

Aptima® HIV-1 Quant Dx Assay

K diagnostickému použití *in vitro*.

Pouze k vývozu z USA.

Obecné informace	2
Určené použití	2
Shrnutí a vysvětlení testu	2
Principy postupu	3
Varování a bezpečnostní opatření	4
Požadavky na skladování reagentů a zacházení s nimi	7
Odběr a skladování vzorků	8
Vzorky v systému Panther	12
Přeprava vzorků	12
Systém Panther®	13
Reagencie a materiály, které jsou součástí dodávky	13
Požadované materiály, které jsou dodávány samostatně	15
Volitelné materiály	16
Postup testu na systému Panther	16
Poznámky k postupu	20
Kontrola kvality	21
Kalibrace testu	21
Negativní a pozitivní kontroly	21
Vnitřní kalibrátor / vnitřní kontrola	21
Interpretace výsledků	22
Omezení	24
Výkonnost	25
Limit detekce (LoD) pomocí 3. mezinárodního standardu HIV-1 WHO	25
Limit detekce u subtypů a skupin HIV-1	26
Lineární rozsah	27
Linearita u subtypů a skupin HIV-1	28
Spodní limit kvantifikace pomocí 3. mezinárodního standardu HIV-1 WHO	29
Ověření limitu LLoQ u subtypů a skupin HIV-1	30
Přesnost	31
Potenciálně interferující látky	32
Specifita	34
Analytická specifita	35
Opakovatelnost klinických vzorků	36
Ředění vzorků pomocí roztoku k ředění vzorků	37
Korelace metod	38
Diagnostická shoda	39
Přenos	39
Panel sérokonverze	40
Studie ekvivalence séra, plazmy	41
Literatura	42

Obecné informace

Určené použití

Test Aptima® HIV-1 Quant Dx je *in vitro* test na bázi amplifikace nukleových kyselin k detekci a kvantifikaci RNA skupin M, N a O lidského viru imunodeficiency typu 1 (HIV-1) na plně automatizovaném systému Panther®. Slouží k použití jako pomůcka při diagnostice infekce HIV-1, jako potvrzení infekce HIV-1 a jako pomůcka při klinické péči o pacienty infikované HIV-1.

Test Aptima HIV-1 Quant Dx lze použít jako pomůcku při diagnostice infekce HIV-1, včetně akutní nebo primární infekce. Přítomnost HIV-1 RNA v plazmě nebo séru pacientů bez protilátek vůči HIV-1 svědčí pro akutní nebo primární infekci HIV-1. Test Aptima HIV-1 Quant Dx lze použít jako doplňkový test na vzorky s opakovaně reaktivními výsledky se schválenými imunoanalýzami HIV. Pokud je vzorek reaktivní v testu Aptima HIV-1 Quant Dx, je potvrzená infekce HIV-1.

Test Aptima HIV-1 Quant Dx lze také použít v kombinaci s klinickou prezentací a jinými laboratorními markery k prognóze onemocnění u osob infikovaných HIV-1. Test Aptima HIV-1 Quant Dx lze také použít jako pomůcku při sledování vlivu antiretrovirové léčby na základě změn v koncentraci HIV-1 RNA v plazmě.

Při použití testu Aptima HIV-1 Quant Dx jako pomůcky při diagnostice infekce HIV-1 je kvalitativní výkonnost stanovena ve vzorcích plazmy a séra.* Při použití jako pomůcky ke sledování vlivu antiretrovirové terapie je kvantitativní výkonnost stanovena pouze u vzorků plazmy. Vzorky séra se nesmí používat pro kvantitativní výsledky.

Tento test není určen k použití při screeningu dárců krve nebo plazmy.

Shrnutí a vysvětlení testu

Epidemiologické studie identifikovaly lidský virus imunodeficiency typu 1 (HIV-1) jako etiologické agens syndromu získané imunodeficiency (AIDS) (1-7). HIV lze přenášet sexuálním kontaktem, kontaktem s infikovanou krví nebo krevními produkty nebo přenosem z matky na dítě (8). Do 3 až 6 týdnů od expozice HIV se u infikovaných osob obecně rozvine rychlý akutní syndrom charakterizovaný příznaky podobnými chřipce a spojený s vysokými hladinami virémie v periferní krvi (9-12). U většiny infikovaných osob je tato časná fáze následovaná imunitní odpovědí specifickou pro HIV a poklesem plazmatické virémie, obvykle během 4 až 6 týdnů od rozvoje příznaků (13-14). Po sérokonverzi obvykle vstupují infikované osoby do klinicky stabilní asymptomatické fáze, která může trvat roky (15-17).

Asymptomatické období je charakterizováno perzistentní nízkou plazmatickou virémií (18) a postupnou deplecí CD4+ T lymfocytů. Tato deplece vede k závažné imunodeficienci, vícečetným oportunním infekcím, malignitám a úmrtí (19). I když jsou hladiny viru v periferní krvi během asymptomatické fáze infekce relativně nízké, virová replikace a clearance se zdají být dynamické procesy, kdy jsou období vysoké produkce viru a infekce CD4+ buněk vyváženy zvýšenou clearance viru, zánikem infikovaných buněk a doplněním CD4+ buněk, což vede k relativně stabilním hladinám plazmatické virémie a CD4+ buněk (20-22).

Kvantitativní měření HIV v periferní krvi prokázala, že vyšší virémie mohou být korelovány se zvýšeným rizikem klinické progresy onemocnění spojeného s HIV a zjistila, že poklesy plazmatických hladin viru mohou být spojeny se sníženým rizikem klinické progresy (23-25). Hladiny viru v periferní krvi lze kvantifikovat měřením antigenu p24 HIV v séru kvantitativní kultivací HIV z plazmy nebo přímým měřením virové RNA v plazmě pomocí technologií amplifikace nukleových kyselin nebo amplifikace signálu (26-30).

Aktuální detekce infekce HIV-1 je primárně založena na sérologickém testování protilátek a/ nebo antigenu p24 pomocí imunoanalýzy. Centra pro kontrolu nemocí v USA doporučují používat protilátkový test a test RNA k diagnostice akutních infekcí HIV (31). I když se citlivost detekce protilátek proti HIV-1 a antigenu p24 zlepšila, mezi infekcí a dobou možné detekce pomocí sérologických markerů se pořád nachází okno. Toto okno závisí na citlivosti použitého sérologického testu. Jeden odhad (32) naznačuje, že 4. generace testů antigenu p24 / protilátek může detekovat infekci u koncentrace HIV-1 RNA na úrovni 14 000 kopií/ml. Limit detekce testu Aptima HIV-1 Quant Dx je významně nižší než 14 000 kopií/ml, je schopen detekovat přítomnost HIV-1 dříve než imunoanalýzy HIV.

Molekulární techniky, jako je transkripční mediovaná amplifikace (technologie TMA®), se často používají k amplifikaci nukleových kyselin (31). Amplifikace TMA používá záchyt specifického cíle a izotermální amplifikaci k detekci nukleových kyselin u více infekčních patogenů (32).

Test Aptima HIV-1 Quant Dx přes amplifikaci TMA používá více dlouhých primerů, které jsou zaměřeny na několik oblastí genomu HIV-1 s cílem kompenzovat vysokou míru mutací a vícečetné potenciální mutace v cílové oblasti.

Principy postupu

Test Aptima HIV-1 Quant Dx zahrnuje tři hlavní kroky, které probíhají v jediné zkumavce v systému Panther: záchyt cíle, transkripční mediovaná amplifikace (TMA) cíle a detekce produktů amplifikace (amplikonů) pomocí fluorescenčně značených sond (indikátory).

Během záchytu cíle jsou ze vzorků izolovány virové nukleové kyseliny. Vzorek je zpracován pomocí detergentu s cílem rozpustit virový obal, denaturovat proteiny a uvolnit virovou genomovou RNA. Zachytávané oligonukleotidy hybridizují do vysoce konzervativních oblastí genomu HIV-1 v testovém vzorku (pokud jsou přítomny). Hybridizovaný cíl je poté zachycen na magnetické mikročástice, které jsou odděleny od vzorku v magnetickém poli. Kroky promývání odstraní z reakční zkumavky nadbytečné složky.

Amplifikace cíle probíhá metodou TMA, což je transkripční mediovaná amplifikace nukleových kyselin, která používá dva enzymy: reverzní transkriptázu MMLV (virus Moloneyho myší leukemie) a RNA polymerázu T7. Reverzní transkriptáza slouží k vytvoření DNA kopie (obsahující promotorovou sekvenci RNA polymerázy T7) cílové sekvence. RNA polymeráza T7 vytváří vícečetné kopie amplikonu RNA z templátu kopie DNA. Test Aptima HIV-1 Quant Dx používá metodu TMA k amplifikaci dvou oblastí RNA HIV-1 (pol a LTR). Amplifikace těchto specifických oblastí je dosažena za použití specifických primerů, které jsou navrženy k amplifikaci skupin M, N a O HIV-1. Design primeru a duální cíl zajišťují přesnou detekci a kvantifikaci HIV-1.

Detekce se provádí pomocí indikátorů z jednovláknové nukleové kyseliny, které jsou přítomné během amplifikace cíle a v reálném čase specificky hybridizují na amplikon. Každý indikátor obsahuje fluorofor a zhášec. Když není indikátor hybridizován na amplikon, zhášec je v těsné blízkosti fluoroforu a potlačuje fluorescenci. Po navázání indikátoru na amplikon se zhášec posune dále od fluoroforu a po excitaci zdrojem světla začne emitovat signál specifické vlnové délky. Pokud hybridizuje více indikátorů na amplikon, vzniká silnější fluorescenční signál. Čas potřebný k dosažení specifikovaného prahu fluorescenčního signálu je poměrný počáteční koncentraci HIV-1. Každá reakce má svůj vnitřní kalibrátor / vnitřní kontrolu (IC), která kontroluje variabilitu ve zpracování vzorku, amplifikaci a detekci. Koncentrace vzorku je určena softwarem systému Panther pomocí signálů HIV-1 a IC pro každou reakci a jejich porovnáním s kalibračními informacemi.

Varování a bezpečnostní opatření

- A. K diagnostickému použití *in vitro*.
- B. Pouze k odbornému použití.
- C. Před provedením tohoto testu si pečlivě přečtěte celou příbalovou informaci a dokument *Panther®/Panther Fusion® System Operator's Manual (Návod k použití systému Panther®/Panther Fusion®)*. Snížíte tak riziko výskytu neplatných výsledků.

Související s laboratoří

- D. **UPOZORNĚNÍ:** Kontroly tohoto testu obsahují lidskou plazmu. Plazma je negativní na povrchový antigen hepatitidy B (HBsAg), protilátky proti HCV, protilátky proti HIV-1 a HIV-2 a antigen HIV při testování pomocí postupů licencovaných Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv v USA. Kromě toho je plazma nereaktivní s HCV RNA a HIV-1 RNA při testování pomocí licencovaných testů na nukleové kyseliny ve složených vzorcích. Všechny materiály pocházející z lidské krve je nutné považovat za potenciálně infekční a je nutné s nimi manipulovat dle univerzálních bezpečnostních opatření (35–37).
- E. Tento test mohou používat pouze pracovníci náležitě vyškolení v používání testu Aptima HIV-1 Quant Dx a v manipulaci s potenciálně infekčními materiály. Pokud dojde k rozliti, ihned proveďte dezinfekci pomocí vhodných postupů daného pracoviště.
- F. Používejte pouze dodávaný nebo specifikovaný jednorázový laboratorní materiál.
- G. Dodržujte běžná laboratorní bezpečnostní opatření. Nepipetujte ústy. Ve vyhrazených pracovních prostorech nejezte, nepijte ani nekuřte. Při manipulaci se vzorky a reagensiemi soupravy používejte jednorázové rukavice bez talku, ochranné brýle a laboratorní plášť. Po manipulaci se vzorky a reagensiemi soupravy si pečlivě omyjte ruce.
- H. Pracovní povrchy, pipety a další vybavení pravidelně dekontaminujte 2,5% až 3,5% (0,35 mol až 0,5 mol) roztokem chlornanu sodného.
- I. Všechny materiály, které přišly do kontaktu se vzorky a reagensiemi, zlikvidujte podle místních nebo národních předpisů (35–38). Pečlivě očistěte a dezinfikujte všechny pracovní povrchy.
- J. Kontroly obsahují azid sodný jako konzervační látku. K přenosu reagensie nepoužívejte kovové trubky. Pokud roztoky obsahující azid sodný likvidujete do kanalizačního systému, je nutné je naředit a spláchnout velkým množstvím tekoucí vody. Tato bezpečnostní opatření by měla zabránit nahromadění látky v kovových trubkách, kde by pak hrozil výbuch.
- K. Zásady správné praxe v molekulárních laboratořích zahrnují sledování prostředí. Při sledování laboratorního prostředí doporučujeme následující postup.
 - 1. Zajistěte si vatovou tyčinku a pár alikvotačních zkumavek Aptima (SAT).
 - 2. Každou zkumavku SAT příslušným způsobem označte.
 - 3. Každou zkumavku SAT naplňte 1 ml roztoku k ředění vzorků Aptima.
 - 4. Pokud chcete provést odběr povrchových vzorků, lehce navlhčete tyčinku deionizovanou vodou bez obsahu nukleázy.

5. Otřete požadovaný povrch vertikálním pohybem seshora dolů. Otočte tyčinku přibližně o jednu polovinu otočky a zároveň provádějte stěr z místa.
6. Okamžitě uložte vzorek stěru do zkumavky a jemným otáčením tyčinky v roztoku extrahujte případné materiály získané stěrem. Ihned otřete jednu stranu přepravní zkumavky s cílem vyextrahovat co nejvíce tekutiny. Zlikvidujte tyčinku a zavřete zkumavku.
7. Zopakujte kroky u zbývajících vzorků stěru.
8. Provedte molekulární test stěru.

Související se vzorky

- L. Vzorky mohou být infekční. Při provádění tohoto testu dodržujte univerzální bezpečnostní opatření (35-37). Zajistěte správné postupy při manipulaci a likvidaci v souladu s místními nařízeními (38). Tento test mohou používat pouze pracovníci náležitě vyškolení v používání testu Aptima HIV-1 Quant Dx a v manipulaci s infekčními materiály.
- M. *Hodnocena byla pouze plazma s antikoagulanty EDTA a ACD.*
- N. Pokud chcete zajistit integritu vzorku, dodržujte při přepravě vzorků vhodné přepravní podmínky. Stabilita vzorků za jiných než doporučených přepravních podmínek nebyla hodnocena.
- O. Při manipulaci se vzorky zabraňte křížové kontaminaci. Dávejte zvláštní pozor, aby nedošlo ke kontaminaci rozstřikováním aerosolů při uvolňování nebo otevírání vzorků. Vzorky mohou obsahovat extrémně vysoké koncentrace organismů. Zajistěte, aby se jednotlivé nádoby na vzorky vzájemně nedotýkaly, a použité materiály při likvidaci nepřenášejte nad otevřenými nádobami. Pokud se vzorku dotknete, vyměňte si rukavice.

Související s testem

- P. Kvantitativní výsledky testu Aptima HIV-1 Quant Dx byly hodnoceny pro EDTA a ACD plazmu. **Sérum se nesmí používat pro kvantitativní výsledky.** Kvalitativní výsledky byly hodnoceny pro plazmu i sérum.
- Q. Soupravu reagensií, kalibrátor ani kontroly nepoužívejte po datu expirace.
- R. Nezaměňujte, nemíchejte ani nekombinujte reagentie testu ze souprav s různými čísly hlavní šarže. Kapaliny testu mohou být z různých šarží. Kontroly a kalibrátor mohou pocházet z různých šarží.
- S. Zabraňte mikrobiální a nukleázové kontaminaci reagensií.
- T. Všechny reagentie testu uzavřete a skladujte při uvedené teplotě. Při nesprávném skladování reagensií testu může být výkonnost testu negativně ovlivněna. Další informace naleznete v dokumentu *Požadavky na skladování reagensií a zacházení s nimi a Postup testu na systému Panther.*
- U. Pokud nebude výslovně uvedeno jinak, nekombinujte žádné reagentie ani kapaliny testu. Nedolévejte reagentie či kapaliny. Systém Panther ověřuje hladiny reagensií.
- V. Některé reagentie v této soupravě jsou označeny symboly s informacemi o nebezpečí.

Poznámka: Informace o nebezpečí jsou v souladu s klasifikacemi bezpečnostních listů (Safety Data Sheet, SDS) EU. Informace o nebezpečích specifické pro váš region najdete v bezpečnostním listu specifickém pro daný region v knihovně bezpečnostních listů (Safety Data Sheet Library) na adrese www.hologicsds.com. Další informace o symbolech najdete v legendě symbolů na adrese www.hologic.com/package-inserts.

Informace o nebezpečí pro EU	
-	Amplification Reagent Chlorid hořečnatý 60–65% - H412 - Škodlivý pro vodní organismy, s dlouhodobými účinky. P273 - Zabraňte uvolnění do životního prostředí. P501 - Odstraňte obsah/obal ve schváleném zařízení na likvidaci odpadu.
	Enzyme Reagent HEPES 1–5% Triton X-100 1–5% - H412 - Škodlivý pro vodní organismy, s dlouhodobými účinky. P273 - Zabraňte uvolnění do životního prostředí. P501 - Odstraňte obsah/obal ve schváleném zařízení na likvidaci odpadu.
-	Enzyme Reconstitution Solution Glycerol 20–25% Triton X-100 5–10% HEPES 1–5% - H412 - Škodlivý pro vodní organismy, s dlouhodobými účinky. P273 - Zabraňte uvolnění do životního prostředí. P501 - Odstraňte obsah/obal ve schváleném zařízení na likvidaci odpadu.
	Promoter Reagent Chlorid hořečnatý 60–65% - H412 - Škodlivý pro vodní organismy, s dlouhodobými účinky. P273 - Zabraňte uvolnění do životního prostředí. P501 - Odstraňte obsah/obal ve schváleném zařízení na likvidaci odpadu.
-	Target Capture Reagent HEPES 15–20% Laurylsulfát, lithná sůl 5–10% Hydroxid lithia, monohydrát, 1–5% Kyselina jantarová 1–5% - H412 - Škodlivý pro vodní organismy, s dlouhodobými účinky. P273 - Zabraňte uvolnění do životního prostředí. P501 - Odstraňte obsah/obal ve schváleném zařízení na likvidaci odpadu.
	 HIV VL Kit Controls Lidské sérum / lidská plazma 95–100% Azid sodný < 1% - H412 - Škodlivý pro vodní organismy, s dlouhodobými účinky. P273 - Zabraňte uvolnění do životního prostředí. P501 - Odstraňte obsah/obal ve schváleném zařízení na likvidaci odpadu.

HIV VL Kit Calibrators*Laurylsulfát, lithná sůl 0–10%**Kyselina jantarová 0–10%*

–

–

H412 - Škodlivý pro vodní organismy, s dlouhodobými účinky.

P273 - Zabraňte uvolnění do životního prostředí.

P501 - Odstraňte obsah/obal ve schváleném zařízení na likvidaci odpadu.

Požadavky na skladování reagensů a zacházení s nimi

- A. V následující tabulce jsou uvedeny skladovací podmínky a stabilita reagensů, kontrol a kalibrátoru.

Reagencie	Skladování v neotevřeném stavu	Otevřená souprava (po rekonstituci)	
		Skladování	Stabilita
Amplifikační reagencie qHIV-1	2 °C až 8 °C		
Rekonstituční roztok pro amplifikaci qHIV-1	2 °C až 8 °C	2 °C až 8 °C	30 dní ^a
Enzymová reagencie qHIV-1	2 °C až 8 °C		
Rekonstituční roztok pro enzymy qHIV-1	2 °C až 8 °C	2 °C až 8 °C	30 dní ^a
Promotorová reagencie qHIV-1	2 °C až 8 °C		
Promotorový rekonstituční roztok qHIV-1	2 °C až 8 °C	2 °C až 8 °C	30 dní ^a
Reagencie pro záchyt cíle qHIV-1	2 °C až 8 °C	2 °C až 8 °C	30 dní ^a
KONTROLA qHIV-1 NC – (negativní kontrola)	–15 °C až –35 °C	15 °C až 30 °C	Jednorázová lahvička Použijte do 20 hodin
KONTROLA qHIV-1 LPC + (slabě pozitivní kontrola)	–15 °C až –35 °C	15 °C až 30 °C	Jednorázová lahvička Použijte do 20 hodin
KONTROLA qHIV-1 HPC + (silně pozitivní kontrola)	–15 °C až –35 °C	15 °C až 30 °C	Jednorázová lahvička Použijte do 20 hodin
qHIV-1 PCAL (pozitivní kalibrátor)	–15 °C až –35 °C	15 °C až 30 °C	Jednorázová lahvička Použijte do 20 hodin

^a Po vyjmutí reagensů ze systému Panther je nutné je ihned vrátit zpět do prostředí s vhodnou skladovací teplotou.

- B. Zlikvidujte veškeré nepoužité rekonstituované reagencie a reagensy záchytu cíle (TCR) po 30 dnech nebo po uplynutí data expirace hlavní šarže podle toho, která situace nastane dříve.
- C. Reagencie uložené v systému Panther mají stabilitu v přístroji po dobu 72 hodin. Reagencie lze vložit do systému Panther až 5krát. Systém Panther zapíše každé vložení reagensů.
- D. Po rozmrazení kalibrátoru musí být roztok čirý, tzn. nesmí být kalný a nesmí obsahovat precipitáty.
- ⚠ E. Reagencie promotoru a rekonstituovaná reagencie promotoru jsou fotosenzitivní. Při skladování a přípravě k použití chraňte tyto reagencie před světlem.

Odběr a skladování vzorků

Poznámka: Všechny vzorky je nutné považovat za potenciálně infekční. Dodržujte univerzální bezpečnostní opatření.

Poznámka: Dávejte pozor, aby při manipulaci se vzorky nedošlo ke křížové kontaminaci. Například při likvidaci nepřenášejte použitý materiál nad otevřenými zkumavkami.

Poznámka: K uskladnění se doporučují pouze plastové sekundární zkumavky.

Je možné použít vzorky plné krve odebrané do následujících skleněných nebo plastových zkumavek:

Pro kvantitativní měření:

- Zkumavky obsahující EDTA nebo antikoagulanty založené na kyselé citrátové dextróze (ACD)
- Zkumavky pro přípravu plazmy (PPT)

Pro kvalitativní stanovení:

- Zkumavky obsahující EDTA nebo antikoagulanty ACD
- Zkumavky PPT
- Sérové zkumavky
- Zkumavky sérového separátoru (SST)

Před dalším zpracováním séra počkejte, dokud se nevytvoří sraženina.

A. Sběr vzorků

Plnou krev lze skladovat při teplotě 2 °C až 30 °C a je nutné ji nakonfigurovat do 24 hodin od odběru vzorků. Oddělte plazmu nebo sérum od erytrocytárního terčíku dle pokynů výrobce použité zkumavky. Plazmu nebo sérum je možné testovat na systému Panther v primární zkumavce, nebo je možné je přenést do sekundární zkumavky, jako je alikvotační zkumavka Aptima. Minimální objem plazmy nebo séra pro primární odběrové zkumavky je 1 200 µl a pro sekundární zkumavky 700 µl, abyste získali reakční objem 500 µl. V následující tabulce jsou uvedeny požadavky na mrtvý objem pro jednotlivé typy primární a sekundární zkumavky.

Zkumavka (velikost a typ)	Mrtvý objem v systému Panther
Alikvotační zkumavka Aptima (SAT)	0,2 ml
12 × 75 mm	0,5 ml
13 × 100 mm	0,5 ml
13 × 100 mm s gelem	0,3 ml
16 × 100 mm s gelem	0,7 ml

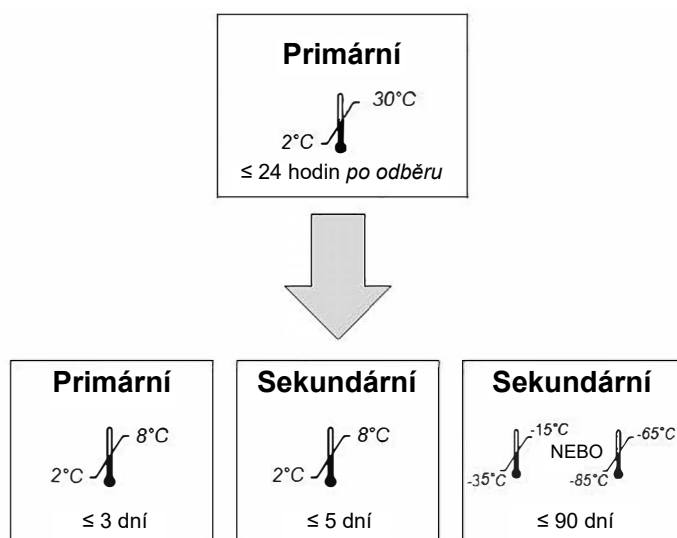
Pokud neprovedete testování ihned, plazmu i sérum je možné uskladnit v souladu s níže uvedenými specifikacemi. Při přenosu do sekundární zkumavky lze plazmu zmrazit při teplotě -20 °C nebo -70 °C a sérum při teplotě -20 °C. Neprovádějte více než tři cykly rozmrazování-tání, abyste neovlivnili výsledek. Nezmrazujte vzorky v EDTA, ACD ani primárních zkumavkách k odběru séra.

B. Podmínky uskladnění vzorků

1. Vzorky plazmy EDTA a ACD

Primární zkumavky obsahující centrifugovanou plazmu je možné uskladnit až 24 hodin po odběru vzorků při teplotě 2 °C až 30 °C (Obrázek 1, horní pole). Po 24 hodinách je možné plazmu uskladnit na delší dobu za jedné z následujících podmínek (Obrázek 1, spodní pole):

- V primární odběrové zkumavce při teplotě 2 °C až 8 °C po dobu až 3 dnů.
- V sekundární zkumavce při teplotě 2 °C až 8 °C po dobu až 5 dnů.
- V sekundární zkumavce při teplotě -20 °C až -70 °C po dobu až 90 dnů.

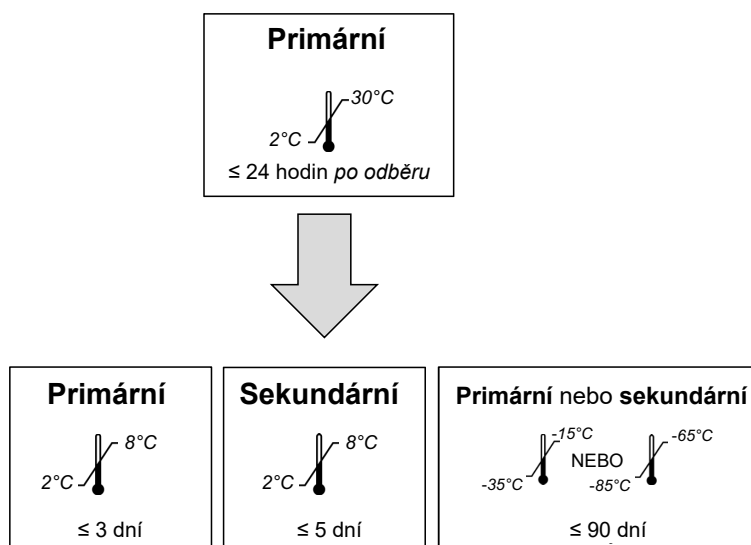


Obrázek 1. Podmínky uskladnění pro zkumavky EDTA/ACD

2. Vzorky PPT

Zkumavky PPT obsahující centrifugovanou plazmu je možné uskladnit až 24 hodin po odběru vzorků při teplotě 2 °C až 30 °C (Obrázek 2, horní pole). Po 24 hodinách je možné plazmu uskladnit na delší dobu za jedné z následujících podmínek (Obrázek 2, spodní pole):

- Ve zkumavce PPT při teplotě 2 °C až 8 °C po dobu až 3 dnů.
- V sekundární zkumavce při teplotě 2 °C až 8 °C po dobu až 5 dnů.
- Ve zkumavce PPT nebo sekundární zkumavce při teplotě –20 °C až –70 °C po dobu až 90 dnů.

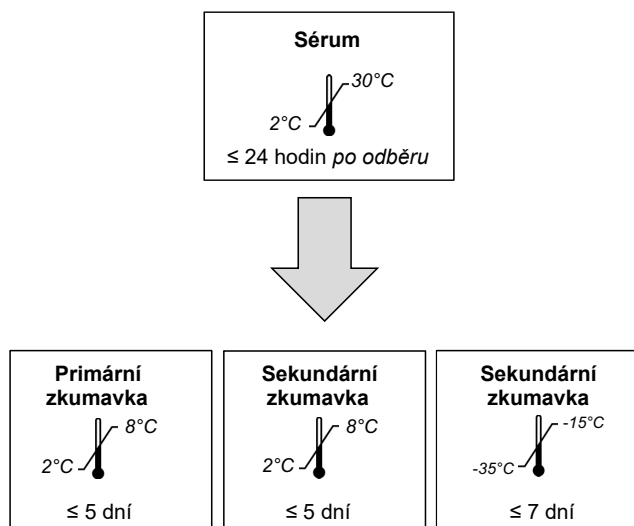


Obrázek 2. Podmínky uskladnění pro zkumavky PPT

3. Vzorky v sérové zkumavce

Sérové zkumavky obsahující centrifugované sérum je možné uskladnit až 24 hodin po odběru vzorků při teplotě 2 °C až 30 °C (Obrázek 3, horní pole). Po 24 hodinách je možné sérum uskladnit na delší dobu za jedné z následujících podmínek (Obrázek 3, spodní pole):

- V sérové zkumavce při teplotě 2 °C až 8 °C po dobu až 5 dnů.
- V sekundární zkumavce při teplotě 2 °C až 8 °C po dobu až 5 dnů.
- V sekundární zkumavce při teplotě –20 °C po dobu až 7 dnů.

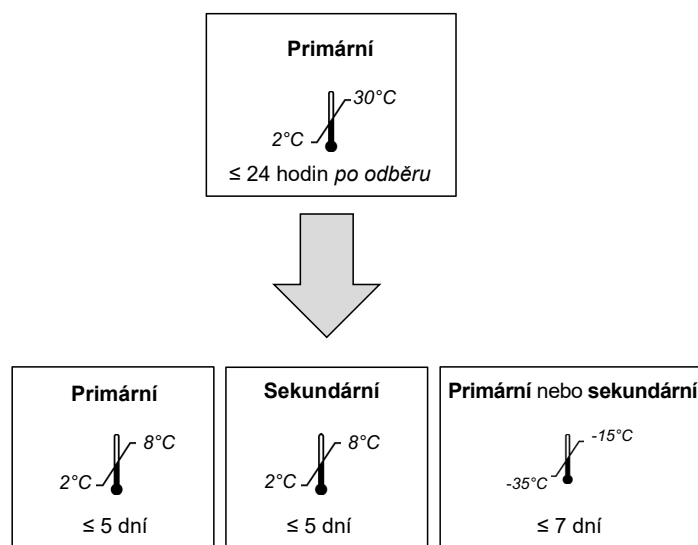


Obrázek 3. Podmínky uskladnění pro sérové zkumavky

4. Vzorky SST

Zkumavky SST obsahující centrifugované sérum je možné uskladnit až 24 hodin po odběru vzorků při teplotě 2 °C až 30 °C (Obrázek 4, horní pole). Po 24 hodinách je možné sérum uskladnit na delší dobu za jedné z následujících podmínek (Obrázek 4, spodní pole):

- Ve zkumavce SST při teplotě 2 °C až 8 °C po dobu až 5 dnů.
- V sekundární zkumavce při teplotě 2 °C až 8 °C po dobu až 5 dnů.
- V sekundární zkumavce nebo zkumavce SST při teplotě –20 °C po dobu až 7 dnů.



Obrázek 4. Podmínky uskladnění pro zkumavky SST

C. Ředění vzorků plazmy

Vzorky plazmy je možné naředit ve zkumavce SAT nebo sekundární zkumavce k testování v systému Panther. Další informace naleznete níže v části *Postup testu na systému Panther*, krok E.5.

Poznámka: Pokud je vzorek naředěn, je nutné jej otestovat ihned po ředění. Nezmrazujte naředěný vzorek.

⚠ Ředění vzorků plazmy se smí používat pouze pro kvantitativní výsledky. Neředte vzorky plazmy pro diagnostické výsledky.

Vzorky v systému Panther

Vzorky je možné ponechat v systému Panther neuzavřené celkem až 8 hodin. Vzorky je možné vyjmout ze systému Panther a otestovat, dokud doba v přístroji nepřekročí 8 hodin před pipetováním vzorku systémem Panther.

Přeprava vzorků

Dodržujte podmínky uchovávání vzorků uvedené v části *Odběr a skladování vzorků*.

Poznámka: Vzorky je nutné přepravovat v souladu s platnými národními, mezinárodními a oblastními předpisy pro přepravu.

Systém Panther®

Níže jsou uvedeny reagentie testu Aptima HIV-1 Quant Dx pro systém Panther. Vedle názvu reagentie jsou rovněž uvedeny symboly k identifikaci reagentií.

Reagentie a materiály, které jsou součástí dodávky

Souprava testu Aptima HIV-1 Quant Dx, 100 testů, kat. č. PRD-03000 (1 testový box, 1 souprava kalibrátoru a 1 souprava kontrol)

Další kalibrátory a kontroly si můžete objednat samostatně. Příslušná katalogová čísla naleznete níže.

Box testů Aptima HIV-1 Quant Dx

(po převzetí uchovávejte při teplotě 2 °C až 8 °C)

Symbol	Součást	Množství
A	Amplifikační reagentie qHIV-1 <i>Neinfekční nukleové kyseliny vysušené v pufovaném roztoku.</i>	1 lahvička
E	Enzymová reagentie qHIV-1 <i>Vysušená reverzní transkriptáza a RNA polymeráza v roztoku pufovaném HEPES.</i>	1 lahvička
PRO	Promotorová reagentie qHIV-1 <i>Neinfekční nukleové kyseliny vysušené v pufovaném roztoku.</i>	1 lahvička
AR	Rekonstituční roztok pro amplifikaci qHIV-1 <i>Vodný roztok obsahující glycerol a konzervační látky.</i>	1 × 7,2 ml
ER	Rekonstituční roztok pro enzymy qHIV-1 <i>Roztok pufovaný HEPES obsahující surfaktant a glycerol.</i>	1 × 5,8 ml
PROR	Promotorový rekonstituční roztok qHIV-1 <i>Vodný roztok obsahující glycerol a konzervační látky.</i>	1 × 4,5 ml
TCR	Reagentie pro záchyt cíle qHIV-1 <i>Nukleové kyseliny v pufovaném solném roztoku obsahujícím pevnou fázi, neinfekční nukleové kyseliny a vnitřní kalibrátor.</i>	1 × 72,0 ml
	Rekonstituční objímky	3
	List s čárovým kódem hlavní šarže	1 list

Souprava kalibrátoru Aptima HIV-1 Quant Dx (kat. č. PRD-03001)
(po převzetí uchovávejte při teplotě –15 °C až –35 °C)

Symbol	Součást	Množství
PCAL	Pozitivní kalibrátor qHIV-1 <i>Transkript v pufovaném roztoku.</i>	5 × 2,5 ml
	Štítek s čárovým kódem kalibrátoru	—

Souprava kontrol Aptima HIV-1 Quant Dx (kat. č. PRD-03002)
(po převzetí uchovávejte při teplotě –15 °C až –35 °C)

Symbol	Součást	Množství
NC	Negativní kontrola qHIV-1 <i>HIV-1-negativní defibrinovaná lidská plazma obsahující gentamicin a 0,2% azid sodný jako konzervační látky.</i>	5 × 1,5 ml
LPC	Slabě pozitivní kontrola qHIV-1 <i>Neinfekční HIV-1 armored RNA v defibrinované lidské plazmě obsahující gentamicin a 0,2% azid sodný jako konzervační látky.</i>	5 × 1,5 ml
HPC	Silně pozitivní kontrola qHIV-1 <i>Neinfekční HIV-1 armored RNA v defibrinované lidské plazmě obsahující gentamicin a 0,2% azid sodný jako konzervační látky.</i>	5 × 1,5 ml
	Štítek s čárovým kódem kontroly	—

Požadované materiály, které jsou dodávány samostatně

Poznámka: Pokud není specifikováno jinak, mají materiály dostupné od společnosti Hologic uvedené katalogové čísla.

Materiál	Kat. č.
Systém Panther®	303095
Systém Panther Fusion®	PRD-04172
Systém Panther®, nepřetržité odvádění tekutin a odpadů (Panther Plus)	PRD-06067
Souprava kontrol Aptima® HIV-1 Quant Dx Controls Kit	PRD-03002
Souprava kalibrátoru Aptima® HIV-1 Quant Dx Calibrator Kit	PRD-03001
Testovací souprava Panther pro testování v reálném čase (pouze pro testy v reálném čase)	PRD-03455 (5 000 testů)
<i>Souprava kapalin pro test Aptima® (rovněž známá jako univerzální souprava kapalin) obsahuje promývací roztok Aptima®, pufr Aptima® pro deaktivaci kapaliny a olejovou reagensii Aptima®</i>	303014 (1 000 testů)
<i>Vícezkumavkové jednotky (MTU)</i>	104772-02
<i>Souprava odpadních vaků Panther</i>	902731
<i>Kryt odpadního koše Panther</i>	504405
Nebo testovací souprava systému Panther (pro souběžné testování testů TMA bez reálného času s testy TMA v reálném čase) obsahuje jednotky MTU, odpadní vaky, kryty odpadních košů, automatickou detekci a testovací kapaliny	303096 (5 000 testů)
Špičky, 1 000 µl, filtrované, snímající tekutiny, vodivé a jednorázové <i>Ne všechny produkty jsou dostupné ve všech regionech. Informace o konkrétním regionu získáte u svého zástupce.</i>	901121 (10612513 Tecan) 903031 (10612513 Tecan) MME-04134 (30180117 Tecan) MME-04128
Bělidlo, 5% až 8,25% (0,7 mol až 1,16 mol) roztok chlornanu sodného	—
Jednorázové rukavice bez talku	—
Náhradní nepropichovací uzávěry	103036A
Náhradní uzávěry pro reagensie <i>Rekonstituční lahvičky pro amplifikační, enzymovou a promotorovou reagensii</i> <i>TCR lahvička</i>	CL0041 (100 uzávěrů) CL0040 (100 uzávěrů)
Kryty laboratorních stolů s plastovou vrstvou	—
Utěrky neuvolňující vlákna	—
Pipetor	—
Špičky	—
Primární odběrová zkumavka (ACD, EDTA, PPT, SST, sérum) – možnosti:	
13 mm × 100 mm	—
13 mm × 75 mm	—
16 mm × 100 mm	—
Centrifuga	—
Vortex	—

Volitelné materiály

Materiál	Kat. č.
Sekundární zkušavka – možnosti:	
12 mm × 75 mm	—
13 mm × 100 mm	—
16 mm × 100 mm	—
Alikvotační zkušavky Aptima® (SAT) (balení po 100 ks)	FAB-18184
Uzávěr přepravní zkušavky (balení po 100 ks)	504415
uzávěr pro zkušavku SAT	
Roztok k ředění vzorků Aptima®	PRD-03003
Souprava k ředění vzorků Aptima®	PRD-03478
obsahuje roztok k ředění vzorků, 100 zkušavek SAT a 100 uzávěrů	
Transferové pipety	—
Komerčně dostupné panely, například:	—
HIV-1 z Kontroly kvality pro molekulární diagnostiku (QCMD) nebo panelu sledování virové nálože HIV Americké patologické společnosti (CAP) nebo panelů SeraCare ACCURUN HIV	
Vatové tyčinky	
Kryty laboratorních stolů s plastovou vrstvou	—
Třepačka pro zkušavky	—

Postup testu na systému Panther

Poznámka: Další informace o postupu naleznete v návodu k použití systému Panther/Panther Fusion.

A. Příprava pracovní oblasti

- Očistěte pracovní povrchy na místě, kde budete připravovat reagenty. Otřete pracovní povrchy 2,5% až 3,5% (0,35 mol až 0,5 mol) roztokem chlornanu sodného. Roztok chlornanu sodného nechte působit na kontaktní povrchy alespoň 1 minutu a poté je opláchněte deionizovanou vodou. Roztok chlornanu sodného nenechte zaschnout. Překryjte povrch stolu, na kterém budou připravovány reagenty a vzorky, čistým laboratorním absorpčním ubrusem s gumovou vrstvou.
- Očistěte samostatný pracovní povrch, na kterém budete připravovat vzorky. Dodržujte výše uvedený postup (krok A.1).
- Vyčistěte pipety. Dodržujte výše uvedený postup (krok A.1).

B. Příprava kalibrátoru a kontrol

Než přistoupíte k následujícímu zpracování, zajistěte, aby se teplota kalibrátoru a kontroly ustálila na 15 °C až 30 °C:

- Vytáhněte kalibrátor a kontroly ze skladovacího prostoru (–15 °C až –35 °C) a uložte je při teplotě 15 °C až 30 °C. Po celou dobu rozmrazování všechny zkušavky jemně převracujte, aby se dobře promíchaly. Ujistěte se, že je obsah zkušavek před použitím zcela rozmrazen.

Možnost. Zkušavky kalibrátoru a kontrol je možné vložit do třepačky a pečlivě promíchat. Ujistěte se, že je obsah zkušavek před použitím zcela rozmrazen.

Poznámka: Při převrácení kalibrátoru a kontrol dávejte pozor, aby nevznikla přebytečná pěna. Pěna ovlivňuje detekci hladin v systému Panther.

2. Po rozmrazení obsahu zkumavky vysušte vnější povrch zkumavky čistým, suchým jednorázovým hadříkem.
3. V rámci prevence kontaminace zkumavky zatím neotevírejte.

C. Rekonstituce/příprava reagensie z nové soupravy

Poznámka: Rekonstituci reagensií je nutné provést před zahájením veškerých prací se systémem Panther.

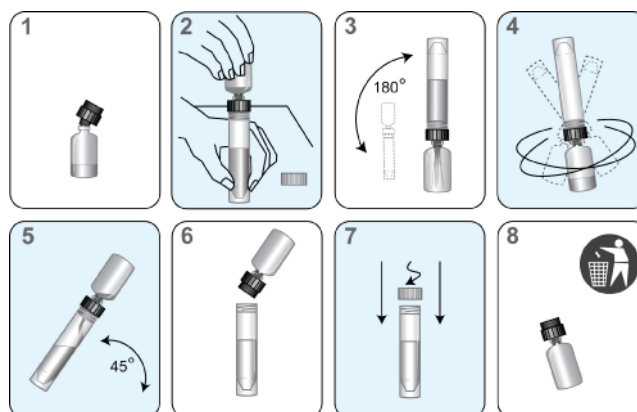
1. Reagensii pro záchyt cíle (TCR) připravíte následujícím způsobem:
 - a. Vytáhněte reagensii TCR ze skladovacího prostoru (2 °C až 8 °C). Zkontrolujte číslo šarže na lahvičce reagensie TCR, abyste se ujistili, že odpovídá číslu šarže na listu s čárovým kódem hlavní šarže.
 - b. Ihned poté 10krát protřepejte lahvičku reagensie TCR. Nechte lahvičku reagensie TCR volně zahřát při teplotě 15 °C až 30 °C po dobu 45 minut. Během této doby minimálně co 10 minut jemně otočte a převraťte lahvičku reagensie TCR.

Možnost. Lahvičku reagensie TCR je možné připravit na třepačce pro zkumavky dle následujících pokynů: Vytáhněte reagensii TCR ze skladovacího prostoru (2 °C až 8 °C) a ihned 10krát důkladně protřepejte. Uložte lahvičku reagensie TCR na třepačku a nechte reagensii TCR zahřát při teplotě 15 °C až 30 °C minimálně po dobu 45 minut.

- c. Před použitím se ujistěte, že se veškerý precipitát nachází v roztoku a že jsou magnetické částičky ponořeny.
2. Pokud chcete rekonstituovat amplifikační, enzymatické a promotorové reagensie, postupujte následujícím způsobem:
 - a. Vytáhněte lyofilizované reagensie a odpovídající rekonstituční roztoky ze skladovacího prostoru (2 °C až 8 °C). Každý rekonstituční roztok spárujte s odpovídající lyofilizovanou reagensií.
 - b. Ujistěte se, že rekonstituční roztoky a reagensie mají shodné barvy štítků. Zkontrolujte čísla šarže na listu s čárovým kódem hlavní šarže, aby bylo zajištěno správné spárování reagensií.
 - i. Odstraňte kovový uzávěr a gumovou zátku lahvičky s lyofilizovanou reagensií a otevřete ji.
 - ii. Do lahvičky pevně zasuněte vroubkovaný konec rekonstituční objímky (černý) (Obrázek 5, krok 1).
 - iii. Otevřete odpovídající lahvičku s rekonstitučním roztokem a uzávěr odložte na čistý a zakrytý pracovní povrch.
 - iv. Lahvičku s rekonstitučním roztokem uložte na stabilní povrch (tzn. laboratorní stůl). Poté převraťte lahvičku s lyofilizovanou reagensií přes lahvičku s rekonstitučním roztokem a pevně připojte objímku k lahvičce s rekonstitučním roztokem (Obrázek 5, krok 2).
 - v. Pomalu převraťte propojené lahvičky (skleněná lahvička připojená k lahvičce s roztokem), aby roztok stekl do skleněné lahvičky (Obrázek 5, krok 3).
 - vi. Zvedněte připojené lahvičky a minimálně 10 sekund je míchejte (Obrázek 5, krok 4).
 - vii. Počkejte minimálně 30 minut, než se lyofilizovaná reagensie dostane do roztoku.
 - viii. Po přechodu lyofilizované reagensie do roztoku minimálně 10 sekund míchejte sestavené lahvičky a poté lehce protřepejte roztok ve skleněné lahvičce, aby se dobře promíchal.

- c. Pomalu znovu nakloňte připojené lahvičky, aby všechny roztok stekl zpět do lahvičky s rekonstitučním roztokem (Obrázek 5, krok 5).
- d. Opatrně odstraňte rekonstituční objímku a skleněnou lahvičku (Obrázek 5, krok 6).
- e. Znovu uzavřete lahvičku uzávěrem. Na štítek zapište iniciály obsluhy a datum rekonstituce (Obrázek 5, krok 7).
- f. Rekonstituční objímku a skleněnou lahvičku zlikvidujte (Obrázek 5, krok 8).

Varování: Při rekonstituci reagensů zabraňte tvorbě přebytečné pěny. Pěna ovlivňuje detekci hladin v systému Panther.



Obrázek 5. Postup rekonstituce reagensů

D. Příprava u již dříve připravovaných reagensů

1. Vytáhněte dříve připravené reagensie ze skladovacího prostoru (2 °C až 8 °C).
2. Před zahájením testu je nutné nechat dříve připravené amplifikační, enzymové, promotorové a TCR reagensie temperovat na teplotu 15 °C až 30 °C.
3. U dříve připravené reagensie TCR před vložením do systému proveďte krok C.1 výše.
4. Protřepejte a převraťte amplifikační, enzymové a promotorové reagensie, aby se před vložením do systému dobře promíchaly. Při převracení reagensů zabraňte tvorbě přebytečné pěny.
5. Lahvičky s reagensiemi nedoplňujte. Systém Panther rozpozná lahvičky, které byly doplněny, a zamítne je.

E. Manipulace se vzorkem

1. Ujistěte se, že byly zpracované vzorky v primárních zkumavkách nebo neředěné vzorky v sekundárních zkumavkách správně skladovány dle části „Odběr a skladování vzorků“ na straně 8.
2. Ujistěte se, že jsou zmrazené vzorky zcela rozmrazené. Pečlivě promíchejte rozmrazené vzorky 3 až 5 sekund ve vortexu.
3. Než přikročíte ke zpracování, nechte vzorky zahřát na teplotu 15 °C až 30 °C. Další informace o stavu v přístroji naleznete v části *Vzorky v systému Panther*.
4. Ujistěte se, že každá primární odběrová zkumavka obsahuje až 1 200 µl vzorku nebo každá zkumavka SAT obsahuje minimálně 700 µl vzorku. V tabulce v části *Sběr vzorků* na straně 8 jsou uvedeny požadavky na mrtvý objem pro jednotlivé typy primární a sekundární zkumavky. Pokud je nutné vzorek naředit, prostudujte si další informace v kroku E.5 níže.

5. Vzorek plazmy naředte v poměru 1 : 3 ve zkumavce SAT nebo 1 : 100 v sekundární zkumavce.

Vzorky plazmy je možné naředit v sekundární zkumavce pro testování v systému Panther.

- ⚠ Ředění vzorků plazmy se smí používat pouze pro kvantitativní výsledky. Neředte vzorky plazmy pro diagnostické výsledky.

Poznámka: Pokud je vzorek naředěn, je nutné jej otestovat ihned po ředění.

- a. Ředění vzorků s nízkým objemem

Objem vzorků plazmy lze zvýšit na minimální požadovaný objem (700 µl) pomocí roztoku k ředění vzorků Aptima. Vzorky s minimálně 240 µl plazmy je možné naředit dvěma díly roztoku k ředění vzorků (1 : 3) následujícím způsobem:

- i. Do zkumavky SAT vložte 240 µl vzorku.
- ii. Přidejte 480 µl roztoku k ředění vzorků Aptima.
- iii. Uzavřete zkumavku.
- iv. Jemně ji 5krát převraťte a promíchejte.

Vzorky ředěné v poměru 1 : 3 je možné otestovat pomocí možnosti 1 : 3 v systému Panther (další informace naleznete v dokumentu *Návod k použití systému Panther/Panther Fusion*). Software automaticky nahlásí čistý výsledek použitím faktoru ředění. Tyto vzorky budou označeny jako naředěné vzorky.

- b. Ředění vzorků s vysokým titrem

Pokud výsledky překročí horní limit kvantifikace, je možné vzorky naředit 99 díly roztoku k ředění vzorků Aptima (1 : 100) následujícím postupem:

- i. Do zkumavky SAT nebo sekundární zkumavky vložte 30 µl vzorku.
- ii. Přidejte 2 970 µl roztoku k ředění vzorků Aptima.
- iii. Uzavřete zkumavku.
- iv. Jemně ji 5krát převraťte a promíchejte.

Vzorky ředěné v poměru 1 : 100 je možné otestovat pomocí možnosti 1 : 100 v systému Panther (další informace naleznete v dokumentu *Návod k použití systému Panther/Panther Fusion*). Software automaticky nahlásí čistý výsledek použitím faktoru ředění. Tyto vzorky budou označeny jako naředěné vzorky.

Poznámka: U ředěných vzorků s čistými koncentracemi vyššími než ULoQ budou výsledky hlášeny ve vědeckém formátu.

6. Před vložením vzorků do stojanu na vzorky proveďte centrifugaci každého vzorku s přetížením 1 000 až 3 000 g po dobu 10 minut. Neodstraňujte uzávěry. Bubliny ve zkumavce mohou narušit snímání hladiny systémem Panther.

Informace o vkládání stojanu a odstraňování uzávěrů naleznete v části *Příprava systému*, krok F.2 níže.

F. Příprava systému

1. Nastavte systém podle pokynů v dokumentu *Návod k použití systému Panther/ Panther Fusion a Poznámky k postupu*. Použijte stojany na reagenty vhodné velikosti a TCR adaptéry.
2. Vložte vzorky do stojanu na vzorky. Pro každou zkumavku na vzorky proveďte následující kroky (vzorek a v případě potřeby kalibrátor a kontroly):
 - a. Uvolněte uzávěr jedné zkumavky na vzorky, neodstraňujte jej však zcela.
Poznámka: *Dávejte zvláštní pozor, aby nedošlo ke kontaminaci rozstříkáním aerosolů. Jemně uvolněte uzávěry na vzorcích.*
 - b. Vložte zkumavku na vzorky do stojanu na vzorky.
 - c. Zopakujte kroky 2.a a 2.b pro všechny zbývající vzorky.
 - d. Po vložení vzorků do stojanu na vzorky vytáhněte a zlikvidujte uzávěry všech zkumavek na vzorky v jednom stojanu na vzorky. Nepřenášejte uzávěr nad jinými stojany na vzorky ani zkumavkami na vzorky, aby nedošlo ke kontaminaci.
 - e. V případě potřeby použijte novou, jednorázovou přenosovou pipetu k odstranění případných bublin nebo pěny.
 - f. Po odstranění posledního uzávěru vložte stojan na vzorky do prostoru na vzorky.
Poznámka: *Pokud zpracováváte současně jiné testy a typy vzorků, zajistěte držák vzorku před vložením stojanu na vzorky do prostoru na vzorky.*
 - g. Zopakujte kroky 2.a až 2.f pro další stojan na vzorky.

Poznámky k postupu

A. Kalibrátory a kontroly

1. Pozitivní kalibrátor qHIV-1, slabá pozitivní kontrola qHIV-1, silná pozitivní kontrola qHIV-1 a negativní kontrolní zkumavky qHIV-1 je možné vložit do jakékoli pozice ve stojanu na vzorky a libovolné dráhy prostoru na vzorky v systému Panther. Pipetování vzorků bude zahájeno, jakmile bude splněna jedna z následujících dvou podmínek:
 - a. Kalibrátor a kontroly jsou aktuálně zpracovávány v systému.
 - b. V systému jsou registrovány platné výsledky kalibrátoru a kontrol.
2. Jakmile proběhne pipetování zkumavek kalibrátoru a kontroly a jejich zpracování pro soupravu reagentů testu Aptima HIV-1 Quant Dx, vzorky je možné otestovat přiřazenou, rekonstituovanou soupravou v průběhu 24 hodin, **pokud nenastane následující situace:**
 - a. Výsledky kalibrátoru nebo kontroly jsou neplatné.
 - b. Přiřazená souprava reagentů testu je vyjmuta ze systému.
 - c. Přiřazená souprava reagentů testu překročila limity stability.
3. Kalibrátor a každou zkumavku kontroly lze použít jednou. Pokusy o vícenásobné použití zkumavky mohou vést k chybám zpracování.

B. Rukavicový prášek

Stejně jako u jiných systémů reagentů může nadbytek talku z rukavic způsobit kontaminaci otevřených zkumavek. Doporučujeme používat rukavice bez talku.

Kontrola kvality

Obsluha může zrušit platnost výsledku zpracování nebo vzorku, pokud jsou při provádění testu zjištěny a zdokumentovány technické problémy, problémy na straně obsluhy nebo problémy na straně přístroje. V takovém případě je nutné zopakovat testování vzorků.

Kalibrace testu

Aby byly generovány platné výsledky, musí být dokončena kalibrace testu. Při každém vložení soupravy reagensů do systému Panther se třikrát zpracuje jeden pozitivní kalibrátor. Po potvrzení bude kalibrátor platný až 24 hodin. Pokud bude nutná kalibrace, software v systému Panther upozorní obsluhu. Obsluha naskenuje kalibrační koeficient na listu s čárovým kódem hlavní šarže dodávaném s každou soupravou reagensů.

Během zpracování software v systému Panther automaticky ověří kritéria přijatelnosti kalibrátoru. Pokud budou platné méně než dva replikáty kalibrátoru, software automaticky zruší platnost zpracování. Vzorky v neplatném zpracování bude nutné znovu otestovat pomocí čerstvě připraveného kalibrátoru a čerstvě připravených kontrol.

Negativní a pozitivní kontroly

Aby byly generovány platné výsledky, musí být testována sada kontrol testu. Jeden replikát negativní kontroly, slabě pozitivní kontroly a silně pozitivní kontroly je nutné otestovat při každém vložení soupravy reagensů do systému Panther. Po potvrzení budou kontroly platné až 24 hodin. Pokud budou vyžadovány kontroly, software v systému Panther upozorní obsluhu.

Během zpracování software v systému Panther automaticky ověří kritéria přijatelnosti kontrol. Aby byly výsledky platné, negativní kontrola musí poskytnout výsledek „Nedetekováno“ a výsledky pozitivních kontrol musí být v předem definovaném rozmezí. Pokud kterákoli z kontrol poskytne neplatný výsledek, software automaticky zruší platnost zpracování. Vzorky v neplatném zpracování bude nutné znovu otestovat pomocí čerstvě připraveného kalibrátoru a čerstvě připravených kontrol.

Vnitřní kalibrátor / vnitřní kontrola

Každý vzorek obsahuje vnitřní kalibrátor / vnitřní kontrolu (IC). Během zpracování automaticky ověří software systému Panther kritéria přijatelnosti kontroly IC. Pokud je výsledek kontroly IC neplatný, výsledky vzorku budou zneplatněny. Každý vzorek s neplatným výsledkem kontroly IC je nutné znovu otestovat, abyste získali platný výsledek.

Software systému Panther je navržen k přesnému ověření procesů při provádění postupů dle pokynů uváděných v této příbalové informaci a dokumentu *Návod k použití systému Panther/Panther Fusion*.

Interpretace výsledků

Poznámka: Kvantitativní výsledky testu Aptima HIV-1 Quant Dx byly hodnoceny pro plazmu. Sérum se nesmí používat pro kvantitativní výsledky. Kvalitativní výsledky byly hodnoceny pro plazmu i sérum.

Systém Panther automaticky stanoví koncentraci HIV-1 RNA pro vzorky a kontroly srovnáním výsledků s kalibrační křivkou. Koncentrace HIV-1 RNA jsou hlášeny v kopiích/ml a $\log_{10}$ kopií/ml. Interpretaci výsledků uvádí Tabulka 1. Pokud pro naředěné vzorky použijete ředění 1 : 3 nebo 1 : 100, systém Panther automaticky vypočte koncentraci HIV-1 pro čistý vzorek vynásobením naředěné koncentrace faktorem ředění a naředěné vzorky budou označeny jako naředěné.

Poznámka: Pro naředěné vzorky mohou být výsledky uvedené jako „Nedetekováno“ nebo „< 30 detekováno“ vygenerovány naředěním vzorků s koncentrací nad LoD (limit detekce), ale v jeho blízkosti, nebo LLoQ (spodní limit kvantifikace). Pokud nebyl získán kvantitativní výsledek, doporučujeme odebrat a otestovat jiný čistý vzorek.

Systém Panther neposkytuje kvalitativní výsledek (tzn. „Reaktivní“ nebo „Nereaktivní“) pro diagnostické použití. Obsluha musí interpretovat hlášenou koncentraci HIV-1 RNA do kvalitativního výsledku (Tabulka 1). Vzorky s výsledky označenými jako „Nedetekováno“ jsou nereaktivní pro HIV-1 RNA. Vzorky s výsledky označenými jako „< 30 detekováno“ nebo vzorky s výsledky uvedenými v lineárním rozmezí uvádí, že HIV-1 RNA byla detekována a tyto vzorky jsou reaktivní pro HIV-1 RNA.

Tabulka 1: Interpretace výsledků

Hlášený výsledek testu Aptima HIV-1 Quant Dx		Interpretace koncentrace HIV-1 RNA	Kvalitativní diagnostická interpretace uživatele ^c
Kopii/ml ^a	Hodnota $\log_{10}$		
Nedetekováno	Nedetekováno	HIV-1 RNA nedetekováno.	Nereaktivní na HIV-1 RNA
< 30 detekováno ^e	< 1,47	HIV-1 RNA je detekována, ale hladina je pod LLoQ.	Reaktivní na HIV-1 RNA
30 až 10 000 000	1,47 až 7,00	Koncentrace HIV-1 RNA je v lineárním rozmezí 30 až 10 000 000 kopií/ml.	Reaktivní na HIV-1 RNA
> 10 000 000	> 7,00	Koncentrace HIV-1 RNA je nad horním limitem kvantifikace (ULoQ).	Reaktivní na HIV-1 RNA
Neplatné ^d	Neplatné ^d	Při generování výsledku došlo k chybě. Vzorky je nutné testovat znovu.	Neplatné

^a Konverzní faktor z kopií na mezinárodní jednotky (IU) pro 3. mezinárodní standard pro HIV-1 RNA (10/152) je 0,35 kopií/IU.

^b Hodnota je zkrácena na dvě desetinná místa.

^c Diagnostickou interpretaci je možné provést ze vzorků séra nebo plazmy, které nebyly naředěny.

^d Neplatné výsledky se zobrazí modrým fontem.

^e Nejnižší hlášená hodnota je 30 kopií/ml. Nejvyšší limit LoD testu je 17,5 kopií/ml pro subtyp G. Hodnoty LoD všech subtypů uvádí Tabulka 3. Limit LoD za použití 3. mezinárodního standardu WHO (subtyp B) pro HIV-1 RNA je 12,1 kopií/ml (viz Tabulka 2).

Tabulka 2 uvádí kritéria přijatelnosti jednotlivých kontrol testu Aptima HIV-1 Quant Dx Assay.

Poznámka: Níže uvedený rozsah výtěžnosti se posouvá na základě přiřazené hodnoty každé konkrétní šarže. Viz přiřazená koncentrace uvedená na listu s čárovým kódem kontroly, který se dodává s každou krabičkou kontroly.

Tabulka 2: Kritéria přijatelnosti pro rozsah výtěžnosti kontrol testu Aptima HIV-1 Quant Assay

Součást	Rozsah výtěžnosti u validovaných sérií měření
Negativní kontrola	N/A
Nízká pozitivní kontrola	+/- 0,5 log ₁₀ kopií/ml
Vysoká pozitivní kontrola	+/- 0,5 log ₁₀ kopií/ml

Omezení

- A. Tento test mohou používat pouze osoby vyškolené v provedení příslušných postupů. Nedodržení pokynů uvedených v této příbalové informaci povede k chybným výsledkům.
- B. Spolehlivost výsledků závisí na adekvátním odběru, transportu, skladování a zpracování vzorků.
- C. Tento test byl validován k použití jako kvantitativní test pouze s lidskou EDTA a ACD plazmou.
- D. Tento test byl validován k použití jako kvalitativní test s lidskou EDTA a ACD plazmou a sérem.
- E. I když jsou vzácné, mutace ve vysoce konzervativních oblastech virového genomu krytých primery a/nebo sondami v testu Aptima HIV-1 Quant Dx mohou vést k podhodnocení nebo selhání detekce viru.

Výkonnost

Limit detekce (LoD) pomocí 3. mezinárodního standardu HIV-1 WHO

Limit detekce (LoD) je definován jako koncentrace HIV-1 RNA detekovaná s 95% nebo vyšší pravděpodobností dle CLSI EP17-A2 (39). Limit LoD byl stanoven testováním panelů, které zahrnovaly ředění 3. mezinárodního standardu HIV-1 WHO (subtyp B, kód NIBSC: 10/152) v HIV-1 negativní plazmě. 30 replikátů každého ředění bylo zpracováno na třech systémech Panther za použití tří šarží reagensů, celkem 90 replikátů pro každé ředění. Dle CLSI EP17-A2 byly výsledky ze šarže reagensů s nejvyšší koncentrací pro předvídaný limit detekce definovány jako limit LoD a uvádí je Tabulka 3. Dle analýzy Probit je limit LoD testu Aptima HIV-1 Quant Dx 12 kopií/ml (35 IU/ml; 0,35 kopií = 1 IU).

Tabulka 3: Limit detekce pro test Aptima HIV-1 Quant Dx za použití 3. mezinárodního standardu HIV-1 WHO

Předvídaný limit detekce	Koncentrace (kopie/ml)
10 %	1,2
20 %	1,6
30 %	2,0
40 %	2,5
50 %	3,1
60 %	3,8
70 %	4,8
80 %	6,2
90 %	9,0
95 %	12,1

Limit detekce u subtypů a skupin HIV-1

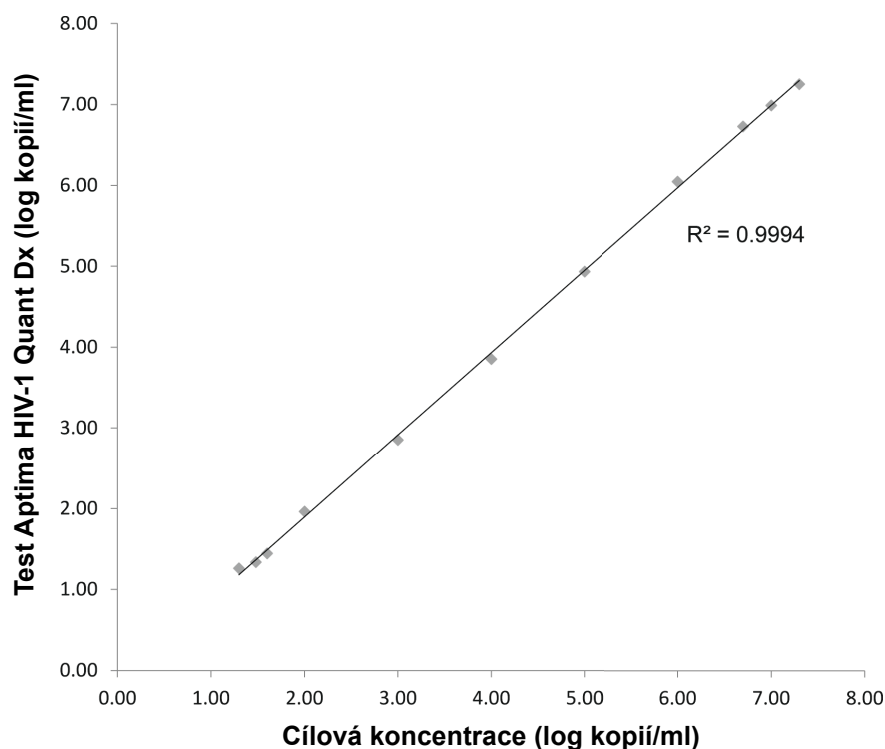
Pro skupinu M HIV-1 (subtypy A, C, D, F, G, CRF01_AE, CRF02_AG) a skupiny N a O bylo vytvořeno sedm panelů doplněním kultivovaného viru HIV-1 nebo pozitivních klinických vzorků do HIV-1 negativní lidské plazmy (0 až 40 kopií/ml). Každý člen panelu byl testován v 30 replikátech se dvěma šaržemi reagensů, celkem 60 replikátů na člena panelu. Přiřazení koncentrace pro klinické vzorky nebo kultivované viry bylo určeno pomocí srovnávacího testu. Analýza Probit byla provedena s cílem získat 50 % a 95 % předvídaných limitů detekce. Dle CLSI EP17-A2 (39) byly výsledky ze šarže reagensů s nejvyšší koncentrací pro předvídaný limit detekce definovány jako limit LoD a uvádí je Tabulka 4.

Tabulka 4: Limit detekce u subtypů a skupin HIV-1

Subtyp/skupina	Předvídaný limit detekce	Koncentrace (kopie/ml)
A	50 %	3,0
	95 %	12,3
CRF01_AE	50 %	1,8
	95 %	6,2
CRF02_AG	50 %	3,4
	95 %	15,4
C	50 %	2,0
	95 %	10,7
D	50 %	3,7
	95 %	14,0
F	50 %	2,1
	95 %	8,3
G	50 %	3,1
	95 %	17,5
N	50 %	1,2
	95 %	7,8
O	50 %	1,8
	95 %	8,0

Lineární rozsah

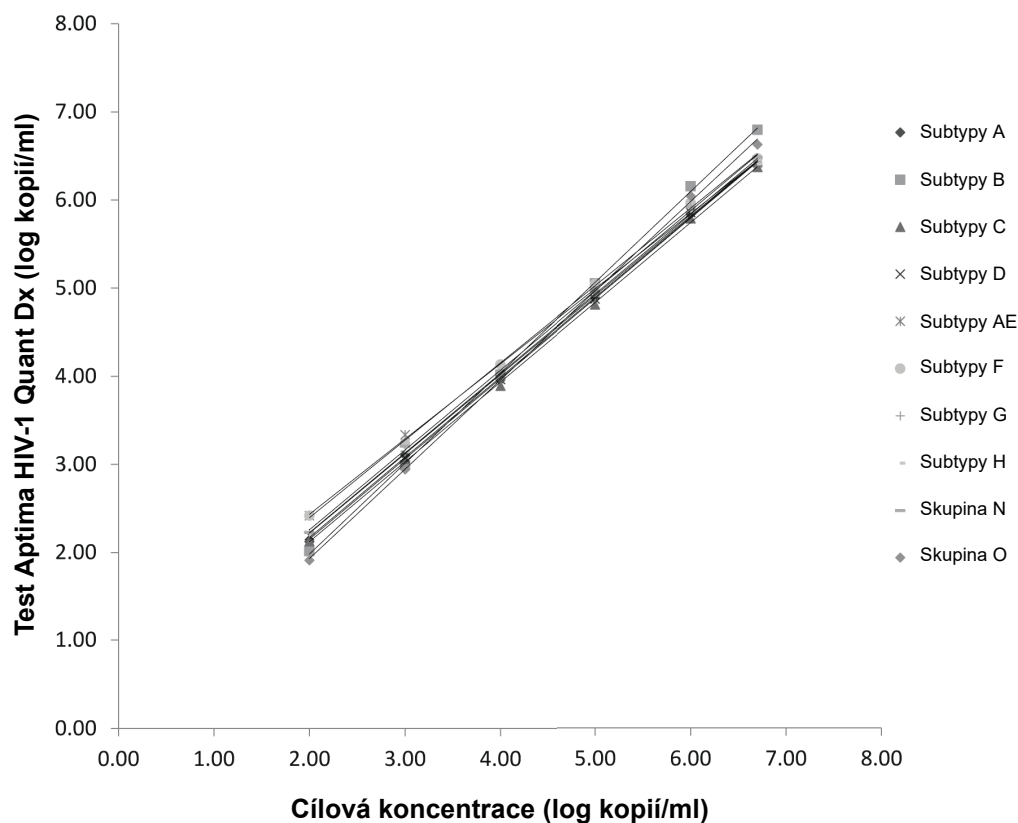
Lineární rozsah testu Aptima HIV-1 Quant Dx byl stanoven testováním panelů, které zahrnovaly kultivovaný HIV-1 virus, subtyp B ředěný v HIV-1 negativní lidské plazmě dle normy CLSI EP06-A (40). Koncentrace v panelech spadaly do rozsahu 1,30 až 7,30 log kopií/ml. Testování bylo provedeno na sedmi systémech Panther se dvěma šaržemi reagensů testu Aptima HIV-1 Quant Dx. Jak znázorňuje Obrázek 6, test Aptima Quant Dx prokázal linearitu v testovaném rozsahu.



Obrázek 6. Linearita testu Aptima HIV-1 Quant Dx

Linearita u subtypů a skupin HIV-1

Lineární odpověď pro test Aptima HIV-1 Quant Dx ve skupině M (subtypy A, B, C, D, F, G, H, CRF01_AE) a skupinách N a O byla potvrzena testováním panelů, které zahrnovaly HIV-1 transkript naředěný v pufru v koncentracích v rozsahu 2,00 až 6,70 log kopií/ml. Testování bylo provedeno na čtyřech systémech Panther a šesti zpracováních. Linearita byla prokázána v testovaném rozsahu (Obrázek 7).



Obrázek 7. Linearita ve skupině M (subtypy A, B, C, D, F, G, H, CRF01_AE) a skupinách N a O

Spodní limit kvantifikace pomocí 3. mezinárodního standardu HIV-1 WHO

Spodní limit kvantifikace (LLOQ) je definován jako nejnižší koncentrace, při které je HIV-1 RNA spolehlivě kvantifikována s celkovou chybou (TE) dle normy CLSI EP17-A2 (39). Chyba TE byla vypočtena za použití Westgardova modelu ($TE = |\text{zkreslení}| + 2SD$). Aby byla zajištěna správnost a přesnost měření byla chyba TE testu Aptima HIV-1 Quant Dx nastavena na úroveň 1 log kopií/ml (tzn. LLoQ, rozdíl mezi dvěma měřeními více než 1 log kopií/ml je statisticky významný).

Limit LLoQ byl stanoven testováním panelů, které zahrnovaly ředění 3. mezinárodního standardu HIV-1 WHO (subtyp B, kód NIBSC: 10/152) v HIV-1 negativní plazmě. Dle CLSI EP17-A2 byly panely testovány se třemi šaržemi reagensů v replikátech po 30 pro každou šarži z 23 zpracování. Výsledky uvádí Tabulka 5. Nejvyšší limit LLoQ pro 3 šarže testované pomocí testu Aptima HIV-1 Quant Dx za použití 3. mezinárodního standardu HIV-1 WHO je 15 kopií/ml (1,17 log kopií/ml; 42,9 IU/ml) (Tabulka 6).

Tabulka 5: Stanovení limitu LLoQ pro test Aptima HIV-1 Quant Dx za použití 3. mezinárodního standardu HIV-1 WHO

Šarže reagensie	Cílová koncentrace (log kopií/ml)	Aptima HIV-1 Quant Dx (log kopií/ml)	SD (log kopií/ml)	Zkreslení (log kopií/ml)	Vypočtená chyba TE (log kopií/ml)
1	1,15	1,05	0,37	0,10	0,84
	1,24	0,94	0,35	0,30	1,00
	1,42	1,37	0,33	0,05	0,71
	1,54	1,47	0,22	0,07	0,50
	1,94	1,98	0,13	0,04	0,30
	2,42	2,45	0,07	0,03	0,17
2	1,15	0,50	0,33	0,65	1,31
	1,24	0,80	0,44	0,45	1,33
	1,42	0,93	0,37	0,49	1,24
	1,54	1,17	0,31	0,38	0,99
	1,94	1,75	0,21	0,19	0,62
	2,42	2,28	0,21	0,14	0,55
3	1,15	0,88	0,41	0,26	1,09
	1,24	0,98	0,35	0,27	0,97
	1,42	1,15	0,34	0,27	0,96
	1,54	1,35	0,37	0,20	0,93
	1,94	1,84	0,17	0,11	0,44
	2,42	2,37	0,11	0,05	0,27

SD = směrodatná odchylka

Tabulka 6: Souhrn limitu LLoQ pomocí 3. mezinárodního standardu HIV-1 WHO (3 šarže reagensů)

Šarže reagensie	Limit LLoQ (log kopií/ml)	Limit LLoQ (kopie/ml)
1	0,94	8,7
2	1,17	15
3	0,98	9,5

Ověření limitu LLoQ u subtypů a skupin HIV-1

Limit LLoQ u různých subtypů a skupin HIV-1 byl ověřen dle normy CLSI EP17-A2 (39). Byly vytvořeny panely pro každou skupinu M HIV-1 (subtypy A, B, C, D, F, G, CRF01_AE, CRF02_AG) a skupiny N a O doplněním poolu HIV-1 negativní lidské plazmy o přirozeně infikované klinické vzorky nebo klinické izoláty. Testování zahrnovalo celkem 30 replikátů na člena panelu. Údaje, které uvádí Tabulka 7, představují nejnižší koncentraci pro každý subtyp nebo skupinu, kde byla chyba TE nižší než 1 log kopií/ml. Nejvyšší limit LLoQ pro všechny testované subtypy a skupiny byl 30 kopií/ml. Tato vyšší hodnota byla zvolena jako limit LLoQ pro test Aptima HIV-1 Quant Dx.

Tabulka 7: Ověření limitu LLoQ dle subtypu nebo skupiny HIV-1

Panel	Limit LLoQ (kopie/ml)
Subtyp A	30
Subtyp CRF01_AE	10
Subtyp CRF02_AG	30
Subtyp B	10
Subtyp C	30
Subtyp D	15
Subtyp F	15
Subtyp G	30
Skupina N	10
Skupina O	15

Přesnost

V rámci hodnocení přesnosti testu Aptima HIV-1 Quant Dx byl panel vytvořený doplněním kultivovaného viru HIV-1 subtyp B do HIV-1 negativní plazmy testovaný třemi pracovníky obsluhy za použití tří šarží reagensů na třech systémech Panther během 20 dní (Tabulka 8). Panel sestával z jednoho HIV-1 negativního člena panelu a osmi HIV-1 pozitivních členů panelu. Přiřazení koncentrace pro klinické vzorky nebo kultivované viry bylo určeno pomocí srovnávacího testu.

Tabulka 8: Přesnost testu Aptima HIV-1 Quant Dx

Počet validních replikátů	Střední koncentrace (log kopii/ml)	Mezi přístroji		Mezi pracovníky obsluhy		Mezi šaržemi		Mezi zpracováními		V rámci zpracování		Celkem	
		SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)
137	1,80	0,00	0,00	0,03	1,72	0,00	0,00	0,00	0,00	0,16	8,93	0,16	9,10
157	2,37	0,00	0,00	0,05	2,08	0,01	0,36	0,08	3,33	0,15	6,19	0,17	7,34
160	2,47 ^a	0,00	0,00	0,03	1,37	0,03	1,35	0,07	2,97	0,12	5,03	0,15	6,15
162	2,95	0,00	0,00	0,08	2,57	0,02	0,61	0,10	3,29	0,09	3,04	0,15	5,20
162	3,80	0,01	0,32	0,03	0,80	0,02	0,48	0,06	1,49	0,07	1,80	0,10	2,53
159	4,93	0,00	0,00	0,02	0,37	0,04	0,77	0,05	1,10	0,04	0,71	0,08	1,56
162	5,69	0,00	0,00	0,02	0,27	0,04	0,66	0,03	0,58	0,07	1,29	0,09	1,58
162	6,71	0,00	0,00	0,01	0,22	0,04	0,52	0,04	0,60	0,05	0,78	0,08	1,13

CV = koeficient variability, SD = směrodatná odchylka

^a Tento člen panelu byl naředěn v poměru 1 : 3 pomocí roztoku k ředění vzorků a otestován s cílem vyhodnotit přesnost naředěného vzorku.

Poznámka: Variabilita některých faktorů může být číselně negativní, což může nastat, pokud je variabilita způsobená těmito faktory velmi malá. Pokud k tomu dojde, SD = 0 a CV = 0 %. Celkový počet testovaných replikátů byl 162 pro každý panel. Analyzovány byly pouze replikáty s numerickou hodnotou.

Potenciálně interferující látky

Byla vyhodnocena citlivost testu Aptima HIV-1 Quant Dx na interferenci zvýšených hladin endogenních látek a léky běžně předepisovanými u osob infikovaných HIV-1. Testovány byly vzorky HIV-1 negativní lidské plazmy a vzorky doplněné do koncentrace 3 log kopií/ml HIV-1 RNA.

Nebyla zjištěna žádná interference ve výkonnosti testu Aptima HIV-1 Quant Dx v přítomnosti albuminu (90 mg/ml), hemoglobinu (5 mg/ml), triglyceridů (30 mg/ml) nebo nekonjugovaného bilirubinu (0,2 mg/ml).

Nebyla zjištěna žádná interference ve výkonnosti testu Aptima HIV-1 Quant Dx v přítomnosti exogenních látek, které uvádí Tabulka 9, v koncentracích odpovídajících minimálně trojnásobku $C_{\max}$ (lidská plazma).

Tabulka 9: Exogenní látky

Pool exogenních látek	Testované exogenní látky
1	Lopinavir, indinavir, saquinavir, ritonavir, nelfinavir mesylate, darunavir, amprenavir, atazanavir
2	Nevirapin, efavirenz, rilpivirin, klarithromycin, amfotericin B
3	Tenofovir disoproxil fumarát, adefovir dipivoxil, ribavirin, enfuvirtid, maraviroc, raltegravir, dolutegravir
4	Abacavir sulfát, didanosin, zidovudin, lamivudin, stavudin, entecavir, telbivudin, emtricitabin
5	Paroxetin HCl, fluoxetin, sertralin
6	Ganciclovir, valacyclovir, acyclovir, rifampin/rifampicin, ethambutol
7	Ciprofloxacin, azithromycin, amoxicilin, cefalexin, ampicilin, trimethoprim
8	Valganciclovir hydrochlorid, boceprevir, telaprevir, simeprevir, sofosbuvir
9	Pegylovaný interferon alfa -2b, interferon alfa -2a, interferon alfa -2b
10	Heparin, EDTA, citrát sodný
11	Tipranavir
12	Isoniazid

Klinické vzorky plazmy, které uvádí Tabulka 10, od pacientů se zvýšenými hladinami definovaných látek nebo od pacientů s uvedenými onemocněními byly testovány pomocí testu Aptima HIV-1 Quant Dx s přítomností 3 log kopií HIV-1 RNA nebo bez nich. Nebyla pozorována žádná interference ve výkonnosti.

Tabulka 10: Typy testovaných klinických vzorků

Typy klinických vzorků	
1	Revmatoidní faktor (RF)
2	Antinukleární protilátky (ANA)
3	Protilátky anti-Jo-1 (JO-1)
4	Systémový lupus erythematosus (SLE)
5	Revmatoidní artritida (RA)
6	Roztroušená skleróza (MS)
7	Hyperglobulinemie
8	Zvýšená alaninaminotransferáza (ALT)
9	Alkoholická cirhóza (AC)
10	Mnohočetný myelom (MM)
11	Lipémie (zvýšená hladina lipidů)
12	Ikterus (zvýšený bilirubin)
13	Hemolýza (zvýšený hemoglobin)
14	Zvýšený protein albumin
15	Protilátky proti HCV
16	Protilátky proti HBV
17	Protilátky proti HIV-2

Specifická

Specifická testu Aptima HIV-1 Quant Dx byla stanovena pomocí 120 čerstvých a 510 zmrazených HIV-1 negativních vzorků plazmy a pomocí 120 čerstvých a 510 zmrazených HIV-1 negativních vzorků séra. Všechny výsledky byly nereaktivní (specifická 100 %: 95% CI: 99,4–100%).

Tabulka 11: Specifická ve vzorcích plazmy a séra

	Čerstvá plazma	Zmrazená plazma	Celková plazma	Čerstvé sérum	Zmrazené sérum	Celkové sérum
Platných replikátů (n)	120	510	630	120	510	630
Nereaktivní	120	510	630	120	510	630
Specifická (95% CI)	100% (97,0–100)	100% (99,3–100)	100% (99,4–100)	100% (97,0–100)	100% (99,3–100)	100% (99,4–100)

CI = interval spolehlivosti

Analytická specifita

Potenciální křížová reaktivita s patogeny (Tabulka 12) byla hodnocena u testu Aptima HIV-1 Quant Dx v přítomnosti nebo nepřítomnosti 3 log kopií/ml HIV-1 RNA v HIV-1 negativní plazmě. V přítomnosti patogenů nebyla zjištěna žádná interference s výkonností testu.

Tabulka 12: Patogeny testované na analytickou specifitu

Patogen	Koncentrace
Virus hepatitidy A	100 000 PFU/ml ^a
Virus hepatitidy B	100 000 IU/ml ^b
Virus hepatitidy C	100 000 IU/ml
Virus hepatitidy G	100 000 kopií/ml
Herpes simplex virus 1 (HSV-1)	100 000 PFU/ml
Herpes simplex virus 2 (HSV-2)	75 000 PFU/ml
Lidský herpes virus 6	100 000 kopií/ml
Lidský herpes virus 8	42 000 PFU/ml
HIV-2	5 500 PFU/ml
Lidský T-lymfotropní virus (HTLV)	100 000 vp/ml ^c
Virus západonilské horečky	100 000 kopií/ml
Parvovirus B19	100 000 IU/ml
Cytomegalovirus	100 000 kopií/ml
Epstein-Barr virus	100 000 kopií/ml
Adenovirus typu 5	100 000 PFU/ml
Virus Dengue	100 000 kopií/ml
Virus influenzy A	100 000 PFU/ml
<i>Staphylococcus aureus</i>	1 000 000 CFU/ml ^d
<i>Propionibacterium acnes</i>	1 000 000 CFU/ml
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1 000 000 CFU/ml
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1 000 000 CFU/ml
<i>Chlamydia trachomatis</i>	300 000 IFU/ml ^e
<i>Candida albicans</i>	1 000 000 CFU/ml

^a PFU/ml = jednotky tvořící plaky na ml.

^b IU/ml = mezinárodní jednotky na ml.

^c vp/ml = virové částičky na ml.

^d CFU/ml = jednotky tvořící kolonie na ml.

^e IFU/ml = jednotky tvořící inkluze na ml.

Opakovatelnost klinických vzorků

Deset klinických vzorků plazmy bylo testováno ve třech replikátech pomocí testu Aptima HIV-1 Quant Dx. Průměrnou koncentraci a směrodatnou odchylku uvádí Tabulka 13.

Tabulka 13: Opakovatelnost klinických vzorků

Vzorek	Průměrná koncentrace (log kopií/ml)	SD
1	2,57	0,06
2	3,20	0,03
3	3,24	0,06
4	3,97	0,02
5	4,20	0,05
6	4,85	0,01
7	5,17	0,04
8	5,51	0,06
9	5,84	0,02
10	6,64	0,00

Ředění vzorků pomocí roztoku k ředění vzorků

K hodnocení ředění vzorků byl testován panel sestávající z 11 vzorků s koncentracemi v lineárním rozsahu testu Aptima HIV-1 Quant Dx zahrnující dva vzorky nad horním limitem kvantifikace testu v čisté formě a naředěné formě (1 : 3 nebo 1 : 100 v roztoku k ředění vzorků) ve třech opakováních (Tabulka 14).

Tabulka 14: Ředění vzorků

Ředění	Průměrná čistá koncentrace (log kopií/ml)	Průměrná hlášená koncentrace ^a (log kopií/ml)	Rozdíl
1 : 3	2,57	2,72	0,15
	3,20	3,33	0,13
	3,24	3,55	0,30
	3,97	4,05	0,07
	4,20	4,24	0,04
	4,85	4,81	-0,04
	5,17	5,08	-0,08
	5,51	5,32	-0,19
	5,84	5,94	0,10
	6,64	6,66	0,02
	2,46 ^b	2,19	-0,27
1 : 100	> 7,00 (7,16 ^c)	7,48	0,32
1 : 100	> 7,00 (7,40 ^c) ^b	7,39	-0,01

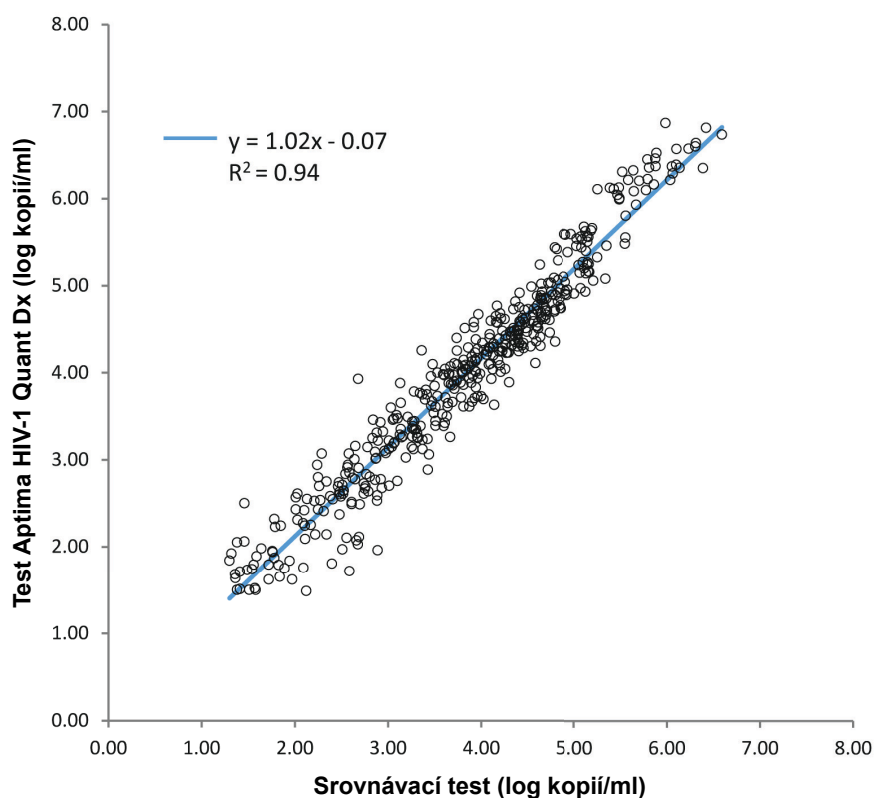
^a Hlášená koncentrace je hodnota uváděná systémem Panther po použití faktoru ředění.

^b Doplněný vzorek

^c Všechny výsledky > 7,00 log kopií/ml byly odhadovány pomocí další analýzy.

Korelace metod

Výkonnost testu Aptima HIV-1 Quant Dx byla hodnocena proti srovnávacímu testu s označením CE testováním neřaděných klinických vzorků plazmy od pacientů infikovaných HIV-1 na čtyřech systémech Panther se dvěma šaržemi reagensů. Celkem bylo testováno pro lineární regresi 342 zmrazených a 108 čerstvých vzorků plazmy s kvantifikovatelnými výsledky v testu Aptima HIV-1 Quant Dx a srovnávacím testu (Obrázek 8). Vzorky zahrnovaly skupinu M HIV-1 (subtypy A, B, C, D, F, G, H, CRF01_AE, CRF02_AG).



Obrázek 8. Korelace mezi testem Aptima HIV-1 Quant Dx a srovnávacím testem

Diagnostická shoda

K vyhodnocení diagnostické shody byly testovány vzorky od HIV-1 pozitivních osob za použití testu Aptima HIV-1 Quant Dx a srovnávacího kvalitativního testu na HIV-1 s označením CE: 414 vzorků mělo platné výsledky (Tabulka 15). Výsledky obou testů byly kategorizovány následovně. Jakýkoli výsledek poskytující kvantifikovatelný nebo detekovatelný výsledek byl kategorizován jako „Detekováno“. Jakýkoli výsledek, u kterého nebyl detekován cíl, byl kategorizován jako „Cíl nedetekován“.

Tabulka 15: Diagnostická shoda mezi testem Aptima HIV-1 Quant Dx a srovnávacím testem

		Test Aptima HIV-1 Quant Dx	
		Detekováno	Cíl nedetekován
Srovnávací test	Detekováno	214	0
	Cíl nedetekován	0	200

Přenos

Aby se zjistilo, zda systém Panther minimalizuje riziko falešně pozitivních výsledků vyplývajících z přenosu kontaminace, byla provedena vícenásobná analytická studie s využitím doplněných panelů ve dvou systémech Panther. Přenos byl hodnocen pomocí doplněných vzorků s vysokým titrem HIV-1 (7 log kopií/ml) rozdělenými mezi HIV-1 negativní vzorky v šachovnicovém vzorci. Testování bylo provedeno v pěti zpracováních. Celková míra přenosu byla 0 % (n = 469).

Panel sérokonverze

Devatenáct HIV-1 souborů panelu sérokonverze zahrnujících 204 vzorků bylo testováno pomocí testu Aptima HIV-1 Quant Dx. Detekce HIV-1 RNA byla srovnána s detekcí pomocí antigenových testů p24 a pomocí protilátkových testů HIV-1/2. Počet dní do prvního reaktivního výsledku pomocí antigenových testů p24, protilátkových testů anti-HIV 1/2 a testu Aptima HIV-1 Quant Dx uvádí Tabulka 16. Test Aptima HIV-1 Quant Dx detekoval HIV-1 RNA v průměru 5,58 a 11,16 dní před antigenovým testem p24, resp. protilátkovými testy anti-HIV 1/2.

Tabulka 16: Souhrn údajů panelu sérokonverze

ID panelu	Počet testovaných členů panelu	Počet reaktivních členů panelu			Počet dní do prvního reaktivního výsledku			Rozdíl ve dnech do prvního reaktivního výsledku (na základě data krvácení)	
		Aptima HIV-1 Quant Dx	Antigen p24 HIV	Protilátka anti-HIV 1/2	Aptima HIV-1 Quant Dx	Antigen p24 HIV	Protilátka anti-HIV 1/2	Počet dní dřívější detekce před antigenem p24 HIV	Počet dní dřívější detekce před protilátkou anti-HIV 1/2
6248	7	3	2	1	14	18	25	4	11
6243	10	6	3	2	18	25	32	7	14
6247	9	4	4	1	21	21	30	0	9
9016	10	3	2	0	27	30	34 ^a	3	7
9018	11	5	3	2	21	28	32	7	11
9020	22	5	4	1	83	87	97	4	14
9021	17	5	4	1	43	47	57	4	14
9022	9	3	2	1	23	25	32	2	9
9023	22	5	3	0	71	78	85 ^a	7	14
9030	16	5	3	1	40	47	54	7	14
9034	13	4	3	1	41	46	53	5	12
9089	6	5	3	2	7	16	20	9	13
12008	13	7	4	4	21	28	33	7	12
PRB962	6	4	2	0	7	14	17 ^a	7	10
PRB963	7	4	2	0	9	17	21 ^a	8	12
PRB966	10	5	3	2	35	44	48	9	13
PRB974 ^b	4	3	2	1	7	9	16	2	9
PRB975 ^b	5	3	1	0	7	14	14 ^a	7	7
PRB978 ^b	7	3	1	0	26	33	33 ^a	7	7
Celkem	204	82	51	20	Průměr			5,58	11,16
					Medián			7	12

^a Všechna krvácení v tomto panelu byla nereaktivní na protilátku anti-HIV 1/2. Poslední krvácení bylo použito jako „Počet dní do prvního reaktivního výsledku“.

Testování protilátek anti-HIV 1/2 bylo provedeno pomocí testu Abbott Anti-HIV 1/2 s následujícími výjimkami:

^b Panely PRB974, PRB975 a PRB978 byly testovány pomocí testu Siemens Anti-HIV 1/2.

Antigenové testování p24 HIV-1 bylo provedeno pomocí testu Coulter HIV-1 p24 Ag s následujícími výjimkami:

^b Panely PRB974, PRB975 a PRB978 byly testovány pomocí testu BioMerieux p24 Ag.

Studie ekvivalence séra, plazmy

K vyhodnocení ekvivalence byly testovány přiřazené vzorky séra a plazmy (25 HIV-1 pozitivních a 25 HIV-1 negativních) a 40 vzorků doplněných o kultivovaný HIV-1 (50 až 1 000 000 kopií/ml v HIV-1 negativní plazmě a séru) pomocí testu Aptima HIV-1 Quant Dx. Negativní shoda byla 100,0% (95% CI: 97,0–100,0 %). Pozitivní shoda byla 98,4% (95% CI: 95,4–99,5 %).

Literatura

1. **Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dauguet, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouziuz, W. Rozenbaum, and L. Montagnier.** 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). *Science* **220**:868–871.
2. **Popovic, M., M. G. Sarngadharan, E. Read, and R. C. Gallo.** 1984. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* **224**:497–500.
3. **Gallo R. C., S. Z. Salahuddin, M. Popovic, G. M. Streater, M. Kaplan, D. F. Haynas, T. J. Palker, R. Redfield, J. Oleske, B. Safai, G. White, P. Foster, and P. D. Markham.** 1984. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* **224**:500–503.
4. **Piot, P., F. A. Plummer, F. S. Mhalu, J.-L. Lamboray, J. Chin, and J. M. Mann.** 1988. AIDS: An international perspective. *Science* **239**:573–579.
5. **Sarngadharan, J. G., M. Popovic, L. Broch, J. Scupbach, and R. C. Gallo.** 1984. Antibodies reactive with human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) in the serum of patients with AIDS. *Science* **224**:506–508.
6. **Gallo, D., J. S. Kimpton, and P. J. Dailey.** 1987. Comparative studies on use of fresh and frozen peripheral blood lymphocyte specimens for isolation of human immunodeficiency virus and effects of cell lysis on isolation efficiency. *J. Clin. Microbiol.* **25**:1291–1294.
7. **Clavel, F., D. Guetard, F. Brun-Vezinet, S. Chamaret, M. Rey, M. O. Santos-Ferreira, A. G. Laurent, C. Dauguet, C. Katlama, C. Rouzioux, D. Klatzmann, J. L. Champalimaud, and L. Montagnier.** 1986. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* **233**:343–346.
8. **Curran, J. W., H. W. Jaffe, A. M. Hardy, W. M. Morgan, R. M. Selik, and T. J. Dondero.** 1988. Epidemiology of HIV Infection and AIDS in the United States. *Science* **239**:610–616.
9. **Gaines, H., M. A. von Sydow, and L. V. von Stedingk.** 1990. Immunological changes in primary HIV-1 infection. *AIDS* **4**:995–999.
10. **Tindall, B., and D. A. Cooper.** 1991. Primary HIV-1 infection: host responses and intervention strategies. *AIDS* **5**:1–14.
11. **Daar, E. S., T. Moudgil, R. D. Meyer, and D. D. Ho.** 1991. Transient high levels of viremia in patients with primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *N. Engl. J. Med.* **324**:961–964.
12. **Clark, S. J., M. S. Saag, and W. D. Decker.** 1991. High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection. *N. Engl. J. Medicine* **324**:954–960.
13. **Albert J., B. Abrahamsson, K. Nagy, E. Aurelius, H. Gaines, G. Nystrom, and E. M. Fenyo.** 1990. Rapid development of isolate-specific neutralizing antibodies after primary HIV-1 infection and consequent emergence of virus variants which resist neutralization by autologous sera. *AIDS* **4**:107–112.
14. **Horsburgh, C. R. Jr., C. Y. Ou, J. Jason, S. D. Holmberg, I. M. Longini Jr., C. Schable, K. H. Mayer, A. R. Lifson, G. Schochetman, J. W. Ward, et al.** 1989. Duration of human immunodeficiency virus infection before detection of antibody. *Lancet* **16**:637–640.
15. **Schnittman, S. M., M. C. Psallidopoulos, H. C. Lane, L. Thompson, M. Baseler, F. Massari, C. H. Fox, N. P. Salzman, and A. S. Fauci.** 1989. The reservoir for HIV-1 in human peripheral blood is a T cell that maintains expression of CD4. *Science* **245**:305–308. Erratum in: *Science* 1989 **245**, preceding 694.
16. **Schnittman, S. M., J. J. Greenhouse, M. C. Psallidopoulos, M. Baseler, N. P. Salzman, A. S. Fauci, and H. C. Lane.** 1990. Increasing viral burden in CD4+ T cells from patients with human immunodeficiency virus (HIV) infection reflects rapidly progressive immunosuppression and clinical disease. *Ann. Intern. Med.* **113**:438–443.
17. **Pantaleo, G., C. Graziosi, and A. S. Fauci.** 1993. New concepts in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *N. Engl. J. Med.* **328**:327–335.
18. **Piatak, M. Jr., M. S. Saag, L. C. Yang, S. J. Clark, J. C. Kappes, K. C. Luk, B. H. Hahn, G. M. Shaw, and J. D. Lifson.** 1993. High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science* **259**:1749–1754.
19. **Fauci, A. S., S. M. Schnittman, G. Poli, S. Koenig, and G. Pantaleo.** 1991. NIH conference: immunopathogenic mechanisms in human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Ann. Intern. Med.* **114**:678–693.
20. **Coffin, J. M.** 1995. HIV-1 population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science* **267**:483–489.
21. **Ho, D. D., A. U. Neumann, A. S. Perelson, W. Chen, J. M. Leonard, and M. Markowitz.** 1995. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* **373**:123–126.
22. **Wei, X., S. K. Ghosh, M. E. Taylor, V. A. Johnson, E. A. Emini, P. Deutsch, J. D. Lifson, S. Bonhoeffer, M. A. Nowak, B. H. Hahn et al.** 1995. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* **373**:117–122.
23. **O'Brien, W. A., P. M. Hartigan, D. Martin, J. Esinhart, A. Hill, S. Benoit, M. Rubin, M. S. Simberkoff, and J. D. Hamilton.** 1996. Changes in plasma HIV-1 RNA and CD4 lymphocyte counts and the risk of progression to AIDS. Veterans Affairs Cooperative Study Group on AIDS. *N. Engl. J. Med.* **334**:426–431.
24. **Welles, S. L., J. B. Jackson, B. Yen-Lieberman, L. Demeter, A. J. Japour, L. M. Smeaton, V. A. Johnson, D. R. Kuritzkes, R. T. D'Aquila, P. A. Reichelderfer, D. D. Richman, R. Reichman, M. Fischl, R. Dolin, R. W. Coombs, J. O. Kahn, C. McLaren, J. Todd, S. Kwok, and C. S. Crumpacker.** 1996. Prognostic value of plasma Human Immunodeficiency Virus Type I (HIV-1) RNA

- levels in patients with advanced HIV-1 disease and with little or no zidovudine therapy. AIDS Clinical Trials Group Protocol 116A/116B/117 Team. *J. Infect. Dis.* **174**:696–703.
25. **Coombs, R. W., S. L. Welles, C. Hooper, P. S. Reichelderfer, R. T. D'Aquila, A. J. Japour, V. A. Johnson, D. R. Kuritzkes, D. D. Richman, S. Kwok, J. Todd, J. B. Jackson, V. DeGruttola, C. S. Crumpacker, and J. Kahn.** 1996. Association of plasma Human Immunodeficiency Virus Type I RNA level with risk of clinical progression in patients with advanced infection. AIDS Clinical Trials Group (ACTG) 116B/117 Study Team. ACTG Virology Committee Resistance and HIV-1 RNA Working Groups. *J. Infect. Dis.* **174**:704–712.
 26. **Hammer, S., C. Crumpacker, R. D'Aquila, B. Jackson, J. Lathey, D. Livnat, and P. Reichelderfer.** 1993. Use of virologic assays for detection of human immunodeficiency virus in clinical trials: Recommendations of the AIDS Clinical Trials Group Virology Committee. *J. Clin. Microbiol.* **31**:2557–2564.
 27. **Schochetman, G., and J. R. George,** ed. 1994. *AIDS Testing: A Comprehensive Guide To Technical, Medical, Social, Legal and Management Issues*, 2nd ed. Springer-Verlag, New York.
 28. **Mulder, J., N. McKinney, C. Christopherson, J. Sninsky, L. Greenfield, and S. Kwok.** 1994. Rapid and simple PCR assay for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma: application to acute retroviral infection. *J. Clin. Microbiol.* **32**:292–300.
 29. **Dewar, R. L., H. C. Highbarger, M. D. Sarmiento, J. A. Todd, M. B. Vasudevachari, R. T. Davey, Jr., J. A. Kovacs, N. P. Salzman, H. C. Lane, and M. S. Urdea.** 1994. Application of branched DNA signal amplification to monitor human immunodeficiency virus type 1 burden in human plasma. *J. Infect. Dis.* **170**:1172–1179.
 30. **van Gemen, B., T. Kievits, R. Schukink, D. van Strijp, L. T. Malek, R. Sooknanan, H. G. Huisman, and P. Lens.** 1993. Quantification of HIV-1 RNA in plasma using NASBA during HIV-1 primary infection. *J. Virol. Methods* **43**:177–187.
 31. **31. Centers for Disease Control and Association of Public Health Laboratories.** 2014. Laboratory testing for the diagnosis of HIV infection: Updated recommendations.
 32. **32. Pandori, M. W., J. Hackett Jr., B. Louie, A. Vallari, T. Dowling, S. Liska, and J. D. Klausner.** 2009. Assessment of the ability of a fourth-generation immunoassay for human immunodeficiency virus (HIV) antibody and p24 antigen to detect both acute and recent HIV infections in a high-risk setting. *J. Clin. Microbiol.* **47**:2639–2642.
 33. **Gill, P. and Ghaemi, A.** 2008. Nucleic acid isothermal amplification technologies: a review. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* **27**(3):224–43.
 34. **Hill, C.** 2001. Molecular diagnostic testing for infectious diseases using TMA technology. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **1**(4): 445–455.
 35. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2005. *Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods; Approved Guideline.* CLSI Document MM13-A. Wayne, PA.
 36. **29 CFR Part 1910.1030.** Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens; current version.
 37. **Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health.** Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL); current version.
 38. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2002. *Clinical Laboratory Waste Management.* CLSI Document GP5-A2. Villanova, PA.
 39. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2012. *Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline—Second Edition.* CLSI Document EP17-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
 40. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2003. *Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline.* CLSI document EP06-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.



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



Hologic BV
Da Vincilaan 5
1930 Zaventem
Belgium

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

E-mailovou adresu a telefonní číslo oddělení technické podpory a zákaznických služeb ve vaší zemi najdete na adrese www.hologic.com/support.

Hologic, Aptima, Panther, Panther / Panther Fusion, TMA a související loga jsou ochranné známky nebo registrované ochranné známky společnosti Hologic, Inc. nebo jejích dceřiných společností v USA či jiných zemích.

Armored RNA je ochranná známka společnosti Asuragen, Inc.

Všechny ostatní ochranné známky, které se mohou objevit v této příbalové informaci, jsou majetkem příslušných vlastníků.

Tento produkt může být krytý jedním či více patenty USA uvedenými na webové stránce www.hologic.com/patents.

© 2014–2024 Hologic, Inc. Všechna práva vyhrazena.

AW-11853-2601 Rev. 011

2024-09