany jest do pracy ciągłej, przez 24 godziny na dobę. Uzyskano także deklarowaną przez producenta wydajność oznaczeń w kierunku serologicznych markerów zakażenia HCV, HBV, HIV i kiły wynoszącą około 170 na godzinę. Pierwsze wyniki oznaczeń anty-HCV, HBsAg oraz anty-TP otrzymuje się po 18 minutach, a dla HIV (Ag/Ab) — po 27 minutach od pobrania próbki. Aparat nie podaje dokładnego czasu zakończenia badań w trakcie ich wykonywania, natomiast czas zakończenia badania jest rejestrowany po wykonaniu analizy. W przypadku uzyskania wyniku reaktywnego można bezzwłocznie nastawić badania powtarzne, ale pod zmodyfikowanym numerem kodu. W trakcie oceny korzystano z możliwości oznaczania czterech z 25 różnych parametrów jednocześnie (rotor analizatora zawiera 25 pozycji odczynnikowych). Jednostka analityczna zawiera w podajniku 150 pozycji dla próbek badanych



Rycina 9. Wyniki badania testem *Elecsys® HIV combi PT* (Roche) paneli rozcieńczeń próbek seropozytywnych zakażonych HIV w porównaniu do testu odniesienia

Figure 9. Clinical sensitivity of *Elecsys® HIV Combi PT Test* (Roche) — test results of HIV seropositive plasma sample dilutions as compared to reference test



Rycina 10. Wyniki badania donacji RNA HIV *yield* testem *HIV Elecsys® combi PT* (Roche)

Figure 10. Test results of RNA HIV yield donations with *HIV Elecsys® combi PT* (Roche)

z możliwością ciągłego ich dokładania bez przerywania pracy analizatora oraz port na próbki do badań *cito*. Do badań stosowano próbki różnego rodzaju i wielkości (Becton Dickinson, Sarstedt). Najczęściej stosowano próbki z żelem pozwalające na badanie surowicy.

Informacje dotyczące wstawianych na pokład odczynników są wczytywane automatycznie do analizatora na podstawie kodu kreskowego. Odczynniki przechowuje się na pokładzie aparatu w warunkach zabezpieczających ich stabilność, w stałej temperaturze, niezależnej od warunków otoczenia. Uzupełnienie odczynników na pokładzie aparatu wykonuje się w trybie *stand-by*. Odczynniki przechowywane na pokładzie analizatora są ważne do 4 tygodni, licząc od daty ich użycia po raz pierwszy.

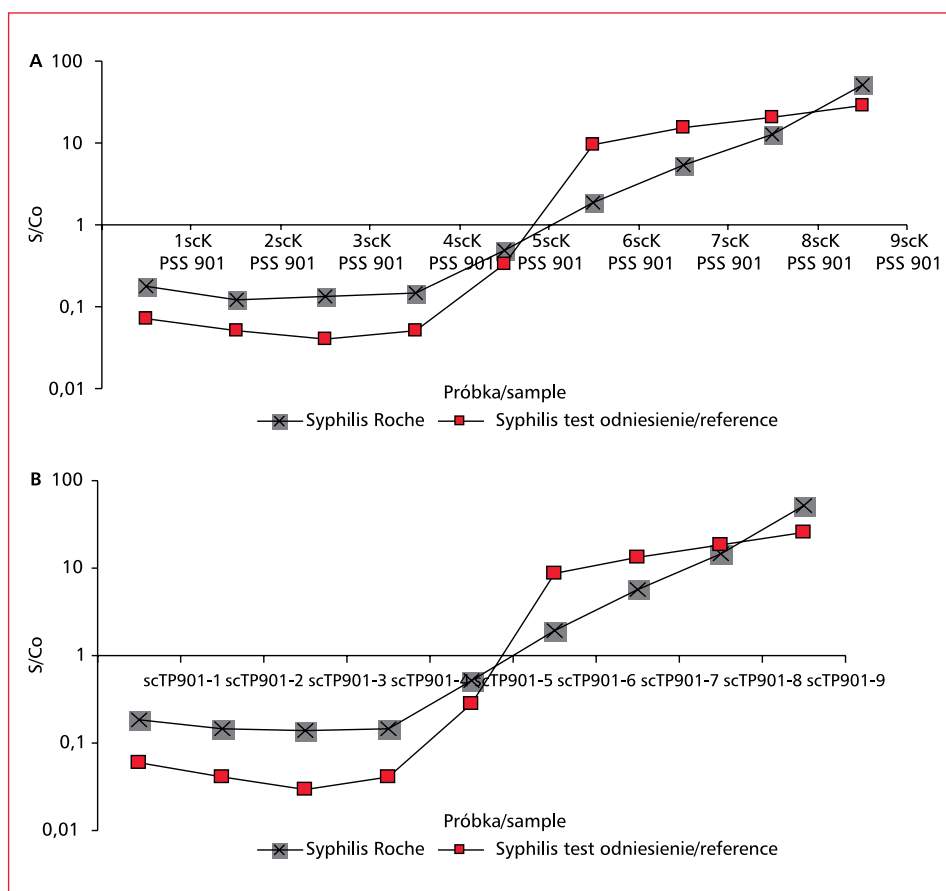
Czynności konserwacyjne są zautomatyzowane, proste do przeprowadzenia i mało czasochłonne. Obejmują dwie procedury: wykonywaną jeden raz na tydzień (automatyczne płukanie oraz manualną wymianę naczynek do buforów *ProCell* i *CleanCell*) oraz jeden raz na dwa tygodnie (wymiana naczynek oraz automatyczne mycie płynem ISE, *Cleaning Solution*). Bufory i płyny wykorzystywane w analizatorze są gotowe do użycia. Każda wykonana czynność jest rejestrowana w systemie komputerowym analizatora. W trakcie trwania oceny systemu aparat ani razu nie uległ awarii i nie była potrzebna interwencja serwisanta.

Producent deklaruje, że połączenie internetowe *cobas link* umożliwia zdalne uaktualnienie aplikacyjne i monitorowanie serwisowe 24 godziny na dobę oraz bezpośrednią pomoc specjalistów

Tabela 4. Analiza reaktywności próbek RNA HIV yields w badaniu testem HIV combi PT firmy Roche

Table 4. Analysis of reactivity of RNA HIV yield samples in HIV combi PT assay (Roche)

Numer próbek/test przeglądowy	Wyniki S/CO — test HIV combi PT firmy Roche	Średnia arytmetyczna (S/CO)	Odchylenie standardowe	Współczynnik zmienności, CV (%)
3/CMIA	0,929/0,937/1,08	0,054	0,082	1,52%



Rycina 11. Wyniki badania paneli serokonwersyjnych TP testem Elecsys® Syphilis (Roche) i testem odniesienia

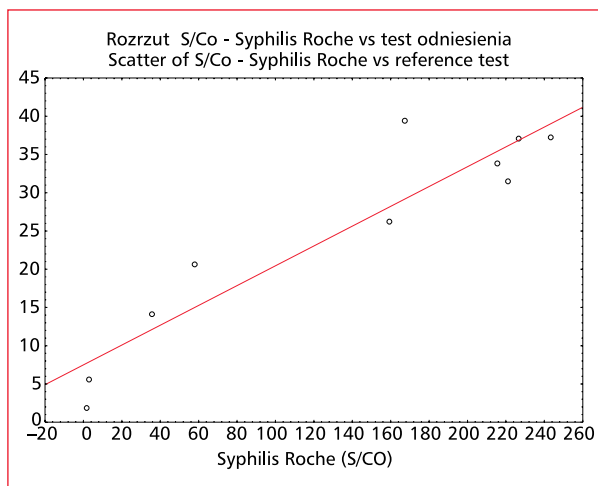
Figure 11. Results of seroconversion TP panels tested with Elecsys® Syphilis (Roche) and reference test

aplikacyjnych oraz inżynierów serwisowych *on-line*. W czasie oceny funkcje te nie były wykorzystywane, ponieważ badania prowadzono w trybie *off-line*.

Dyskusja

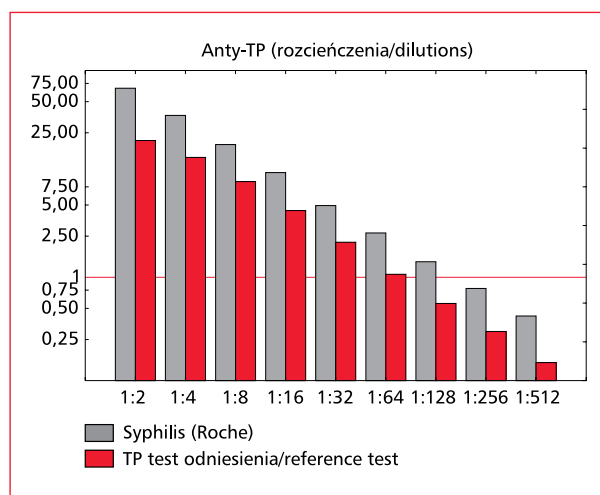
Dotychczas w Polsce technologia elektrochemiluminescencji nie była stosowana do prowadzenia badań przeglądowych markerów serologicznych u dawców krwi. Niniejsza publikacja stanowi pierwszą wyczerpującą charakterystykę testów tego typu do prowadzenia krajowych badań krwiodawców.

Badania ewaluacyjne zostały wykonane równoległe z badaniami przeglądowymi z użyciem testów i aparatów rutynowo stosowanych w polskim krwiodawstwie. Grupa badana obejmowała ponad 2,5 tys. kolejnych donacji. Brak informacji o dokładnej liczbie donacji pochodzących od dawców pierwszorazowych i wielokrotnych w analizowanej grupie. Z ogólnych danych dla polskiego krwiodawstwa wynika, że około 80% donacji pochodzi od dawców wielokrotnych, a około 20% — od dawców pierwszorazowych (dane zbiorcze IHiT z lat 2005–2015). W związku z powyższym w grupie donacji uczestniczących w badaniu prawdopodobnie



Rycina 12. Wyniki badania testem *Elecsys*[®] *Syphilis* (Roche) próbek TP seropozytywnych (z wykrytymi anti-TP)

Figure 12. *Elecsys*[®] *Syphilis* (Roche) Test results of TP seropositive samples (anti-TP detected)



Rycina 13. Wyniki badania panelu rozcieńczeniowego próbek anti-TP testem *Elecsys*[®] *Syphilis* (Roche) w porównaniu do testu odniesienia

Figure 13. Test results of TP infected plasma sample dilutions with *Elecsys*[®] *Syphilis* Test (Roche) as compared to reference test

4/5 pochodziło od dawców, którzy byli wcześniej badani na obecność markerów zakażeń HIV, HCV, HBV i *Treponema pallidum*. W wyniku tych badań odsunięto od krwiodawstwa (dyskwalifikacja czasowa) dawców, u których występowały wyniki BFR w testach stosowanych w poszczególnych centrach (I i II test odniesienia). W przypadku ocenianych testów wszystkie donacje (pochodzące od dawców zarówno pierwszorazowych, jak i wielokrotnych)

włączone do ewaluacji były badane nimi po raz pierwszy. Powyższa charakterystyka badanych dawców oraz fakt, że zakres występowania wyników BFR jest charakterystyczny dla danego testu, tłumaczy uzyskane różnice swoistości testów ocenianych i testów odniesienia. Otrzymane wyniki częstości BFR dla każdego z ocenianych testów wskazują przede wszystkim na swoistość, jaką będzie wykazywał test w pierwszych miesiącach po jego wprowadzeniu do badań rutynowych. W okresie późniejszym należy się spodziewać mniejszej liczby wyników nieswoistych.

Uzyskane przez nas wyniki dotyczące zarówno swoistości, jak i czułości testów są podobne do deklarowanych przez producenta oraz obserwacji innych autorów.

Swoistość testu *Anti-HCV II* na poziomie 99,8% ($2500/2505 \times 100\% = 99,8\%$) uzyskana w badaniu w IHiT jest zbliżona do deklarowanej przez producenta swoistości klinicznej, która w grupie 6850 losowo wybranych europejskich dawców krwi wynosiła 99,84%. Podobnie, maksymalna możliwa swoistość 100%, uzyskana w badaniu testem *Elecsys*[®] *HBsAg II*, jest zgodna z ustaleniami producenta, który w grupie 6360 europejskich dawców krwi uzyskał swoistość kliniczną wyższą niż 99,9%. W IHiT parametr ten wynosił: 99,6% i 99,9% odpowiednio dla testów *Elecsys*[®] *HIV combi PT* i *Syphilis* firmy Roche. We wcześniejszych analizach dokonanych u ponad 7 tys. dawców z Azji oraz Europy swoistość tych testów kształtowała się na poziomie odpowiednio 99,77% i 99,88%.

W niezależnych badaniach obejmujących około 6 tys. donacji pochodzących od dawców pierwszorazowych i 14 tys. donacji od dawców wielokrotnych przeprowadzonych w laboratoriach czterech banków krwi na terenie Austrii, Niemiec, Hiszpanii i Tajlandii wykazano, że swoistość testów *Elecsys*[®] *HBsAg II*, *Elecsys*[®] *Anti-HCV II* i *Elecsys*[®] *HIV combi PT* kształtuje się na poziomie powyżej 99,5%, oraz nie stwierdzono istotnych różnic między dawcami pierwszorazowymi a wielokrotnymi [13].

W przedstawionych badaniach czułość kliniczną oceniano na podstawie analizy markerów zakażenia wykrywanych w poszczególnych próbkach paneli serokonwersyjnych, szczegółowo scharakteryzowanych wirusologicznie próbek pochodzących od zakażonych polskich dawców krwi oraz w rozcieńczeniach tych próbek. Wyniki odnoszono do rezultatów badań wykonanych za pomocą testów dotychczas stosowanych w badaniach przeglądowych polskich krwiodawców. W badaniach paneli serokonwersji w ocenianych

testach *HBsAg II*, *HIV combi PT*, *Syphilis* oraz w testach odniesienia uzyskiwano wyniki reaktywne dla tych samych próbek. Test *Anti-HCV II* w obu panelach serokonwersyjnych *Sera Care* wykrywał przeciwciała anti-HCV dodatkowo we wcześniejszych próbkach paneli w porównaniu z testem odniesienia. Wyniki te są zgodne z obserwacjami zespołu Yanga, który stwierdził, że test *Elecsys® Anti-HCV II* wykrywa serokonwersję 7–14 dni wcześniej niż testy anti-HCV w systemach *Architect* i *Vitros*, co oznacza, że efektywniej skraca okienko serologiczne [14].

Czułość kliniczna wyznaczona na podstawie wyników badania próbek *NAT yields* dla testów *Elecsys®* wynosiła 12% dla HCV (11/91), 6% dla HBV (6/99) oraz 14% dla HIV (1/7), co wskazuje na ich wyższą efektywność w porównaniu z serologicznymi testami zastosowanymi do badań przeglądowych w latach 2000–2014. W przypadku wszystkich ocenianych testów czułość kliniczna oznaczona na podstawie badania nierozcieńczonych próbek serododatnich (o najczęściej wykrywanych w Polsce genotypach) wynosiła 100%, a wyniki badań paneli rozcieńczeń tych próbek wskazują na wyższą czułość testów *Elecsys®* w porównaniu do testów odniesienia.

Podsumowując, oceniane testy: *Anti-HCV II*, *HIV combi PT*, *HBsAg II* oraz *Syphilis* charakteryzują się:

- czułością wykrywania markerów serologicznych w próbkach od zakażonych osób serododatnich porównywalną do czułości testów obecnie używanych w krwiodawstwie (zastosowanych testów odniesienia), przy czym należy podkreślić wyższą czułość ocenianego testu *Anti-HCV II*;
- swoistością porównywalną do swoistości deklarowanej przez producenta i spełniającą kryteria Dyrektywy 98/79/EC dotyczącej wyrobów medycznych używanych do diagnozy *in vitro* (IVD) przeznaczonych do badania markerów anti-HCV, anti-HIV i HBsAg [4, 5];
- dobrą powtarzalnością i odtwarzalnością wartości S/CO.

Test *HBsAg Confirmatory* cechuje dobra skuteczność potwierdzania wyników HBsAg.

Testy *Elecsys® Anti-HCV II*, *Elecsys® HIV combi PT*, *Elecsys® HBsAg II*, *Elecsys® Syphilis* wraz z aparatem *cobas e 601* firmy Roche mogą być używane w krwiodawstwie do przeglądowych badań serologicznych, a test *Elecsys® HBsAg Confirmatory* — do potwierdzania powtarzalnie reaktywnych wyników badań przeglądowych w kierunku HBsAg.

Podziękowania

Autrzy dziękują za pomoc przy realizacji badań pani Anecie Niciejewskiej (Roche Diagnostics), dr Ulrike Schulte-Spechte (Roche Diagnostics), mgr Kamili Kledzik (RCKiK w Bydgoszczy), mgr Dorocie Malce (RCKiK w Warszawie) oraz mgr Katarzynie Tkaczuk — za pomoc przy przygotowaniu publikacji.

Badania zostały sfinansowane przez Roche Diagnostics Polska Sp. z o.o.

Piśmiennictwo

1. Brojer E, Grabarczyk P. (red.). Czynniki zakaźne istotne w transfuzjologii. Fundacja Pro Pharmacia Futura 2015: Warszawa.
2. Grabarczyk P, Kopacz A, Sulowska E, et al. Blood donors screening for blood born viruses in Poland. *Przegl Epidemiol.* 2015; 69(3): 473–7, 591, indexed in Pubmed: [26519842](#).
3. Rosiek A, Tomaszewska A, Lachert E. Działalność jednostek organizacyjnych służby krwi w Polsce w 2014 r. *J Transf Med.* 2015; 8: 119–132.
4. Dyrektywa 98/79/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 27 października 1998 r. w sprawie wyrobów medycznych używanych do diagnozy *in vitro*.
5. Ustawa z dnia 20 maja 2010 r. o wyrobach medycznych (Dz.U. z 2017 r., poz. ; 211.
6. Esteban JI, van Helden J, Alborino F, et al. Multicenter evaluation of the Elecsys® anti-HCV II assay for the diagnosis of hepatitis C virus infection. *J Med Virol.* 2013; 85(8): 1362–1368, doi: [10.1002/jmv.23536](#), indexed in Pubmed: [23765774](#).
7. Yoo SJ, Wang LL, Ning HC, et al. Evaluation of the Elecsys® Anti-HCV II assay for routine hepatitis C virus screening of different Asian Pacific populations and detection of early infection. *J Clin Virol.* 2015; 64: 20–27, doi: [10.1016/j.jcv.2014.12.015](#), indexed in Pubmed: [25728074](#).
8. Ustawa z dnia 22 sierpnia 1997 r. o publicznej służbie krwi (Dz.U. z 2014 r., poz. 332 ze zm.
9. Decyzja Komisji z dnia 27 listopada 2009 r. zmieniająca decyzję 2002-364-WE w sprawie wspólnych specyfikacji technicznych dla wyrobów medycznych używanych do diagnozy *in vitro*.
10. Łętowska M. (red.). Medyczne zasady pobierania krwi, oddzielania jej składników i wydawania obowiązujące w jednostkach organizacyjnych publicznej służby krwi. Wyd. 3. Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa 2014.
11. Welzel TM, Miley WJ, Parks TL, et al. Real-time PCR assay for detection and quantification of hepatitis B virus genotypes A to G. *J Clin Microbiol.* 2006; 44(9): 3325–3333, doi: [10.1128/JCM.00024-06](#), indexed in Pubmed: [16954268](#).
12. Sulowska E, Liszewski G, Chud-Wiśniewska W, et al. Zastosowania analizatora cobas® p 312 do automatyzacji fazy przedanalizycznej badań wirusologicznych w Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa. *J Transf Med.* 2016; 9(1): 24–31.
13. Schmidt M, Jimenez A, Mühlbacher A, et al. Head-to-head comparison between two screening systems for HBsAg, anti-HBc, anti-HCV and HIV combination immunoassays in an international, multicentre evaluation study. *Vox Sang.* 2015; 109(2): 114–121, doi: [10.1111/vox.12259](#), indexed in Pubmed: [25899479](#).
14. Yang R, Guan W, Wang Q, et al. Performance evaluation and comparison of the newly developed Elecsys anti-HCV II assay with other widely used assays. *Clin Chim Acta.* 2013; 426: 95–101, doi: [10.1016/j.cca.2013.09.010](#), indexed in Pubmed: [24056023](#).