

Aptima® HBV Quant Assay

Instrukcja użycia
Do zastosowania w diagnostyce *in vitro*
Tylko na eksport poza USA

Informacje ogólne	2
Przeznaczenie	2
Podsumowanie i objaśnienie testu	2
Zasady procedury	3
Podsumowanie dotyczące bezpieczeństwa i skuteczności	4
Ostrzeżenia i środki ostrożności	4
Wymagania dotyczące przechowywania odczynników i postępowania z nimi	10
Pobieranie i przechowywanie próbek	11
Próbki w systemie Panther	14
Transport próbek	14
System Panther	15
Dostarczone odczynniki i materiały	15
Materiały wymagane, ale dostępne osobno	16
Materiały opcjonalne	17
Procedura testu w systemie Panther System	18
Uwagi dotyczące procedury	22
Kontrola jakości	23
Kalibracja testu	23
Kontrole ujemne i dodatnie	23
Kalibrator wewnętrzny / kontrola wewnętrzna	23
Interpretacja wyników	24
Ograniczenia	25
Skuteczność analityczna	26
Granica wykrywalności przy zastosowaniu 3. międzynarodowej próbki wzorcowej WHO	26
Granica wykrywalności dla różnych genotypów HBV	26
Zakres liniowy	27
Liniowość według genotypów HBV	28
Dolna granica oznaczenia ilościowego przy zastosowaniu 3. międzynarodowej próbki wzorcowej WHO	28
Dolna granica oznaczalności dla różnych genotypów HBV	30
Identyfikowalność według 3. Międzynarodowej Normy WHO	32
Precyzja	32
Potencjalne substancje zakłócające	34
Swoistość analityczna	36
Równoważność matrycy	37
Rozcieńczanie próbki przy użyciu rozcieńczalnika do próbek Aptima (1:3)	37
Rozcieńczanie próbki przy użyciu rozcieńczalnika do próbek Aptima (1:100)	38
Potwierdzenie LLoQ w próbkach rozcieńczonych w rozcieńczalniku do próbek Aptima.	40
Precyzja rozcieńczonych próbek	40
Przenoszenie	41
Powtarzalność	41
Skuteczność kliniczna	43
Korelacja metod	43
Użyteczność kliniczna	43
Bibliografia	52
Dane kontaktowe i historia wersji	53

Informacje ogólne

Przeznaczenie

Test Aptima® HBV Quant to test amplifikacji kwasów nukleinowych *in vitro* do ilościowego oznaczania DNA wirusa zapalenia wątroby typu B (HBV) w ludzkim osoczu i surowicy w całkowicie zautomatyzowanym systemie Panther™.

Osocze można przygotować w kwasie etylenodiaminotetraoctowym (EDTA), w roztworze antykoagulantu cytrynianu dekstrozy (ACD) oraz w probówkach do przygotowania osocza (PPT). Surowicę można przygotować w probówkach do surowicy lub w probówkach do separacji surowicy (SST). Próbkę są badane przy użyciu w pełni zautomatyzowanego systemu Panther do przetwarzania próbek, amplifikacji i oznaczania ilościowego. Do oznaczania ilościowego w teście są zatwierdzane próbki zawierające genotypy A, B, C, D, E, F, G i H wirusa HBV.

Test Aptima HBV Quant jest przeznaczony do stosowania jako pomoc w prowadzeniu pacjentów z przewlekłym zakażeniem HBV, poddawanych terapii lekami przeciwwirusowymi na HBV. Test może być używany do pomiaru poziomu DNA wirusa HBV na poziomie wyjściowym i podczas leczenia, aby pomóc w ocenie reakcji wirusa na leczenie. Wyniki testu Aptima HBV Quant należy interpretować w kontekście wszystkich istotnych wyników badań klinicznych i laboratoryjnych.

Test Aptima HBV Quant nie jest przeznaczony do stosowania jako przesiewowy test w kierunku obecności DNA wirusa HBV we krwi lub produktach krwiopochodnych ani jako test diagnostyczny w celu potwierdzenia obecności zakażenia wirusem HBV.

Podsumowanie i objaśnienie testu

Wirus zapalenia wątroby typu B, jeden z kilku wirusów wywołujących zapalenie wątroby, powoduje trwające całe życie zakażenie HBV, marskość wątroby, raka wątroby, niewydolność wątroby i potencjalnie śmierć. Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) wymienia HBV jako jedną z najczęstszych chorób zakaźnych na świecie. Częstość występowania zakażenia HBV i sposób transmisji są na całym świecie bardzo zróżnicowane. Szacuje się, że w 2019 roku na całym świecie żyło 296 milionów ludzi z przewlekłym zakażeniem HBV.¹ Zakażenie HBV powoduje zwiększone ryzyko pogorszenia stanu wątroby, marskości i raka wątrobowokomórkowego (HCC) ze śmiertelnością od 0,5 do 1,2 miliona zgonów i 5–10% przypadków transplantacji wątroby na świecie rocznie.^{2,3} Bez odpowiedniego leczenia, interwencji i monitorowania po postawieniu diagnozy, 5-letnia skumulowana zapadalność na marskość wątroby wynosi 8–20%. Po wystąpieniu marskości wątroby, roczne ryzyko wystąpienia raka wątrobowokomórkowego wynosi 2–5%.⁴

HBV zawiera kolisty, częściowo dwuniciowy genom DNA o długości około 3200 par zasad, który koduje cztery częściowo nakładające się na siebie otwarte ramki odczytu (ORF) których produkty ekspresji to polimeraza, białko powierzchniowe, polipeptyd przedrdzeniowy / rdzeniowy oraz białko X. ORF polimerazy nakłada się na pozostałe trzy ORF i koduje kluczowe białko wirusowej replikacji, polimerazę. W ORF białka powierzchniowego dochodzi do ekspresji trzech białek, które są niezbędne do morfogenezy wirusa, wejścia wirusa do hepatocytów i wywołania odpowiedzi immunologicznej gospodarza.⁵ Istnieje 8 genotypów HBV (A-H), które zwykle występują w różnych miejscach geograficznych.

Ze względu na dynamiczny charakter przewlekłego zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu B ważne jest stałe monitorowanie DNA HBV i aminotransferazy alaninowej (ALT).⁶ Dla większości osób zakażonych HBV, które są poddawane leczeniu przeciwwirusowemu, celem jest supresja DNA wirusa HBV. Ilościowe testy kwasów nukleinowych o szerokim zakresie liniowym są skutecznymi narzędziami do monitorowania wirusii DNA wirusa HBV w trakcie leczenia.

Zasady procedury

Test Aptima HBV Quant jest testem amplifikacji kwasów nukleinowych *in vitro*, który wykorzystuje technologię amplifikacji z mediacją transkrypcji (TMA) w czasie rzeczywistym w systemie Panther do ilościowego oznaczania DNA wirusa HBV, genotypów A, B, C, D, E, F, G i H. Test Aptima HBV Quant jest skierowany na dwa wysoce konserwatywne regiony w genach polimerazy i powierzchniowym (w celu zwiększenia tolerancji na potencjalne mutacje). Test jest standaryzowany do 3. międzynarodowej próbki wzorcowej WHO dla wirusa zapalenia wątroby typu B (kod NIBSC: 10/264).

Test Aptima HBV Quant można podzielić na trzy podstawowe etapy, przy czym wszystkie odbywają się w pojedynczej próbce w aparacie systemu Panther: wychwytywanie cząsteczek szukanych (target capture), amplifikacja cząsteczek szukanych metodą TMA oraz wykrywanie produktów amplifikacji (amplikonów) wyznakowanymi fluorescencyjnie sondami (typu torch).

Podczas wychwytywania cząsteczek szukanych z próbek izolowany jest DNA wirusa. Próbka jest poddawana działaniu detergentu w celu solubilizacji otoczki wirusowej, denaturacji białek i uwolnienia genomowego DNA wirusa. Oligonukleotydy wychytujące hybrydują do wysoce konserwatywnych regionów DNA wirusa HBV, jeśli są one obecne w badanej próbce. Po hybrydyzacji cząsteczka szukana jest wychwytywana przez mikrocząsteczki magnetyczne, które następnie są oddzielane od próbki w polu magnetycznym. W celu usunięcia zbędnych składników z próbki reakcyjnej wykonywane są etapy płukania.

Amplifikacja cząsteczek szukanych jest wykonywana metodą TMA. Jest to metoda amplifikacji kwasów nukleinowych z mediacją transkrypcji, w której wykorzystywane są dwa enzymy — odwrotna transkryptaza wirusa białaczki mysiej Moloneya (Moloney murine leukemia virus, MMLV) oraz polimeraza RNA bakteriofaga T7. Odwrotna transkryptaza jest wykorzystywana do produkcji kopii DNA (zawierającej sekwencję promotora dla polimerazy RNA bakteriofaga T7) sekwencji szukanej. Polimeraza RNA bakteriofaga T7 produkuje liczne kopie amplikonu RNA na podstawie matrycy kopii DNA. Test Aptima HBV Quant wykorzystuje metodę TMA do amplifikacji dwóch regionów genomu HBV (gen polimerazy i gen powierzchniowy). Amplifikacja tych regionów jest osiągana przy użyciu specyficznych starterów zaprojektowanych do amplifikacji genotypów A, B, C, D, E, F, G i H wirusa HBV. Podwójne podejście do regionu szukanego wraz z projektowaniem starterów ukierunkowanych na wysoce konserwatywne regiony zapewni dokładną kwantyfikację DNA HBV.

Wykrywanie następuje dzięki zastosowaniu sond (typu torch) jednoniciowego kwasu nukleinowego, które są obecne w czasie amplifikacji cząstki docelowej i ulegają swoistej hybrydyzacji z amplikonem w czasie rzeczywistym. Każda sonda typu torch składa się z fluoroforu i wygaszacza. Gdy sonda typu torch nie hybryduje do amplikonu, wygaszacz znajduje się w pobliżu fluoroforu i tłumi fluorescencję. Gdy sonda wiąże się z amplikonem, wygaszacz jest odsuwany dalej od fluoroforu i po wzbudzeniu przez źródło światła emituje sygnał o swoistej długości fali. Gdy więcej sond typu torch hybryduje do amplikonu, generowany jest wyższy sygnał fluorescencyjny. Czas potrzebny do osiągnięcia przez sygnał fluorescencyjny określonego progu jest proporcjonalny do wyjściowego stężenia wirusa HBV. Każda reakcja ma wewnętrzny kalibrator / kontrolę wewnętrzną (IC), która kontroluje zmiany w przetwarzaniu próbki, amplifikacji i wykrywaniu. Stężenie próbki jest określone przez oprogramowanie Panther System przy użyciu sygnałów wirusa HBV i IC dla każdej reakcji i porównanie ich z informacjami o kalibracji.

Podsumowanie dotyczące bezpieczeństwa i skuteczności

Podsumowanie dotyczące bezpieczeństwa i skuteczności klinicznej (Summary of Safety and Performance, SSP) jest dostępne w europejskiej bazie danych wyrobów medycznych (Eudamed), gdzie jest powiązane z identyfikatorami wyrobów (Basic UDI-DI). W celu zlokalizowania SSP testu Aptima HBV Quant należy użyć podstawowego unikalnego identyfikatora wyrobu (Basic Unique Device Identifier, BUDI): 54200455DIAGAPTHBVAF.

Ostrzeżenia i środki ostrożności

- A. Do zastosowania w diagnostyce *in vitro*.
- B. Do użycia przez profesjonalistów.
- C. Aby zmniejszyć ryzyko uzyskania nieważnych wyników, przed wykonaniem tego testu należy uważnie przeczytać całą ulotkę załączoną do opakowania oraz *Instrukcję obsługi systemu Panther/Panther Fusion™*.
- D. Odczynnik wzmocnienia cząstek szukanych (TER) ma działanie żrące. Patrz karta charakterystyki substancji na końcu tej sekcji.

Kwestie związane z laboratorium

- E. PRZESTROGA: Kontrole dla tego testu zawierają ludzkie osocze. Osocze jest niereaktywne w kierunku antygeny powierzchniowego zapalenia wątroby typu B (HBsAg), przeciwciał HCV, przeciwciał HIV-1 i HIV-2 oraz antygeny HIV podczas testowania zgodnie z procedurami zatwierdzonymi przez US Food and Drug Administration. Ponadto, osocze jest niereaktywne dla DNA wirusa HBV, RNA wirusa HCV i RNA wirusa HIV-1 podczas testowania licencjonowanymi testami kwasów nukleinowych. Wszystkie materiały pochodzące z krwi ludzkiej powinny być uważane za potencjalnie zakaźne i powinny być traktowane z zastosowaniem uniwersalnych środków ostrożności.^{7,8,9}
- F. Procedurę tę powinien wykonywać wyłącznie personel odpowiednio przeszkolony w zakresie stosowania testu Aptima HBV Quant oraz postępowania z materiałami potencjalnie zakaźnymi. Jeśli dojdzie do rozlania, natychmiast zdezynfekować zgodnie z odpowiednimi procedurami w miejscu pracy.
- G. Stosować wyłącznie dostarczone lub określone jednorazowe wyposażenie laboratoryjne.
- H. Przestrzegać rutynowych środków ostrożności stosowanych w laboratorium. Nie pipetować ustami. Nie jeść, nie pić i nie palić w wyznaczonych obszarach pracy. W czasie pracy z próbkami i odczynnikami zestawu nosić jednorazowe rękawiczki bezpydrowe, osłonę oczu oraz odzież laboratoryjną. Dokładnie umyć ręce po pracy z próbkami i odczynnikami zestawu.
- I. Powierzchnie robocze, pipety i inne wyposażenie należy regularnie odkażać, stosując roztwór podchlorynu sodu w stężeniu od 2,5% do 3,5% (od 0,35 M do 0,5 M).
- J. Wszelkie materiały, które stykały się z próbkami i odczynnikami należy zutylizować zgodnie z przepisami miejscowymi, krajowymi i federalnymi.^{7,8,9,10} Należy dokładnie wyczyścić i zdezynfekować wszystkie powierzchnie robocze.
- K. Kontrole zawierają azydek sodu jako środek konserwujący. Nie należy używać metalowych przewodów rurowych do przenoszenia odczynników. Jeżeli roztwory zawierające związki azydku sodu są usuwane do instalacji wodociągowej, należy je rozcieńczyć i spłukać dużą ilością bieżącej wody. Te środki ostrożności są zalecane w celu uniknięcia gromadzenia się osadów w metalowych przewodach rurowych, w których mogłyby powstać warunki wybuchowe.

- L. Dobre standardowe praktyki dla laboratoriów molekularnych obejmują monitorowanie środowiska. Aby monitorować środowisko laboratorium, sugeruje się następującą procedurę:
1. Przygotować wymazówkę z końcówką bawełnianą i dołączyć do probówki do porcjowania próbek Aptima (SAT).
 2. Odpowiednio oznakować każdą probówkę SAT.
 3. Napełnić każdą SAT 1 mL rozcieńczalnika do próbek Aptima.
 4. Aby pobrać próbki powierzchniowe, należy lekko zwilżyć wymazówkę wolną od nukleaz dejonizowaną wodą.
 5. Wymazać wybraną powierzchnię, wykonując pionowe ruchy z góry na dół. Obrócić wymazówkę o około pół obrotu podczas wymazywania miejsca.
 6. Natychmiast umieścić próbkę wymazu w probówce i delikatnie odwirować wymazówkę w rozcieńczalniku w celu wyodrębnienia potencjalnych materiałów wymazowych. Przycisnąć wymazówkę do boku probówki transportowej, aby wydobyć jak najwięcej płynu. Wyrzucić wymazówkę i zakręcić probówkę.
 7. Powtórzyć czynności dla pozostałych próbek wymazu.
 8. Zbadać wymaz przy pomocy testu molekularnego.

Kwestie dotyczące próbek




- M. Próbki mogą być zakaźne. W czasie wykonywania tego testu przestrzegać uniwersalnych środków ostrożności^{7,8,9}. Właściwą pracę oraz metody usuwania należy określić na podstawie lokalnych przepisów.¹⁰ Test ten powinien wykonywać jedynie personel odpowiednio przeszkolony z zakresu testu Aptima HBV Quant oraz z zakresu pracy z materiałem zakaźnym.
- N. Podczas transportu próbek należy utrzymywać właściwe warunki przechowywania, aby zapewnić integralność próbek. Nie oceniono stabilności próbek w warunkach transportu innych niż zalecane.
- O. Nie dopuszczać do zanieczyszczenia krzyżowego podczas etapów pracy z próbkami. Zachować szczególną ostrożność, aby uniknąć skażenia poprzez rozprzestrzenienie się aerozolu w czasie odkręcania lub zdejmowania zakrętek z próbek. W próbkach może występować niezwykle wysokie stężenie mikroorganizmów. Dopilnować, aby pojemniki na preparaty nie dotykały się wzajemnie ze sobą i wyrzucać zużyte materiały tak, aby nie przenosić ich nad otwartymi pojemnikami. Zmienić rękawiczki, jeżeli miały kontakt z próbką.




Kwestie dotyczące testu

- P. Nie używać zestawu odczynników, kalibratora lub kontroli po upływie ich terminu ważności.
- Q. Nie wymieniać, nie mieszać ani nie łączyć odczynników analitycznych pochodzących z zestawów o różnych numerach partii głównej. Płyny do testu mogą pochodzić z partii o różnych numerach. Kontrole i kalibrator mogą pochodzić z partii o różnych numerach.
- R. Unikać skażenia odczynników przez drobnoustroje i nukleazy.
- S. Wszystkie odczynniki analityczne należy przechowywać zamknięte i w określonych temperaturach. W przypadku zastosowania odczynników analitycznych przechowywanych w niewłaściwych warunkach charakterystyka testu może być zmieniona. Zobacz *Wymagania dotyczące przechowywania odczynników i postępowania z nimi* oraz *Procedura testu w systemie Panther System*, aby uzyskać więcej informacji.

- T. Nie łączyć odczynników analitycznych ani płynów bez konkretnej instrukcji. Nie wolno dopełniać butelek z odczynnikami lub płynami. System Panther weryfikuje poziomy odczynników.
- U. Unikać kontaktu TER ze skórą, oczami i błonami śluzowymi. W przypadku zetknięcia z tym odczynnikiem przemyć miejsce kontaktu wodą. Jeśli dojdzie do rozlania tego odczynnika, należy rozcieńczyć go wodą i postępować zgodnie z odpowiednimi lokalnie obowiązującymi procedurami.
- V. Niektóre odczynniki w tym zestawie są opatrzone informacjami o zagrożeniach.

Uwaga: Stosowane informacje dotyczące zagrożeń są określone przez klasyfikacje kart charakterystyki substancji (Safety Data Sheets, SDS) obowiązujące w UE. Informacje dotyczące zagrożeń występujących w konkretnym regionie opisano w kartach SDS właściwych dla regionów. Dokumenty te znajdują się w bibliotece kart charakterystyki pod adresem www.hologic.com. Aby uzyskać dodatkowe informacje dotyczące symboli, należy zapoznać się z legendą symboli po adresem <https://www.hologic.com/package-inserts>.

Informacje dotyczące zagrożeń – Ameryka Północna	
	<p>Kontrole z zestawu HBV VL <i>Surowica ludzka / ludzkie osocze 95–100%</i> <i>Azydek sodu < 1%</i></p> <p>— —</p>
 	<p>Odczynnik do wzmacniania cząstek szukanych <i>Lithium Hydroxide, Monohydrate 5–10%</i></p> <p>— —</p> <p>NIEBEZPIECZEŃSTWO H302 – Działa szkodliwie po połknięciu H314 – Powoduje poważne oparzenia skóry oraz uszkodzenia oczu P264 – Dokładnie umyć twarz, ręce i wszelkie narażone powierzchnie skóry po użyciu P270 – Nie jeść, nie pić ani nie palić podczas używania produktu P330 – Wypłukać usta P501 – Zawartość/pojemnik usuwać do zatwierzonego zakładu utylizacji odpadów P260 – Nie wdychać pyłu/dymu/gazu/mgły/par/rozpylonej cieczy. P280 – Stosować rękawice ochronne / odzież ochronną / ochronę oczu / ochronę twarzy P301 + P330 + P331 – W PRZYPADKU POŁKNIĘCIA: wypłukać usta. NIE wywoływać wymiotów. P303 + P361 + P353 – W PRZYPADKU KONTAKTU ZE SKÓRĄ (lub z włosami): Natychmiast zdjąć całą zanieczyszczoną odzież. Spłukać skórę pod strumieniem wody [lub prysznicem]. P304 + P340 – W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO DRÓG ODDECHOWYCH: Wyprowadzić lub wynieść poszkodowanego na świeże powietrze i zapewnić mu warunki do swobodnego oddychania P305 + P351 + P338 – W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO OCZU: Ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać P321 – Zastosować określone leczenie (patrz dodatkowa instrukcja w zakresie pierwszej pomocy na etykiecie). P363 – Wyprać zanieczyszczoną odzież przed ponownym użyciem P405 – Przechowywać pod zamknięciem P301 + P317 – W PRZYPADKU POŁKNIĘCIA: Uzyskać pomoc medyczną P316 – Natychmiast uzyskać pomoc medyczną</p>
Informacje o zagrożeniach zgodne z wymogami UE	
—	<p>Odczynnik do amplifikacji <i>Magnesium Chloride 60–65%</i></p> <p>—</p> <p>H412 – Działa szkodliwie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki. P273 – Unikać uwolnienia do środowiska. P501 – Zawartość/pojemnik usuwać do zatwierzonego zakładu utylizacji odpadów.</p>
—	<p>Odczynnik enzymatyczny <i>HEPES 1–5%</i> <i>Triton X-100 1–5%</i></p> <p>—</p> <p>H412 – Działa szkodliwie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki. P273 – Unikać uwolnienia do środowiska. P501 – Zawartość/pojemnik usuwać do zatwierzonego zakładu utylizacji odpadów.</p>

<p>—</p> <p>—</p>	<p>Roztwór do przygotowania odczynnika enzymatycznego <i>Glicerol 20–25%</i> <i>Triton X-100 5–10%</i> <i>HEPES 1–5%</i></p> <p>—</p> <p>H412 – Działa szkodliwie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki. P273 – Unikać uwolnienia do środowiska. P501 – Zawartość/pojemnik usuwać do zatwierzonego zakładu utylizacji odpadów.</p>
<p>—</p> <p>—</p>	<p>Odczynnik promotora <i>Magnesium Chloride 60–65%</i></p> <p>—</p> <p>H412 – Działa szkodliwie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki. P273 – Unikać uwolnienia do środowiska. P501 – Zawartość/pojemnik usuwać do zatwierzonego zakładu utylizacji odpadów.</p>
<p>—</p> <p>—</p>	<p>Odczynnik do wychwytywania docelowych cząsteczek <i>HEPES 15–20%</i> <i>Lauryl Sulfate Lithium Salt 5-10%</i> <i>Succinic Acid 1-5%</i> <i>Lithium Hydroxide, Monohydrate 1-5%</i></p> <p>—</p> <p>H412 – Działa szkodliwie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki. P273 – Unikać uwolnienia do środowiska. P501 – Zawartość/pojemnik usuwać do zatwierzonego zakładu utylizacji odpadów.</p>
<p>—</p> <p>—</p>	<p>Kalibratory z zestawu HBV VL <i>HEPES 15–20%</i> <i>Lauryl Sulfate Lithium Salt 5-10%</i> <i>Succinic Acid 1-5%</i> <i>Lithium Hydroxide, Monohydrate 1-5%</i></p> <p>—</p> <p>H412 – Działa szkodliwie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki P273 – Unikać uwolnienia do środowiska. P501 – Zawartość/pojemnik usuwać do zatwierzonego zakładu utylizacji odpadów.</p>
<p></p> <p></p> <p></p>	<p>Kontrole z zestawu HBV VL <i>Surowica ludzka / ludzkie osocze 95–100%</i> <i>Azydek sodu < 1%</i></p> <p>—</p> <p>NIEBEZPIECZEŃSTWO H300 – Połknięcie grozi śmiercią. H410 – Działa bardzo toksycznie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki. P264 – Dokładnie umyć twarz, ręce i wszelkie narażone powierzchnie skóry po użyciu. P273 – Unikać uwolnienia do środowiska. P301 + P310 – W PRZYPADKU POŁKNIĘCIA: Natychmiast skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUĆ lub z lekarzem. P321 – Zastosować określone leczenie (patrz dodatkowa instrukcja w zakresie pierwszej pomocy na etykiecie). P330 – Wypłukać usta. P391 – Zebrać wyciek</p>

Odczynnik do wzmacniania cząstek szukanych*Lithium Hydroxide, Monohydrate 5–10%***NIEBEZPIECZEŃSTWO**

H302 – Działa szkodliwie po połknięciu.

H314 – Powoduje poważne oparzenia skóry oraz uszkodzenia oczu.

P264 – Dokładnie umyć twarz, ręce i każdą odsłoniętą powierzchnię skóry po użyciu.

P270 – Nie jeść, nie pić ani nie palić podczas używania produktu.

P330 – Wypłukać usta.

P501 – Zawartość/pojemnik usuwać do zatwierdzonego zakładu utylizacji odpadów.

P260 – Nie wdychać pyłu/dymu/gazu/mgły/par/rozpylonej cieczy.

P280 – Stosować rękawice ochronne / odzież ochronną / ochronę oczu / ochronę twarzy.

P301 + P330 + P331 – W PRZYPADKU POŁKNIECIA: Wypłukać usta. NIE wywoływać wymiotów.

P303 + P361 + P353 – W PRZYPADKU KONTAKTU ZE SKÓRĄ (lub z włosami): Natychmiast zdjąć całą zanieczyszczoną odzież. Splukać skórę pod strumieniem wody [lub prysznicem].

P304 + P340 – W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO DRÓG ODDECHOWYCH: Wyprowadzić lub wynieść poszkodowanego na świeże powietrze i zapewnić mu warunki do swobodnego oddychania.

P305 + P351 + P338 – W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO OCZU: Ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać.

P310 – Natychmiast skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUĆ lub lekarzem.

P321 – Zastosować określone leczenie (patrz dodatkowa instrukcja w zakresie pierwszej pomocy na etykiecie).

P363 – Wyprać zanieczyszczoną odzież przed ponownym użyciem.

P405 – Przechowywać pod zamknięciem.



Wymagania dotyczące przechowywania odczynników i postępowania z nimi

- A. W poniższej tabeli przedstawiono warunki przechowywania i stabilność odczynników, kontroli i kalibratora.

Odczynnik	Przechowywanie nieotwartych odczynników	Zestaw po otwarciu (po przygotowaniu odczynników)	
		Przechowywanie	Stabilność
Odczynnik do amplifikacji qHBV	2 °C do 8 °C		
Roztwór do przygotowania amplifikacji qHBV	2 °C do 8 °C	2 °C do 8 °C	30 dni ^a
Odczynnik enzymatyczny qHBV	2 °C do 8 °C		
Roztwór do przygotowania enzymów qHBV	2 °C do 8 °C	2 °C do 8 °C	30 dni ^a
Odczynnik promotora qHBV	2 °C do 8 °C		
Roztwór do przygotowania promotora qHBV	2 °C do 8 °C	2 °C do 8 °C	30 dni ^a
Odczynnik do wychwytywania cząsteczek szukanych qHBV	2 °C do 8 °C	2 °C do 8 °C	30 dni ^a
PCAL (kalibrator dodatni) qHBV	-15 °C do -35 °C	15 °C do 30 °C	Fiolka jednorazowego użytku Zużyć w ciągu 24 godzin
NC CONTROL – (kontrola ujemna) qHBV	-15 °C do -35 °C	15 °C do 30 °C	Fiolka jednorazowego użytku Zużyć w ciągu 24 godzin
LPC CONTROL + (kontrola niskododatnia) qHBV	-15 °C do -35 °C	15 °C do 30 °C	Fiolka jednorazowego użytku Zużyć w ciągu 24 godzin
HPC CONTROL + (kontrola wysokodatnia) qHBV	-15 °C do -35 °C	15 °C do 30 °C	Fiolka jednorazowego użytku Zużyć w ciągu 24 godzin
Odczynnik wzmocnienia cząsteczek szukanych qHBV	15 °C do 30 °C	15 °C do 30 °C	30 dni ^a

^a Po wyjęciu odczynników z systemu Panther należy je niezwłocznie przenieść do miejsca o odpowiedniej temperaturze przechowywania.

- B. Wyrzucić nieużyte pozostałości odczynników po przygotowaniu, odczynnika do wychwytywania cząsteczek szukanych (TCR) oraz odczynnika wzmocnienia cząstek szukanych (TER) po 30 dniach lub po upływie daty ważności serii głównej, w zależności od tego, co nastąpi wcześniej.
- C. Odczynniki przechowywane w systemie Panther charakteryzują się stabilnością wewnętrzną wynoszącą 72 godziny. Odczynniki można ładować do systemu Panther do 8 razy. System Panther rejestruje każde załadowanie odczynników.
- D. Po rozmrożeniu kalibratora roztwór musi być klarowny, tzn. nie może być mętny ani nie mogą się w nim wytrącać osady. Upewnić się, że osady są rozpuszczone. Nie należy używać kalibratora, w przypadku obecności żelu, osadu lub zmętnienia.
- E. Odczynnik promotora i przygotowany odczynnik promotora są wrażliwe na światło. Te odczynniki należy chronić przed światłem w trakcie przechowywania i przygotowania do stosowania.

- F. Odczynnik wzmocnienia cząstek szukanych qHBV należy przechowywać przed użyciem w temperaturze od 15 °C do 30 °C.

Pobieranie i przechowywanie próbek

Uwaga: Z wszystkimi próbkami należy obchodzić się tak, jak gdyby zawierały czynniki potencjalnie zakaźne. Przestrzegać uniwersalnych środków ostrożności.

Uwaga: Należy dopilnować, aby w czasie etapów pracy z próbkami unikać zanieczyszczenia krzyżowego. Należy na przykład wyrzucać zużyty materiał bez przemieszczania go nad otwartymi probówkami.

Uwaga: Do przechowywania zalecane są wyłącznie plastikowe probówki wtórne.

Można użyć próbek krwi pełnej zebranych w poniższych szklanych lub plastikowych probówkach:

- Probówki zawierające kwas etylenodiaminotetraoctowy (EDTA) lub antykoagulant cytrynianu dekstrozy (ACD)
- Probówki do przygotowania osocza
- Probówki z surowicą
- Probówki do separacji surowicy

W przypadku surowicy, należy pozwolić na utworzenie się skrzepu przed dalszą obróbką.

A. Pobieranie próbek

Krew pełna może być przechowywana w temperaturze od 2 °C do 30 °C przez okres do 24 godzin, przy czym osocze musi być oddzielone przez odwirowanie w pierwotnej probówce przed przetwarzaniem. Oddzielić osocze lub surowicę od krwinek czerwonych, postępując zgodnie z instrukcjami producenta używanej probówki. Osocze lub surowica mogą być badane w systemie Panther w probówce pierwotnej lub przeniesione do probówki dodatkowej, takiej jak probówka do porcjowania próbek Aptima®. Aby uzyskać objętość reakcji 500 µL, minimalna objętość osocza lub surowicy w pierwotnych probówkach do pobierania próbek wynosi do 1200 µL, a w przypadku probówek dodatkowych minimalna objętość wynosi 700 µL. W poniższej tabeli określono wymagania dotyczące objętości martwej dla każdego typu probówki głównej i dodatkowej.

Probówka (rozmiar i typ)	Objętość martwa w systemie Panther
Probówka do porcjowania próbek Aptima (SAT)	0,2 mL
12x75 mm	0,5 mL
13x100 mm	0,5 mL
13x100 mm z żelem	0,3 mL
16x100 mm z żelem	0,7 mL

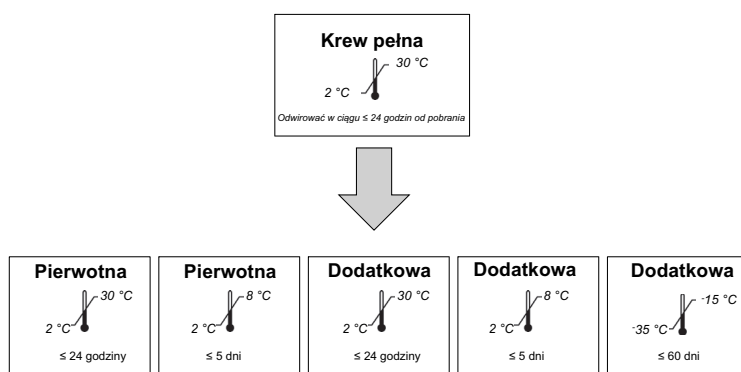
Jeżeli nie są testowane natychmiast, osocze i surowica mogą być przechowywane zgodnie z poniższymi specyfikacjami. Po przeniesieniu do SAT lub probówki dodatkowej, osocze lub surowicę można zamrozić w temperaturze -20 °C. Nie należy przekraczać 3 cykli zamrażania i rozmrażania. Nie zamrażać próbek w roztworach EDTA, ACD lub w pierwotnych probówkach do pobierania surowicy.

B. Warunki przechowywania próbek

1. Próbkę osocza w EDTA i ACD

Krew pełna może być przechowywana w temperaturze od 2 °C do 30 °C i musi być odwirowana w ciągu 24 godzin od pobrania próbki. Osocze można następnie przechowywać w jednym z następujących warunków:

- W pierwotnej lub dodatkowej probówce do pobierania w temperaturze od 2 °C do 30 °C przez okres do 24 godzin,
- W pierwotnej lub dodatkowej probówce do pobierania w temperaturze od 2 °C do 8 °C przez okres do 5 dni, lub
- W probówce dodatkowej w temperaturze -20 °C do 60 dni.

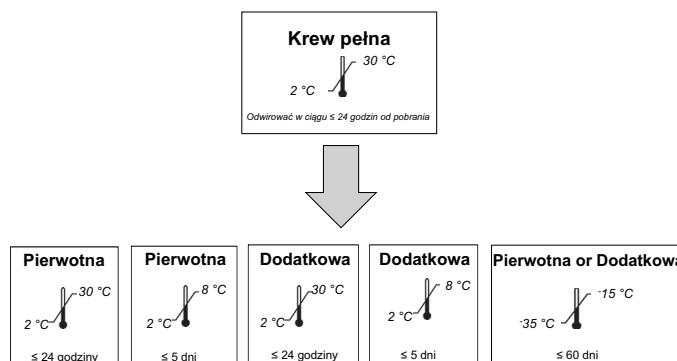


Rysunek 1. Warunki przechowywania próbek z EDTA/ACD

2. Próbkę w probówkach PPT

Krew pełna może być przechowywana w temperaturze od 2 °C do 30 °C i musi być odwirowana w ciągu 24 godzin od pobrania próbki. Osocze można następnie przechowywać w jednym z następujących warunków:

- W probówce PPT lub dodatkowej w temperaturze od 2 °C do 30 °C przez okres do 24 godzin,
- W probówce PPT lub dodatkowej w temperaturze od 2 °C do 8 °C przez okres do 5 dni, lub
- W probówce PPT lub dodatkowej w temperaturze -20 °C przez okres do 60 dni.

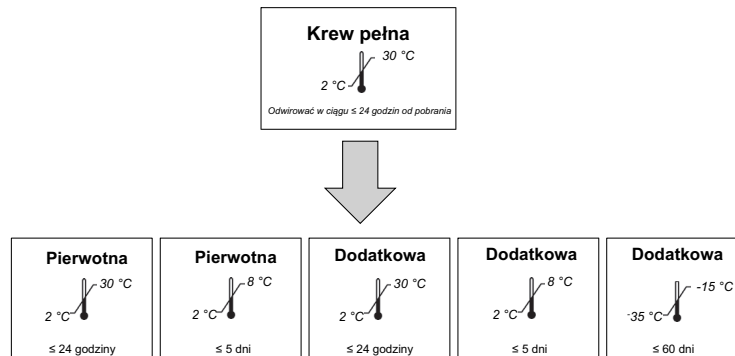


Rysunek 2. Warunki przechowywania dla próbek PPT

3. Próbkę w probówkach z surowicą

Krew pełna może być przechowywana w temperaturze od 2 °C do 30 °C i musi być odwirowana w ciągu 24 godzin od pobrania próbki. Surowicę można następnie przechowywać w jednym z następujących warunków:

- W probówce na surowicę lub dodatkowej w temperaturze od 2 °C do 30 °C przez okres do 24 godzin,
- W probówce na surowicę lub dodatkowej w temperaturze od 2 °C do 8 °C przez okres do 5 dni, lub
- W probówce dodatkowej w temperaturze -20 °C do 60 dni.

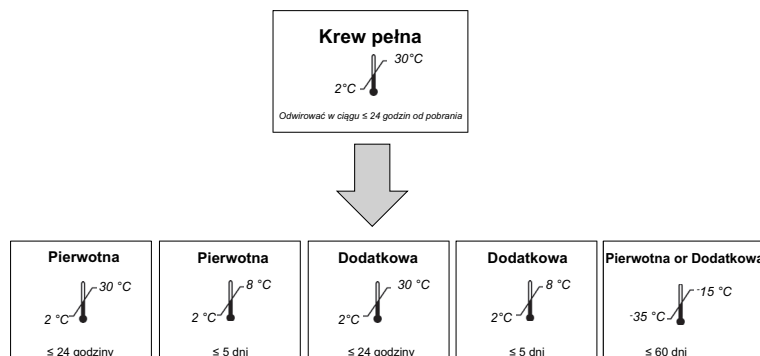


Rysunek 3. Warunki przechowywania próbek z surowicą

4. Próbkę w probówkach SST

Krew pełna może być przechowywana w temperaturze od 2 °C do 30 °C i musi być odwirowana w ciągu 24 godzin od pobrania próbki. Surowicę można następnie przechowywać w jednym z następujących warunków:

- W probówce SST lub dodatkowej w temperaturze od 2 °C do 30 °C przez okres do 24 godzin,
- W probówce SST lub dodatkowej w temperaturze od 2 °C do 8 °C przez okres do 5 dni, lub
- W probówce SST lub dodatkowej w temperaturze -20 °C przez okres do 60 dni.



Rysunek 4. Warunki przechowywania dla próbek SST

C. Przechowywanie długotrwałe w zamrożeniu

Próbki osocza lub surowicy można przechowywać w temperaturze -70 °C przez okres do 60 dni w probówkach SAT.

D. Rozcieńczanie próbek osocza i surowicy

Próbki osocza i surowicy można rozcieńczać w probówce SAT lub dodatkowej w celu wykonania testu w systemie Panther. Patrz *Procedura testu w systemie Panther System*, etap E.5 poniżej, aby uzyskać więcej informacji.

Uwaga: *Jeżeli próbka zostanie rozcieńczona, powinna być badana natychmiast po rozcieńczeniu. Nie należy zamrażać rozcieńczonej próbki.*

Próbki w systemie Panther

Próbki można pozostawiać w systemie Panther bez zamknięcia na okres do 8 godzin. Próbki można wyjąć z systemu Panther i poddać badaniu, o ile całkowity czas przebywania w systemie nie przekracza 8 godzin przed pipetowaniem próbki przez system Panther.

Transport próbek

Zachować warunki przechowywania próbek zgodnie z opisem w sekcji *Pobieranie i przechowywanie próbek*.

Uwaga: *Próbki należy przysyłać zgodnie z odpowiednimi krajowymi, międzynarodowymi i regionalnymi przepisami transportowymi.*

System Panther

Odczynniki do testu Aptima HBV Quant dla systemu Panther zostały wymienione poniżej. Obok nazwy odczynnika wymieniono także symbole identyfikujące odczynniki.

Dostarczone odczynniki i materiały

Zestaw testów Aptima HBV Quant, 100 testów (nr kat. PRD-03424) (1 pudełko z testami, 1 zestaw kalibratorów, 1 zestaw kontroli oraz 1 pudełko z odczynnikiem wzmocnienia cząstek szukanych)

Dodatkowe kalibratory i kontrole można zamówić oddzielnie. Poniżej przedstawiono poszczególne numery katalogowe.

Pudełko z testami Aptima HBV Quant (po odbiorze przechowywać w temperaturze od 2 °C do 8 °C)		
Symbol	Komponent	Ilość
A	Odczynnik do amplifikacji qHBV <i>Liofilizowane, niezakaźne kwasy nukleinowe w roztworze buforowanym.</i>	1 fiolka
E	Odczynnik enzymatyczny qHBV <i>Liofilizowana odwrotna transkryptaza i polimeraza RNA w buforze HEPES.</i>	1 fiolka
PRO	Odczynnik promotora qHBV <i>Liofilizowane, niezakaźne kwasy nukleinowe w roztworze buforowanym.</i>	1 fiolka
AR	Roztwór do przygotowania amplifikacji qHBV <i>Wodny roztwór zawierający glicerol i środki konserwujące.</i>	1 x 7,2 mL
ER	Roztwór do przygotowania enzymów qHBV <i>Roztwór buforowany HEPES zawierający środek powierzchniowo czynny i glicerol.</i>	1 x 5,8 mL
PROR	Roztwór do przygotowania promotora qHBV <i>Wodny roztwór zawierający glicerol i środki konserwujące.</i>	1 x 4,5 mL
TCR	Odczynnik do wychwytywania cząsteczek szukanych qHBV <i>Kwasy nukleinowe w buforowanym roztworze soli z fazą stałą, niezakaźne kwasy nukleinowe oraz kalibrator wewnętrzny.</i>	1 x 72,0 mL
	Kołnierze do przygotowania odczynników	3
	Karta z kodami kreskowymi serii głównych	1 karta

Zestaw kalibratorów Aptima HBV Quant(nr kat. PRD-03425)
(po odbiorze przechowywać w temperaturze od -15 °C do -35 °C)

Symbol	Komponent	Ilość
PCAL	Kalibrator dodatni qHBV <i>Plazmidowe DNA w roztworze buforowanym</i>	5 x 2,5 mL
	Etykieta z kodem kreskowym kalibratora	—

Zestaw kontroli Aptima HBV Quant(nr kat. PRD-03426)
(po odbiorze przechowywać w temperaturze od -15 °C do -35 °C)

Symbol	Komponent	Ilość
NC	Kontrola ujemna qHBV <i>HBV-ujemne defibrynowane osocze ludzkie zawierające gentamycynę i 0,2% azydku sodu jako środki konserwujące.</i>	5 x 0,8 mL
LPC	Kontrola niskodatnia qHBV <i>Metabolizowane osocze HBV-dodatnie w defibrynowanym osoczu ludzkim zawierającym gentamycynę i 0,2% azydku sodu jako środki konserwujące.</i>	5 x 0,8 mL
HPC	Kontrola wysokodatnia qHBV <i>Metabolizowane osocze HBV-dodatnie w defibrynowanym osoczu ludzkim zawierającym gentamycynę i 0,2% azydku sodu jako środki konserwujące.</i>	5 x 0,8 mL
	Etykieta z kodem kreskowym kontroli	—

Pudełko z odczynnikami wzmocnienia cząstek szukanych Aptima HBV Quant
(po odbiorze przechowywać w temperaturze od 15 °C do 30 °C)

Symbol	Komponent	Ilość
TER	Odczynnik wzmocnienia cząsteczek szukanych qHBV <i>Stężony roztwór wodorotlenku litu</i>	1 x 46,0 mL

Materiały wymagane, ale dostępne osobno

Uwaga: Materiały o podanych numerach katalogowych są dostępne w firmie Hologic, o ile nie określono inaczej.

Materiał	Nr kat.
Panther™ System	303095
Panther Fusion™ System	PRD-04172
Panther™ System Continuous Fluid and Waste (Panther Plus)	PRD-06067
Zestaw kalibratorów Aptima® HBV Quant	PRD-03425
Zestaw kontroli Aptima® HBV Quant	PRD-03426
Zestaw Panther Run Kit for Real Time Assays do testów w czasie rzeczywistym (tylko do testów w czasie rzeczywistym)	PRD-03455 (5000 testów)
Zestaw płynów do testu Aptima® (znany także jako zestaw uniwersalnych płynów) <i>zawiera roztwór do płukania Aptima®, bufor do płynu dezaktywującego Aptima® oraz odczynnik olejowy Aptima®</i>	303014 (1000 testów)
Zestawy wieloprobówkowe (MTU)	104772-02
Zestaw worka na odpady Panther™	902731
Ostona pojemnika na odpady Panther™	504405

Material	Nr kat.
Albo zestaw wstępny do systemu Panther™ <i>(w przypadku wykonywania testów TMA nie w czasie rzeczywistym równoległe z testami TMA w czasie rzeczywistym)</i> zawiera MTU, torby na odpady, osłony pojemników na odpady, płyny Auto Detect i płyny do testu	303096 (5000 testów)
Końcówki, 1000 µL, przewodzące, z detekcją cieczy	901121 (10612513 Tecan) 903031 (10612513 Tecan)
<i>Nie wszystkie produkty są dostępne we wszystkich regionach. W celu uzyskania informacji na temat dostępności produktu w wybranym regionie należy skontaktować się z odpowiednim przedstawicielem.</i>	MME-04134 (30180117 Tecan) MME-04128
Roztwór podchlorynu sodu (wybielacz) w stężeniu od 5% do 8,25% (od 0,7 M do 1,16 M)	—
Rękawiczki jednorazowe, bezpudrowe	—
Zapasowe nakrętki nieprzebijalne	103036A
Zakrętki zamienne na odczytniki <i>Butelki do przygotowania odczynników do amplifikacji, enzymatycznego i promotora</i> <i>Butelka TCR</i> <i>Butelka TER</i>	CL0041 (100 zakrętek) CL0040 (100 zakrętek) 501604 (100 zakrętek)
Wzmocnione plastikiem osłony stołu laboratoryjnego	—
Niestrzępiące się ściereczki	—
Pipetor	—
Końcówki	—
Opcje pierwotnej probówki do pobierania próbek: <i>13 mm x 100 mm</i> <i>13 mm x 75 mm</i> <i>16 mm x 100 mm</i>	— — —
Wirówka	—
Wstrząsarka	—

Materialy opcjonalne

Material	Nr kat.
Probówki dodatkowe w opcjach: <i>12 mm x 75 mm</i> <i>13 mm x 100 mm</i> <i>16 mm x 100 mm</i> <i>Probówki do porcjowania próbek (SAT) Aptima® (opakowanie 100 szt.)</i>	— — — FAB-18184
Zakrętki probówek transportowych (opakowanie 100 szt.) <i>zakrętki do probówek SAT</i>	504415
Rozcieńczalnik do próbek Aptima®	PRD-03003
Zestaw rozcieńczalnika do próbek Aptima® <i>zawiera rozcieńczalnik do próbek, 100 SAT i 100 zakrętek</i>	PRD-03478
Pipety transportowe	—
Wymazówki z bawełnianą końcówką	—
Kołyska do probówek	PRD-03488

Procedura testu w systemie Panther System

Uwaga: Dodatkowe informacje o procedurze znajdują się w Panther/Panther Fusion System Operator's Manual (Instrukcji obsługi systemu Panther/Panther Fusion).

A. Przygotowanie obszaru roboczego

1. Oczyszczyć powierzchnie robocze, na których będą przygotowywane odczynniki. Przetrzeć powierzchnie robocze roztworem podchlorynu sodu w stężeniu od 2,5% do 3,5% (od 0,35 M do 0,5 M). Roztwór podchlorynu sodu powinien mieć kontakt z powierzchniami przez co najmniej 1 minutę, a następnie należy je spłukać wodą dejonizowaną (DI). Nie wolno dopuszczać do wyschnięcia roztworu podchlorynu sodu. Zakryć powierzchnię stołu czystymi, wzmocnionymi plastikiem, chłonnymi osłonami stołu laboratoryjnego.
2. Oczyszczyć odrębną powierzchnię roboczą jako miejsce do przygotowania próbek. Postępować zgodnie z procedurą opisaną powyżej (etap A.1).
3. Wyczyścić wszystkie pipetory. Postępować zgodnie z procedurą czyszczenia opisaną powyżej (etap A.1).

B. Przygotowanie kalibratora i kontroli

Przed przystąpieniem do przetwarzania kalibrator i kontrole powinny osiągnąć temperaturę od 15 °C do 30 °C w sposób opisany poniżej:

1. Wyjąć kalibrator i kontrole z miejsca przechowywania (-15 °C do -35 °C) i umieścić w temperaturze 15 °C do 30 °C. Podczas całego procesu rozmrażania delikatnie odwracać każdą probówkę, aby dokładnie wymieszać próbki. Przed użyciem należy upewnić się, że zawartość probówki jest całkowicie rozmrożona.

Opcja. Probówki z kalibratorami i kontrolami można umieścić na kołysce do probówek w celu dokładnego wymieszania. Przed użyciem należy upewnić się, że zawartość probówki jest całkowicie rozmrożona.

Uwaga: Unikać tworzenia nadmiernej piany podczas odwracania kalibratora i kontroli. Piana negatywnie wpływa na wykrywanie poziomu przez system Panther.

2. Po rozmrożeniu zawartości probówki osuszyć jej zewnętrzną część czystą, suchą ściereczką jednorazowego użytku.
3. Aby zapobiec skażeniu, nie należy w tym momencie otwierać probówek.

C. Przygotowanie odczynników / nowego zestawu

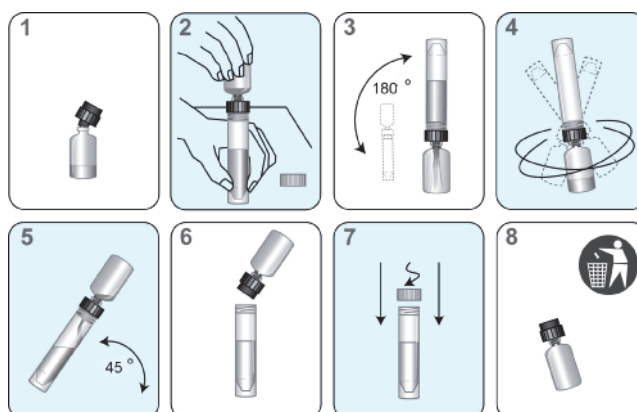
Uwaga: Przygotowanie odczynników należy przeprowadzić przed rozpoczęciem jakichkolwiek prac w systemie Panther.

1. Aby przygotować TCR, należy wykonać następujące czynności:
 - a. Wyjąć TCR z miejsca przechowywania (2 °C do 8 °C). Sprawdzić numer partii na butelce z TCR, aby upewnić się, że zgadza się on z numerem partii na Karcie kodów kreskowych głównej partii.
 - b. Natychmiast 10 razy energicznie wstrząsnąć butelką TCR. Pozostawić butelkę TCR w temperaturze od 15 °C do 30 °C do ogrzania przez co najmniej 45 minut. W tym czasie należy odwirować i odwrócić butelkę TCR co najmniej co 10 minut.

Opcja. Butelkę TCR można przygotować na wytrząsarce probówek, postępując zgodnie z poniższymi instrukcjami: Wyjąć TCR z miejsca przechowywania (2 °C do 8 °C) oraz natychmiast energicznie wstrząsnąć 10 razy. Umieścić butelkę TCR na wytrząsarce probówek i pozostawić TCR w temperaturze 15 °C do 30 °C do ogrzania przez co najmniej 45 minut.
 - c. Przed użyciem należy upewnić się, że cały osad znajduje się w roztworze, a cząstki magnetyczne są zawieszane.

2. W celu odtworzenia odczynników amplifikacji, enzymatycznych i promotorów należy wykonać następujące czynności:
 - a. Wyjąć liofilizowane odczynniki i odpowiednie roztwory do przygotowania z miejsca przechowywania (2 °C do 8 °C). Dopasować odpowiedni roztwór do każdego liofilizowanego odczynnika.
 - b. Upewnić się, że roztwór do przygotowania i liofilizowany odczynnik mają etykiety w tym samym kolorze. Sprawdzić numery partii na karcie z kodami kreskowymi serii (partii) głównych, aby upewnić się, że sparowano odpowiednie odczynniki.
 - i. Otworzyć fiolkę z liofilizowanym odczynnikiem, zdejmując metalową uszczelkę i gumowy korek.
 - ii. Mocno włożyć karbowany koniec kołnierza do przygotowania odczynników (czarnego) na fiolkę (Rysunek 5, etap 1).
 - iii. Otworzyć buteleczkę zawierającą odpowiedni roztwór do przygotowania i odłożyć zakrętkę na czystą, przykrytą powierzchnię roboczą.
 - iv. Umieścić butelkę z roztworem do przygotowania na stabilnej powierzchni (np. na stole). Następnie odwrócić fiolkę z liofilizowanym odczynnikiem nad butelką z roztworem do przygotowania i mocno przymocować kołnierz do butelki z roztworem do przygotowania (Rysunek 5, etap 2).
 - v. Powoli odwrócić połączone butelki (fiolka dołączona do butelki z roztworem), aby umożliwić spływanie roztworu do szklanej fiolki (Rysunek 5, etap 3).
 - vi. Podnieść połączone butelki i odwirować je przez co najmniej 10 sekund (Rysunek 5, etap 4).
 - vii. Odczekać co najmniej 30 minut, aby liofilizowany odczynnik przeszedł do roztworu.
 - viii. Po przejściu liofilizowanego odczynnika do roztworu odwirować połączone butelki przez co najmniej 10 sekund, a następnie lekko wstrząsać roztworem w szklanej fiolce w przód i w tył w celu dokładnego wymieszania.
 - c. Ponownie powoli przechylić połączone butelki, aby umożliwić spłynięcie całego roztworu z powrotem do butelki z roztworem do przygotowywania odczynników (Rysunek 5, etap 5).
 - d. Ostrożnie zdjąć kołnierz do przygotowywania i szklaną fiolkę (Rysunek 5, etap 6).
 - e. Nałożyć zakrętkę na butelkę. Na etykiecie wpisać inicjały operatora i datę przygotowania odczynników (Rysunek 5, etap 7).
 - f. Wyrzucić kołnierz do przygotowania odczynników i szklaną fiolkę (Rysunek 5, etap 8).

Ostrzeżenie: Unikać tworzenia nadmiernej piany podczas przygotowywania odczynników. Piana negatywnie wpływa na wykrywanie poziomu przez system Panther.



Rysunek 5. Proces przygotowania odczynników

3. Wyjąć odczynnik wzmocnienia cząstek szukanych qHBV z miejsca przechowywania (15 °C do 30 °C). Na etykiecie wpisać inicjały operatora i datę otwarcia. Sprawdzić numer partii na butelce TER, aby upewnić się, że zgadza się z numerem partii na karcie z kodami kreskowymi partii głównej.

D. Przygotowanie odczynników dla odczynników przygotowanych wcześniej

1. Wyjąć wcześniej przygotowane odczynniki z miejsca przechowywania (2 °C do 8 °C). Przed rozpoczęciem testu uprzednio przygotowane odczynniki amplifikacji, enzymatyczny, promotora i TCR muszą osiągnąć temperaturę pokojową od 15 °C do 30 °C.
2. Wyjąć TER z miejsca przechowywania (15 °C do 30 °C).
3. W przypadku wcześniej przygotowanego TCR, przed załadowaniem do systemu należy wykonać etap C.1 powyżej.
4. Odwirować i odwrócić odczynniki amplifikacji, enzymatyczny i promotora, aby dokładnie wymieszać przed załadowaniem do systemu. Unikać tworzenia nadmiernej piany podczas odwracania odczynników.

Opcja: wcześniej przygotowane odczynniki można przygotować na kołysce do próbek zgodnie z niniejszymi instrukcjami: wyjąć odczynniki z miejsca przechowywania (2 °C do 8 °C). Umieścić odczynniki na kołysce do próbek i zostawić w temperaturze od 15 °C do 30 °C na co najmniej 30 minut celem ich ogrzania.

5. Nie wolno dopełniać butelek z odczynnikami. System Panther rozpozna butelki po dopełnieniu i odrzuci je.

E. Obchodzenie się z próbkami

1. Należy upewnić się, że przetworzone próbki w probówkach pierwotnych lub nierozcieńczone próbki osocza w probówkach dodatkowych były odpowiednio przechowywane, zgodnie z *Pobieranie próbek*.
2. Upewnić się, że zamrożone próbki są dokładnie rozmrożone. Rozmrożone próbki należy wirować przez 3 do 5 sekund w celu dokładnego wymieszania.
3. Przed rozpoczęciem obróbki próbki powinny osiągnąć temperaturę od 15 °C do 30 °C. Dodatkowe informacje dotyczące systemu zawiera sekcja *Próbki w systemie Panther*.
4. Należy upewnić się, że każda pierwotna próbka do pobierania próbek zawiera do 1200 µL próbki lub każdy SAT zawiera co najmniej 700 µL próbki. W tabeli znajdującej się w sekcji *Pobieranie próbek* określono wymagania dotyczące objętości martwej dla każdego typu próbki pierwotnej i dodatkowej. Jeśli konieczne jest rozcieńczenie próbki, patrz etap E.5 poniżej, aby uzyskać więcej informacji.
5. Rozcieńczyć próbkę osocza lub surowicy w stosunku 1:3 w SAT lub 1:100 w próbówce dodatkowej.

Próbka może zostać rozcieńczona w próbówce dodatkowej w celu wykonania testu w systemie Panther.

Uwaga: Jeżeli próbka zostanie rozcieńczona, musi zostać zbadana natychmiast po rozcieńczeniu.

a. Rozcieńczanie próbek o małej objętości

Objętość próbek może zostać zwiększona do minimalnej wymaganej objętości (700 µL) przy użyciu rozcieńczalnika do próbek Aptima. Próbki o objętości co najmniej 240 µL można rozcieńczyć w dwóch częściach rozcieńczalnika do próbek (1:3) w następujący sposób:

- i. Umieścić 240 µL próbki w SAT.
- ii. Dodać 480 µL rozcieńczalnika do próbek Aptima.
- iii. Zakręcić probówkę.
- iv. Delikatnie odwrócić 5 razy, aby wymieszać.

Próbki rozcieńczone w stosunku 1:3 mogą być badane przy użyciu opcji 1:3 w systemie Panther (więcej informacji na ten temat znajduje się w *Instrukcji obsługi systemu Panther/Panther Fusion*). Oprogramowanie automatycznie poda dokładny wynik po zastosowaniu współczynnika rozcieńczenia. Próbki te zostaną oznaczone jako próbki rozcieńczone.

b. Rozcieńczanie próbek o wysokim mianie

Jeżeli wynik próbki jest powyżej górnej granicy oznaczenia ilościowego (ULoQ), można ją rozcieńczyć 99 częściami rozcieńczalnika do próbek Aptima (1:100) w następujący sposób:

- i. Umieścić 30 µL próbki w SAT lub w probówce dodatkowej.
- ii. Dodać 2970 µL rozcieńczalnika do próbek Aptima.
- iii. Zakręcić probówkę.
- iv. Delikatnie odwrócić 5 razy, aby wymieszać.

Próbki rozcieńczone w stosunku 1:100 mogą być badane przy użyciu opcji 1:100 w systemie Panther (więcej informacji na ten temat znajduje się w *Instrukcji obsługi systemu Panther/Panther Fusion*). Oprogramowanie automatycznie poda dokładny wynik po zastosowaniu współczynnika rozcieńczenia. Próbki te zostaną oznaczone jako próbki rozcieńczone.

Uwaga: W przypadku rozcieńczonych próbek o stężeniach czystych większych niż ULoQ, wyniki będą podawane w notacji naukowej.

6. Tuż przed umieszczeniem próbek w statywie na próbki, odwirować każdą próbkę przy 1000–3000 g przez 10 minut. Nie zdejmować zakrętek. Pęcherzyki powietrza w probówce mogą wpłynąć negatywnie na wykrywanie poziomu przez Panther System. Zobacz *Przygotowanie systemu*, etap F.2 poniżej, aby uzyskać informacje dotyczące ładowania statywu i zdjęcia zakrętki.

F. Przygotowanie systemu

1. Skonfigurować system zgodnie z wytycznymi w *Instrukcji obsługi systemu Panther/Panther Fusion* i sekcji *Uwagi dotyczące procedury*. Upewnić się, że stosowane są statywy na odczytniki i adaptory TCR o odpowiedniej wielkości.
2. Załadowanie próbek do statywów na próbki. Wykonać następujące czynności dla każdej probówki na próbki (próbka oraz, jeśli to konieczne, kalibrator i kontrole):

- a. Poluzować jedną zakrętkę probówki na próbki, ale jeszcze jej nie zdejmować.

Uwaga: Zachować szczególną ostrożność, aby uniknąć kontaminacji poprzez rozprzestrzenienie się aerozolu. Delikatnie poluzować zakrętki na próbkach.

- b. Załadować probówki na próbki do statywów na próbki.
- c. Powtórzyć etapy 2.a i 2.b dla każdej pozostałej próbki.
- d. Po załadowaniu próbek do statywu na próbki, zdjęć i wyrzucić każdą zakrętkę probówki na próbki z jednego statywu na próbki. Aby uniknąć skażenia, nie przenosić zakrętki nad innymi statywami na próbki lub probówkami na próbki.
- e. W razie potrzeby użyć nowej, jednorazowej pipety do usuwania pęcherzyków powietrza lub piany.
- f. Po zdjęciu ostatniej zakrętki, załadować statyw z próbkami do wnęki na próbki.

Uwaga: Jeśli jednocześnie przeprowadzane są inne testy i typy próbek, należy zabezpieczyć mocowniki próbek przed załadowaniem statywu na próbki do wnęki na próbki.

- g. Potworzyć etapy 2.a do 2.f dla kolejnego statywu na próbki.

Uwagi dotyczące procedury

A. Kalibrator i kontrole

1. Probówki z kalibratorem dodatnim qHBV, kontrolą niskododatnią qHBV, kontrolą wysokododatnią qHBV i kontrolą ujemną qHBV można umieścić na dowolnej pozycji w statywie na próbki i w dowolnym torze wnęki na próbki w systemie Panther. Pipetowanie próbek pobranych od pacjentów rozpocznie się po spełnieniu jednego z dwóch następujących warunków:
 - a. Kalibrator i kontrole są w trakcie przetwarzania przez system.
 - b. Zarejestrowano w systemie ważne wyniki dla kalibratora i kontroli.
2. Po odpipetowaniu probówek z kalibratorem i kontrolami oraz obróbce pod kątem zestawu odczynników analitycznych Aptima HBV Quant Dx próbki można badać powiązaniem, przygotowanym zestawem w okresie do 24 godzin, **o ile nie wystąpiły następujące sytuacje:**
 - a. Wyniki kalibratora lub kontroli są nieważne.
 - b. Powiązany zestaw odczynników analitycznych zostaje usunięty z systemu.
 - c. Przekroczono granice stabilności powiązanego zestawu odczynników analitycznych.
3. Kalibrator i każda probówka kontrolna mogą być użyte tylko raz. Próby użycia probówki więcej niż jeden raz mogą prowadzić do błędów przetwarzania.

B. Puder z rękawiczek

Podobnie jak w przypadku każdego systemu odczynników nadmiar pudru na niektórych rękawiczkach może spowodować skażenie otwartych probówek. Zaleca się stosować rękawiczki bezpudrowe.

Kontrola jakości

Operator może unieważnić wyniki serii lub próbki w przypadku zaobserwowania i udokumentowania problemów technicznych, związanych z operatorem lub aparatem w trakcie testu. W takim przypadku próbki należy ponownie przebadać.

Kalibracja testu

Aby wygenerować ważne wyniki, należy wykonać kalibrację testu. Pojedynczy kalibrator dodatni jest wykonywany w trzech seriach za każdym razem, gdy do systemu Panther ładowany jest zestaw odczynników. Raz ustalona kalibracja jest ważna przez okres do 24 godzin. Oprogramowanie systemu Panther alarmuje operatora, gdy wymagana jest kalibracja. Operator skanuje współczynnik kalibracji znajdujący się na arkuszu kodów kreskowych partii głównej dostarczanym z każdym zestawem odczynników.

Podczas przetwarzania kryteria akceptacji kalibratora są automatycznie weryfikowane przez system Panther. Jeśli ważny jest wynik mniej niż dwóch replikatów kalibratora, oprogramowanie automatycznie unieważnia serię. Próbki w unieważnionej serii muszą być ponownie przebadane przy użyciu świeżo przygotowanego kalibratora i świeżo przygotowanych kontroli.

Kontrole ujemne i dodatnie

Aby wygenerować ważne wyniki, należy przetestować zestaw kontroli testu. Należy przetestować jeden replikat kontroli ujemnej, kontroli niskododatniej i kontroli wysokododatniej za każdym razem, gdy do systemu Panther ładowany jest zestaw odczynników. Raz ustalone kontrole są ważne przez okres do 24 godzin. Oprogramowanie systemu Panther alarmuje operatora, gdy wymagane są kontrole.

Podczas przetwarzania kryteria akceptacji kontroli są automatycznie weryfikowane przez system Panther. Aby wygenerować ważne wyniki, kontrola ujemna musi dawać wynik „Nie wykryto”, a kontrole dodatnie muszą dawać wyniki mieszczące się we wcześniej zdefiniowanych parametrach (nominalna ilość cząstek szukanych LPC: $2,7 \log_{10}$ j.m./mL, Nominalna ilość cząstek szukanych HPC: $4,6 \log_{10}$ j.m./mL). Jeśli którakolwiek z kontroli ma nieważny wynik, oprogramowanie automatycznie unieważnia serię. Próbki w unieważnionej serii muszą być ponownie przebadane przy użyciu świeżo przygotowanego kalibratora i świeżo przygotowanych kontroli.

Kalibrator wewnętrzny / kontrola wewnętrzna

Każda próbka zawiera wewnętrzny kalibrator / kontrolę wewnętrzną (IC). W trakcie przetwarzania kryteria akceptacji IC są automatycznie weryfikowane przez oprogramowanie systemu Panther. Jeżeli wynik IC jest nieważny, wynik próbki jest unieważniony. Każda próbka z nieważnym wynikiem IC musi zostać ponownie przebadana w celu uzyskania ważnego wyniku.

Oprogramowanie systemu Panther umożliwia przeprowadzenie dokładnej weryfikacji procesów, gdy procedury są wykonywane zgodnie z instrukcjami zawartymi w tej ulotce załączonej do opakowania oraz w *Instrukcji obsługi aparatu Panther/Panther Fusion*.

Interpretacja wyników

System Panther automatycznie określa stężenie DNA wirusa HBV dla próbek i kontroli poprzez porównanie wyników z krzywą kalibracyjną. Stężenia DNA wirusa HBV podawane są w j.m./mL i \log_{10} j.m./mL. Interpretację wyników przedstawia Tabela 1. Jeżeli używana jest opcja rozcieńczenia, system Panther automatycznie oblicza stężenie DNA wirusa HBV dla czystej próbki poprzez pomnożenie rozcieńczonego stężenia przez współczynnik rozcieńczenia, a rozcieńczone próbki zostaną oznaczone jako rozcieńczone.

Uwaga: W przypadku rozcieńczonych próbek wyniki oznaczone jako „Nie wykryto” lub „Wykryto <10” mogą być generowane przez rozcieńczenie próbki o stężeniu powyżej, ale blisko LoD (granicy wykrywalności) lub LLoQ (dolnej granicy oznaczalności). Zaleca się pobranie i przebadanie innej czystej próbki, jeśli nie uzyskano wyniku ilościowego.

Tabela 1: Interpretacja wyników

Zgłoszony wynik testu Aptima HBV Quant		Interpretacja
j.m./mL	\log_{10} j.m./mL ^a	
Nie wykryto	Nie wykryto	Nie wykryto DNA wirusa HBV.
Wykryto <10	<1,00	Wykryto DNA wirusa HBV, ale poziom poniżej LLoQ.
10 do 1 000 000 000	1,00 do 9,00	Stężenie DNA wirusa HBV mieści się w zakresie liniowym od 10 do 1 000 000 000 j.m./mL.
>1 000 000 000	>9,00	Stężenie DNA wirusa HBV jest powyżej ULoQ.
Nieważny ^b	Nieważny ^b	Błąd wskazany przy generowaniu wyniku. Trzeba ponownie przetestować próbki.

^a Wartość jest obcięta do dwóch miejsc po przecinku.

^b Nieważne wyniki są wyświetlane niebieską czcionką.

W przypadku rozcieńczonych próbek o stężeniach czystych większych niż ULoQ, wyniki będą podawane w notacji naukowej.

Kryteria akceptacji dla każdej z kontroli testu Aptima HBV Quant przedstawia Tabela 2 poniżej.

Uwaga: Wymieniony poniżej zakres odzysku zmienia się w zależności od przypisanej wartości każdej konkretnej partii. Należy zapoznać się z przypisanymi stężeniami wymienionymi w ulotce z arkuszem kodów kreskowych kontroli dołączonej do każdego pudełka z kontrolami.

Tabela 2: Kryteria akceptacji dla zakresu odzysku dla kontroli testu Aptima HBV Quant

Komponent	Zakres odzysku dla ważnych serii
Kontrola ujemna	ND.
Niska kontrola dodatnia	+/- 0,55 \log_{10} j.m./mL
Wysoka kontrola dodatnia	+/- 0,5 \log_{10} j.m./mL

Ograniczenia

- A. Niniejszy test powinien być wykonywany wyłącznie przez osoby przeszkolone w zakresie procedury testowej. Nieprzestrzeganie instrukcji przedstawionych w niniejszej ulotce załączonej do opakowania może spowodować uzyskanie błędnych wyników.
- B. Wiarygodne wyniki zależą od właściwego pobrania próbek, ich transportu, przechowywania i obróbki.

Skuteczność analityczna

Granica wykrywalności przy zastosowaniu 3. międzynarodowej próbki wzorcowej WHO

Granica wykrywalności (LoD) testu jest definiowana jako stężenie DNA wirusa HBV, które jest wykrywane z 95% lub większym prawdopodobieństwem zgodnie z CLSI EP17-A2.11

LoD określono poprzez badanie paneli 3. Międzynarodowego Standardu WHO dla DNA wirusa zapalenia wątroby typu B (NIBSC 10/264, genotyp A) rozcieńczonego w osoczu i surowicy ludzkiej EDTA HBV-ujemnej. Zbadano co najmniej 36 replikatów każdego rozcieńczenia z każdą z trzech partii odczynników, co daje co najmniej 108 replikatów na rozcieńczenie. Przeprowadzono analizę probitową w celu wygenerowania 95% przewidywanych granic wykrywalności. Wartości LoD to wyniki z partii odczynnika o najwyższej przewidywanej granicy wykrywalności. LoD dla testu Aptima HBV Quant wykorzystującego 3. Międzynarodowy Standard WHO wynosi 4,8 j.m./mL dla osocza i 5,9 j.m./mL dla surowicy.

Granica wykrywalności dla różnych genotypów HBV

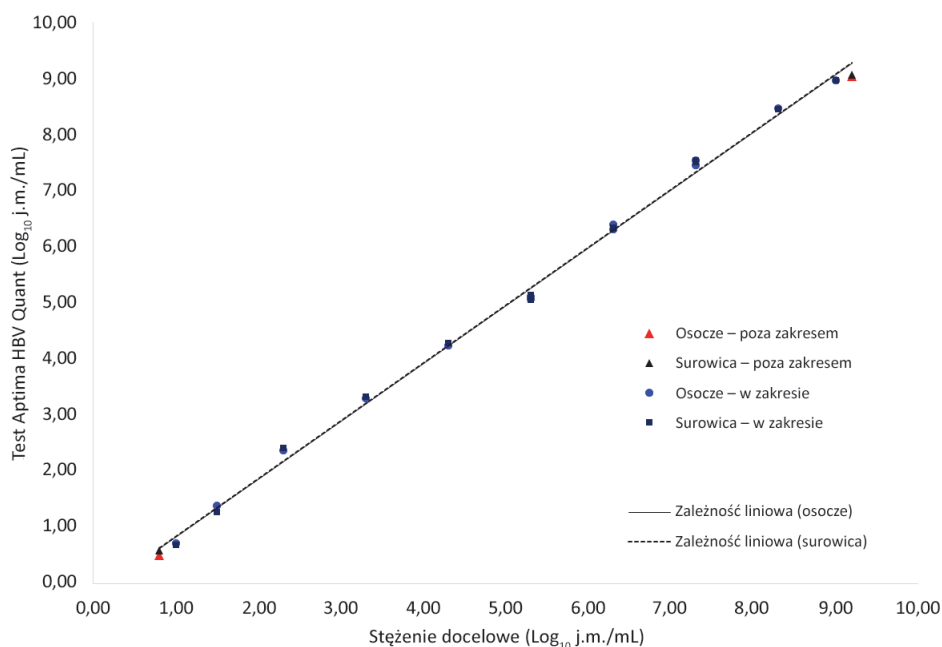
LoD została określona poprzez badanie rozcieńczeń próbek klinicznych HBV-dodatnich dla genotypów A, B, C, D, E, F, G i H w ludzkim osoczu i surowicy ujemnych pod względem HBV. Stężenia oznaczono przy użyciu zatwierdzonego testu. Przebadano co najmniej 24 replikaty każdego elementu panelu przy użyciu każdej z dwóch serii odczynników, co daje co najmniej 48 replikatów dla każdego elementu panelu. Przeprowadzono analizę probitową w celu wygenerowania 95% przewidywanych granic wykrywalności. Wartości LoD, które przedstawia Tabela 3, to wyniki z partii odczynnika o najwyższej przewidywanej granicy wykrywalności.

Tabela 3: Granica wykrywalności (95% przewidywanej granicy wykrywalności) dla różnych genotypów HBV przy użyciu próbek klinicznych

Genotyp	Stężenie (j.m./ml)	
	Osocze	Surowica
A	3,3	4,1
B	2,9	3,9
C	4,9	5,2
D	5,7	5,4
E	5,8	5,8
F	3,0	4,0
G	2,8	7,4
H	5,5	6,3

Zakres liniowy

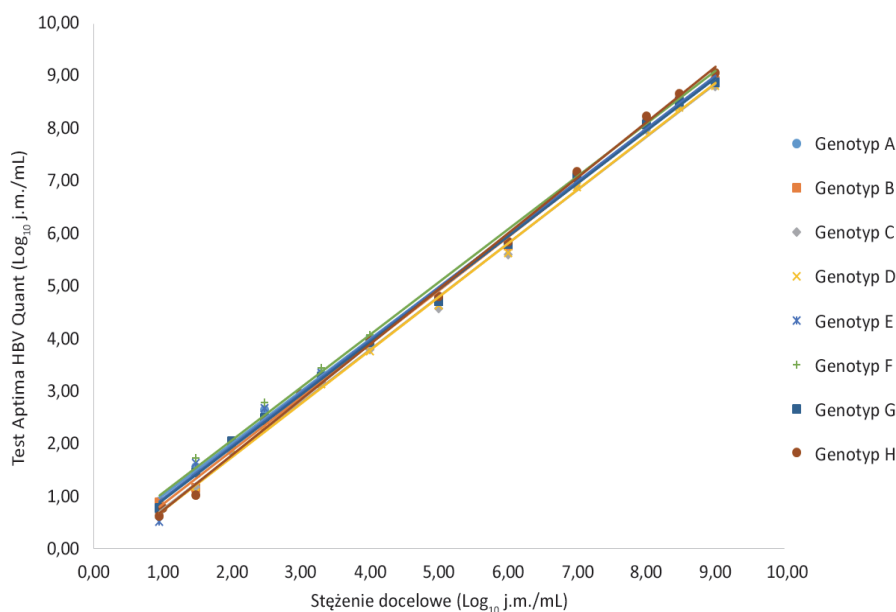
Zakres liniowy ustalono poprzez badanie paneli wirusa HBV genotypu A (od 0,78 log₁₀ j.m./mL do 7,30 log₁₀ j.m./mL) i DNA plazmidowego (od 5,30 log₁₀ j.m./mL do 9,18 log₁₀ j.m./mL) rozcieńczonych w osoczu ludzkim i surowicy ujemnych pod względem HBV zgodnie z CLSI EP06-A.12 Test Aptima HBV Quant wykazał liniowość w całym badanym zakresie, z górną granicą oznaczenia ilościowego (ULoQ) wynoszącą 9 log₁₀ j.m./mL, jak pokazano na Rysunek 6.



Rysunek 6. Liniowość w osoczu i surowicy

Liniowość według genotypów HBV

Liniowość genotypów HBV została ustalona poprzez badanie pojedynczych klinicznie dodatnich próbek dla genotypów A, E, F, G i H oraz 1. paneli referencyjnych WHO PEI (PEI 5086/08) dla genotypów B, C i D. Wirus został użyty dla dolnego zakresu testu ($4 \log_{10}$ j.m./mL i poniżej dla genotypów A-G, $3 \log_{10}$ j.m./mL i poniżej dla genotypu H). Plazmidowe DNA zostało użyte dla górnego zakresu z nakładem $2 \log_{10}$. Rozcieńczenia w ujemnym osoczu ludzkim były testowane dla wszystkich genotypów. Liniowość została wykazana w całym badanym zakresie dla wszystkich badanych genotypów, jak pokazano na Rysunek 7.



Rysunek 7. Zakres liniowy i liniowość (osocze)

Dolna granica oznaczenia ilościowego przy zastosowaniu 3. międzynarodowej próbki wzorcowej WHO

Dolna granica oznaczalności jest definiowana jako najniższe stężenie, przy którym DNA wirusa HBV jest wiarygodnie oznaczane ilościowo w ramach błędu całkowitego, zgodnie z CLSI EP17-A2.11 Błąd całkowity został oszacowany za pomocą następujących dwóch metod:

Całkowity błąd analityczny (TAE) = |obciążenie| + 2SD
 Całkowity błąd (TE) = $\text{SQRT}(2) \times 2\text{SD}$.

Aby zapewnić dokładność i precyzję pomiarów, błąd całkowity testu Aptima HBV Quant został ustalony na poziomie $1 \log_{10}$ j.m./mL (tj. w LLoQ różnica między dwoma pomiarami większa niż $1 \log_{10}$ j.m./mL jest statystycznie istotna).

LLoQ określono poprzez badanie paneli 3. Międzynarodowego Standardu WHO dla DNA wirusa zapalenia wątroby typu B (NIBSC 10/264, genotyp A) rozcieńczonego w osoczu i surowicy ludzkiej HBV-ujemnej. Zbadano czterdzieści pięć (45) replikatów każdego rozcieńczenia z każdą z trzech partii odczynników, co daje co najmniej 135 replikatów na rozcieńczenie. Wyniki dla trzech partii odczynników są przedstawione w Tabeli 4 dla osocza i Tabeli 5 dla surowicy. Wyniki dla najniższego obserwowanego stężenia, które spełniało cele dokładności ($\text{TE} \leq 1 \log_{10}$ j.m./mL i $\text{TE} \leq 1 \log_{10}$ j.m./mL) z >95% wykrywalnością i większe lub równe LoD są zacienione w obu tabelach i podsumowane w Tabeli 6.

Obliczone LLoQ dla 3. Międzynarodowego Standardu WHO dla wirusa zapalenia wątroby typu B wynosi 6 j.m./mL ($0,79 \log_{10}$ j.m./mL) dla osocza i 8 j.m./mL ($0,88 \log_{10}$ j.m./mL) dla surowicy, które są oparte na najwyższym obliczonym stężeniu spośród trzech partii odczynników zgodnie z CLSI EP17-A2. LLoQ został ustalony dla wszystkich genotypów (patrz *Dolna granica oznaczalności dla różnych genotypów HBV*). Te dane genotypów ustaliły ogólną wartość LLoQ dla testu na 10 j.m./mL.

Tabela 4: Oznaczenie LLoQ przy zastosowaniu 3. międzynarodowej próbki wzorcowej WHO dla HBV rozcieńczonego w osoczu

Partia odczynników	Aptima HBV Quant (j.m./mL)	Aptima HBV Quant (\log_{10} j.m./mL)	SD (\log_{10} j.m./mL)	Obciążenie (\log_{10} j.m./mL)	Obliczony TE (\log_{10} j.m./mL)	Obliczony TAE (\log_{10} j.m./mL)
1	3	0,53	0,21	0,32	0,59	0,74
	3	0,52	0,21	0,38	0,61	0,81
	5	0,70	0,23	0,25	0,65	0,71
2	6	0,76	0,26	0,09	0,73	0,60
	5	0,69	0,22	0,21	0,63	0,65
	6	0,77	0,25	0,18	0,70	0,68
3	6	0,79	0,31	0,05	0,88	0,68
	8	0,88	0,23	0,02	0,66	0,48
	9	0,96	0,23	0,00	0,66	0,47

SD = odchylenie standardowe.

Elementy panelu, które osiągnęły cel dokładności ($TE \leq 1$ i $TAE \leq 1$), $> LoD$ i $> 95\%$ wykrywalności dla partii odczynników 1, 2 i 3 są zacieniowane.

Tabela 5: Oznaczenie LLoQ przy zastosowaniu 3. międzynarodowej próbki wzorcowej WHO dla HBV rozcieńczonego w surowicy

Partia odczynników	Aptima HBV Quant (j.m./mL)	Aptima HBV Quant (\log_{10} j.m./mL)	SD (\log_{10} j.m./mL)	Obciążenie (\log_{10} j.m./mL)	Obliczony TE (\log_{10} j.m./mL)	Obliczony TAE (\log_{10} j.m./mL)
1	4	0,65	0,24	0,20	0,67	0,67
	5	0,65	0,24	0,25	0,68	0,73
	5	0,67	0,22	0,28	0,63	0,73
2	5	0,70	0,29	0,14	0,82	0,72
	5	0,72	0,27	0,18	0,77	0,72
	6	0,75	0,24	0,20	0,68	0,68
3	8	0,88	0,29	0,04	0,83	0,63
	10	0,98	0,23	0,08	0,66	0,55
	11	1,02	0,28	0,07	0,78	0,62

SD = odchylenie standardowe.

Elementy panelu, które osiągnęły cel dokładności ($TE \leq 1$ i $TAE \leq 1$), $> LoD$ i $> 95\%$ wykrywalności dla partii odczynników 1, 2 i 3 są zacieniowane.

Tabela 6: Podsumowanie obliczonej LLoQ przy zastosowaniu 3. Międzynarodowego Standardu WHO dla HBV

Partia odczynników	LLoQ osocza		LLoQ surowicy	
	j.m./mL	\log_{10} j.m./mL	j.m./mL	\log_{10} j.m./mL
1	5	0,70	4	0,65
2	5	0,69	5	0,72
3	6	0,79	8	0,88

Dolna granica oznaczalności dla różnych genotypów HBV

LLOQ określono poprzez badanie rozcieńczeń próbek klinicznych HBV-dodatnich dla genotypów A, B, C, D, E, F, G i H w ludzkim osoczu i surowicy ujemnych pod kątem HBV. Przypisanie stężenia dla próbek klinicznych zostało określone przy użyciu testu porównawczego. Przebadano łącznie 36 replikatów każdego elementu panelu przy użyciu każdej z dwóch serii odczynników, co daje co najmniej 72 replikaty dla każdego elementu panelu. Wyniki dla najniższego obserwowanego stężenia spełniającego cele dokładności ($TE \leq 1 \log_{10} \text{ j.m./mL}$ i $TAE \leq 1 \log_{10} \text{ j.m./mL}$) z >95% wykrywalnością dla każdej partii odczynnika przedstawiono na Tabeli 7 w przypadku plazmy i Tabela 8 w przypadku surowicy. Najwyższe obserwowane stężenie wśród partii odczynników dla każdego genotypu jest podsumowane w Tabeli 9. Genotyp D w surowicy miał najwyższy LLOQ na poziomie 9 j.m./mL ($0,96 \log_{10} \text{ j.m./mL}$). To potwierdza ogólną wartość LLOQ dla testu jako 10 j.m./mL.

Tabela 7: Określenie LLOQ w osoczu w zależności od genotypu HBV

Genotyp HBV	Partia odczynników	Aptima HBV Quant ^a (j.m./mL)	Aptima HBV Quant ^a ($\log_{10} \text{ j.m./mL}$)	SD ($\log_{10} \text{ j.m./mL}$)	Obciążenie ($\log_{10} \text{ j.m./mL}$)	Obliczony TE ($\log_{10} \text{ j.m./mL}$)	Obliczony TAE ($\log_{10} \text{ j.m./mL}$)
A	1	6	0,74	0,24	0,10	0,67	0,58
	2	7	0,85	0,20	0,00	0,57	0,40
B	1	4	0,65	0,24	0,20	0,67	0,67
	2	6	0,75	0,25	0,10	0,70	0,59
C	1	4	0,61	0,21	0,35	0,60	0,77
	2	6	0,75	0,30	0,20	0,84	0,80
D	1	7	0,87	0,28	0,31	0,81	0,88
	2	8	0,91	0,30	0,26	0,86	0,87
E	1	8	0,88	0,32	0,29	0,89	0,92
	2	7	0,82	0,21	0,36	0,60	0,78
F	1	6	0,76	0,27	0,08	0,76	0,62
	2	7	0,86	0,30	0,01	0,84	0,60
G	1	4	0,59	0,21	0,25	0,60	0,68
	2	4	0,65	0,23	0,19	0,64	0,64
H	1	6	0,78	0,28	0,39	0,80	0,96
	2	7	0,83	0,27	0,34	0,78	0,89

SD = odchylenie standardowe.

^aPrzeprowadzono dodatkowe pomiary, ale te dane nie są podane w tabeli.

Tabela 8: Określenie LLoQ w surowicy w zależności od genotypu HBV

Genotyp HBV	Partia odczynników	Aptima HBV Quant ^a	Aptima HBV Quant ^a	SD (Log ₁₀ j.m./mL)	Obciążenie (Log ₁₀ j.m./mL)	Obliczony TE (Log ₁₀ j.m./mL)	Obliczony TAE (Log ₁₀ j.m./mL)
		(j.m./mL)	(Log ₁₀ j.m./mL)				
A	1	4	0,65	0,26	0,25	0,73	0,77
	2	6	0,81	0,26	0,04	0,74	0,56
B	1	5	0,70	0,19	0,26	0,54	0,64
	2	5	0,72	0,25	0,18	0,72	0,69
C	1	5	0,66	0,26	0,30	0,74	0,82
	2	6	0,81	0,26	0,10	0,74	0,62
D	1	7	0,84	0,27	0,42	0,75	0,95
	2	9	0,96	0,27	0,29	0,76	0,83
E	1	6	0,79	0,26	0,38	0,75	0,91
	2	8	0,89	0,28	0,29	0,79	0,84
F	1	6	0,76	0,23	0,08	0,66	0,55
	2	5	0,71	0,26	0,14	0,72	0,65
G	1	8	0,89	0,28	0,29	0,80	0,85
	2	5	0,66	0,24	0,29	0,67	0,77
H	1	6	0,74	0,24	0,43	0,67	0,90
	2	6	0,81	0,29	0,37	0,82	0,95

SD = odchylenie standardowe.

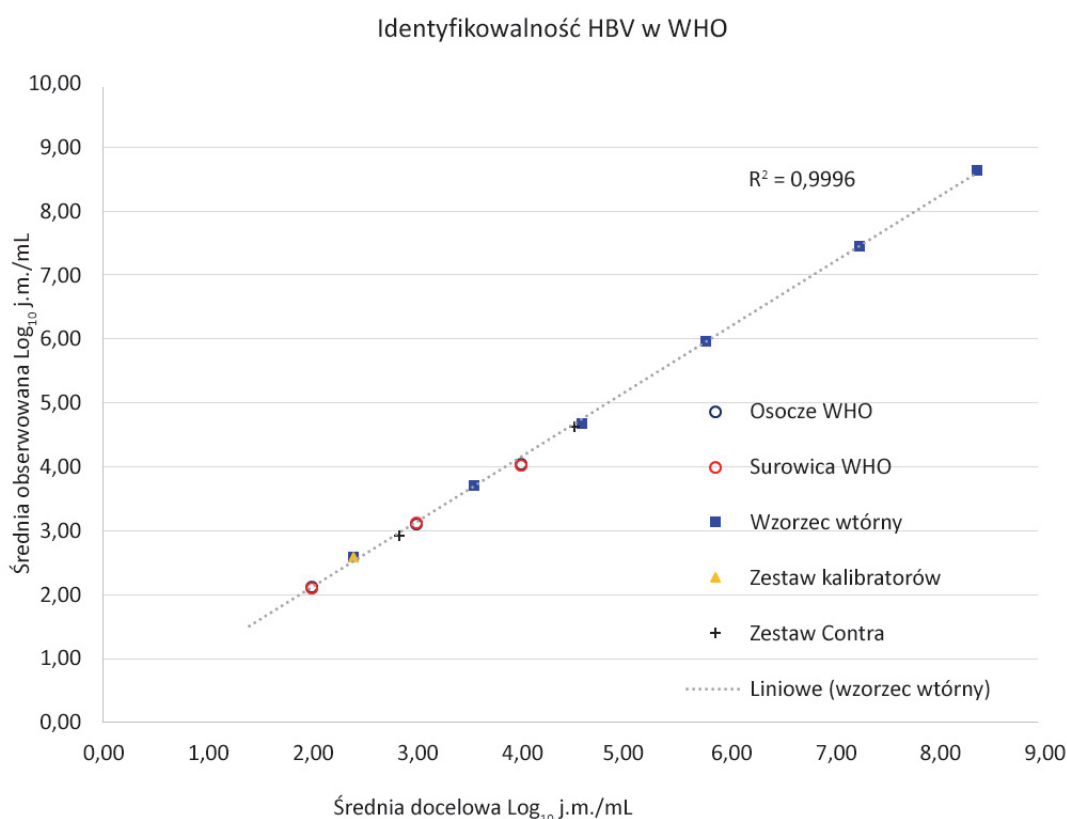
^a Przeprowadzono dodatkowe pomiary, ale te dane nie są podane w tabeli.

Tabela 9: Podsumowanie LLoQ w osoczu i surowicy w zależności od genotypu

Genotyp	LLoQ osocza		LLoQ surowicy	
	j.m./mL	Log ₁₀ j.m./mL	j.m./mL	Log ₁₀ j.m./mL
A	7	0,85	6	0,81
B	6	0,75	5	0,72
C	6	0,75	6	0,81
D	8	0,91	9	0,96
E	8	0,88	8	0,89
F	7	0,86	6	0,76
G	4	0,65	8	0,89
H	7	0,83	6	0,81

Identyfikowalność według 3. Międzynarodowej Normy WHO

W trakcie opracowywania i wytwarzania produktu stosowano serię wzorców wtórnych o znanych stężeniach, aby zapewnić identyfikowalność z próbką wzorcową WHO. Stężenia badane wg próbki wzorcowej WHO dla HBV wynosiły od 2,0 do 4,0 \log_{10} j.m./mL, normy wtórne miały stężenie od 2,4 do 8,4 \log_{10} j.m./mL. Kontrole i kalibratory testu Aptima HBV Quant zostały również przetestowane wraz z wzorcami wtórnymi i próbką wzorcową WHO. Wszystkie panele miały podobne wyniki i rozkładały się liniowo w zakresie liniowym testu, jak przedstawiono w Rysunek 8.



Rysunek 8. Identyfikowalność pomiędzy docelowymi stężeniami 3. normy WHO dla HBV a obserwowanymi stężeniami z testu Aptima HBV Quant

Precyzja

Panel precyzyjny Aptima HBV Quant został zbudowany przez rozcieńczenie wirusa HBV genotypu A i plazmidowego DNA wirusa HBV w klinicznym osoczu HBV-ujemnym i klinicznej surowicy HBV-ujemnej (cztery najwyższe elementy panelu w każdej matrycy to plazmidowe DNA). Jedenaście elementów panelu w każdej matrycy obejmowało zakres testu (stężenia docelowe od 1,30 \log_{10} j.m./mL do 8,90 \log_{10} j.m./mL) i było testowanych w trzech powtórzeniach na jeden przebieg przez jednego operatora, przy użyciu trzech partii odczynników na jednym systemie Panther w ciągu trzech dni, dwie serie dziennie.

Tabela 10 przedstawia precyzję wyników testów (w \log_{10} j.m./mL) pomiędzy dniami, partiami, seriami oraz w ramach serii i ogółem. Całkowita zmienność wynikała głównie z pomiarów w ramach serii (tj. błędu losowego).

Tabela 10: Precyzja testu Aptima HBV Quant

Matryca	Próbka	N	Średnie stężenie	Średnie stężenie	Pomiędzy partiami	Pomiędzy partiami	Pomiędzy dniami	Pomiędzy dniami	Pomiędzy seriami	Pomiędzy seriami	W ramach serii	W ramach serii	Ogółem	Ogółem
			(j.m./mL)	(log ₁₀ j.m./mL)	SD	Log Normal CV (%)	SD	Log Normal CV (%)	SD	Log Normal CV (%)	SD	Log Normal CV (%)	SD	Log Normal CV (%)
Osocze	Wirus	34 ^a	32	1,21	0,07	16,2	0,07	16,2	0,05	11,7	0,28	71,8	0,28	78,2
		54	97	1,95	0,05	11,7	0,03	6,8	0,02	5,7	0,15	36,8	0,17	39,9
		54	1 474	3,16	0	1,0	0,02	3,8	0,02	4,8	0,07	15,6	0,07	16,8
		54	10 602	4,02	0,02	4,8	0,02	3,6	0,01	2,4	0,06	14,9	0,07	16,2
		54	429 428	5,63	0,03	6,7	0,01	2,7	0,01	2,4	0,06	14,1	0,07	16,1
	DNA plazmidowe	54	652 103	5,8	0,06	14,2	0,01	3,4	0,01	2,0	0,06	13,1	0,09	19,8
		54	7 617 612	6,88	0,02	5,6	0,00	0,4	0,02	4,2	0,06	13,4	0,07	15,1
		54	10 662 942	7,02	0,02	5,3	0,01	2,3	0,01	2,6	0,06	13,1	0,06	14,5
		54	89 149 358	7,95	0,01	3,4	0,01	2,7	0,01	1,6	0,04	9,7	0,05	10,8
		54	103 400 000	8,01	0,04	9,4	0,02	3,7	0,01	2,1	0,05	12,0	0,07	15,9
Surowica	Wirus	29 ^a	33	1,27	0,13	31,0	0,08	18,6	0,06	13,9	0,29	75,0	0,33	88,4
		54	88	1,92	0,05	11,2	0,02	4,8	0,02	5,5	0,12	29,1	0,14	32,3
		54	1 446	3,15	0,02	3,7	0,01	1,9	0,00	1,1	0,08	17,8	0,08	18,3
		54	7 873	3,89	0,02	4,8	0,01	2,6	0,01	2,1	0,06	13,4	0,06	14,6
		54	313 518	5,49	0,01	3,3	0,01	3,0	0,01	3,2	0,08	17,4	0,08	18,3
	DNA plazmidowe	54	599 225	5,77	0,04	8,5	0,01	2,5	0,01	2,5	0,06	14,7	0,08	17,4
		54	7 011 440	6,84	0,02	3,5	0,01	3,2	0,01	3,3	0,07	16,9	0,08	17,9
		54	8 845 332	6,94	0,05	11,9	0,01	2,2	0,01	2,2	0,05	12,2	0,07	17,4
		54	70 350 774	7,84	0,03	6,3	0,02	3,5	0,02	4,4	0,06	14,4	0,07	16,7
		53 ^b	122 800 000	8,08	0,04	9,9	0,01	2,2	0,01	1,8	0,04	10,4	0,06	14,6
54	678 700 000	8,83	0,02	3,6	0,01	2,2	0,01	1,8	0,05	11,7	0,05	12,5		

SD = odchylenie standardowe.

^aWykryte replikaty z wynikiem ilościowym, całkowita liczba wykrytych replikatów = 54.^bJeden replikat miał nieważny wynik.Log Normal CV(%) = $\sqrt{10^{(SD^2 * \ln(10))} - 1} * 100$

Potencjalne substancje zakłócające

Oceniono podatność testu Aptima HBV Quant na interferencje spowodowane podwyższonym poziomem substancji endogennych lub lekami powszechnie przepisywanymi osobom zakażonym wirusem HBV. Badano próbki osocza ujemne pod względem HBV oraz próbki z domieszką HBV o stężeniu około 30 j.m./mL ($1,48 \log_{10}$ j.m./mL) i 20 000 j.m./mL ($4,30 \log_{10}$ j.m./mL).

Nie zaobserwowano interferencji w wynikach testu w obecności albuminy (90 mg/mL), hemoglobiny (5 mg/mL), trójglicerydów (30 mg/mL) lub niezwiązanej bilirubiny (0,2 mg/mL).

Próbki osocza pobrane od pacjentów z podwyższonym poziomem zdefiniowanych substancji lub od pacjentów z chorobami, po dziesięć próbek dla każdej substancji, wymienionymi w Tabeli 11 zostały przebadane przy użyciu testu Aptima HBV Quant. Nie zaobserwowano żadnych interferencji w przeprowadzaniu testu.

Tabela 11: Badane typy próbek klinicznych

Typy próbek klinicznych	
1	Przeciwciała przeciwjądrowe (ANA)
2	Czynnik reumatoidalny (RF)
3	Alkoholowa marskość wątroby (AC)
4	Alkoholowe zapalenie wątroby
5	Niealkoholowe zapalenie wątroby
6	Autoimmunologiczne zapalenie wątroby
7	Podwyższona aminotransferaza alaninowa (ALT)
8	Rak wątrobowokomórkowy (HCC)
9	Stwardnienie rozsiane (MS)
10	Toczeń rumieniowaty (SLE)
11	Hiperglobulinemia
12	Artretyzm reumatyczny (RA)
13	Przeciwciała anty-Jo1 (JO-1)
14	Szpiczak plazmocytowy (MM)
15	Hemoliza (podwyższona hemoglobina)
16	Żółtaczką (podwyższona bilirubina)
17	Lipemia (podwyższony poziom lipidów)
18	Podwyższony poziom białek

Nie zaobserwowano interferencji wyników testu w obecności substancji egzogennych wymienionych w Tabeli 12 w stężeniach co najmniej trzykrotnie większych niż C_{max} (ludzkie osocze).

Tabela 12: Substancje egzogenne

Pula substancji egzogennych	Badane substancje egzogenne
1	Sakwinawir, rytonawir, amprenawir, indynawir, lopinawir, mesylan nelfinawiru
2	Klarytromycyna, chlorowoderek walgancyklowiru, efawirenz, newirapina
3	Paroksetyna HCl, enfuwirtyd, zydowudyna, didanozyna, siarczan abakawiru
4	Rybawiryryna, entekawir, dipiwoksyl adefowiru, fumaran tenofowiru dizoproksylu, lamiwudyna, gancyklowir, acyklowir
5	Stawudyna, cyprofloksacyna, fluoksetyna, azytromycyna, walacyklowir, sertralina, zalcytabina
6	Interferon alfa -2a, interferon alfa -2b, pegylowany interferon alfa-2b

Swoistość analityczna

Potencjalna reaktywność krzyżowa z patogenami wymienionymi w Tabela 13 została oceniona w ludzkim HBV-ujemnym osoczu w obecności lub nieobecności 30 j.m./mL ($1,5 \log_{10}$ j.m./mL) i 20 000 ($4,3 \log_{10}$ j.m./mL) DNA wirusa HBV. Nie zaobserwowano reaktywności krzyżowej. W obecności patogenów nie zaobserwowano żadnych interferencji.

Tabela 13: Patogeny badane pod kątem swoistości analitycznej

Mikroorganizm/patogen	Stężenie	Mikroorganizm/patogen	Stężenie
Adenowirus typu 5	100 000 TCID50/mL ^a	<i>Candida albicans</i>	1 000 000 CFU/ml ^e
Ludzki poliomawirus BK	1000 TCID50/mL	<i>Chlamydia trachomatis</i>	1 000 000 IFU/ml ^f
Cytomegalowirus	100 000 TCID50/mL	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	1 000 000 CFU/mL
Wirus dengi typu 1	10 000 TCID50/mL	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1 000 000 CFU/mL
Wirus dengi typu 2	10 000 TCID50/mL	<i>Propionibacterium acnes</i>	1 000 000 CFU/mL
Wirus dengi typu 3	10 000 TCID50/mL	<i>Staphylococcus aureus</i>	1 000 000 CFU/mL
Wirus dengi typu 4	100 000 TCID50/mL	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1 000 000 CFU/mL
Wirus Epsteina-Barr	100 000 kopii/mL	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1 000 000 CFU/mL
Grypa H1N1	100 000 TCID50/mL	<i>Trichomonas vaginalis</i>	1 000 000 CFU/mL
Wirus zapalenia wątroby typu A	100 000 TCID50/mL	^a TCID50/mL = Jednostki dawki zakaźnej dla hodowli tkankowej na mL	
Wirus zapalenia wątroby typu C	100 000 j.m./mL ^b	^b j.m./mL = Jednostki międzynarodowe na mL	
Wirus zapalenia wątroby typu G	100 000 kopii/mL	^c vp/mL = Częsteczki wirusowe na mL	
Ludzki herpeswirus typu 6B	100 000 kopii/mL	^d LD50/mL = Dawka śmiertelna na mL	
Ludzki herpeswirus typu 8	100 000 kopii/mL	^e CFU/mL = Jednostki tworzące kolonie na mL	
HIV-1	100 000 j.m./mL	^f IFU/mL = Jednostki tworzące inkluzje na ml	
HIV-2	10 000 TCID50/mL		
Ludzki wirus brodawczaka (Papillomavirus)	100 000 kopii/mL		
Wirus opryszczki pospolitej typu 1 (HSV-1)	100 000 TCID50/mL		
Wirus opryszczki zwykłej 2 (HSV-2)	100 000 TCID50/mL		
Ludzki wirus limfotropowy komórek T typu 1 (HTLV-1)	100 000 vp/mL ^c		
Ludzki wirus limfotropowy komórek T typu 2 (HTLV-2)	100 000 vp/mL		
Wirus japońskiego zapalenia mózgu koni	ND.	ND.	
Wirus zapalenia mózgu doliny Murray	2000 LD50/mL ^d		
Parowirus B19	100 000 j.m./mL		
Wirus różyczki	10 000 TCID50/mL		
Wirus zapalenia mózgu St. Louis	100 000 TCID50/mL		
Wirus krowianki	1000 TCID50/mL		
Wirus Zachodniego Nilu	100 000 TCID50/mL		
Wirus żółtej gorączki	100 000 TCID50/mL		

Równoważność matrycy

Sto osiemnaście zestawów próbek z dopasowanych probówek do pobierania krwi (surowica, ACD, K2 EDTA, K3 EDTA, PPT, SST) oceniono pod kątem równoważności matrycy. Spośród nich 44 zestawy były naturalnie zakażone HBV-dodatnie, a 74 zestawy były HBV-ujemne, z dodatkiem wirusa HBV. Korelacja dla każdego typu probówki do pobierania krwi, mierzona przy użyciu probówki do pobierania surowicy jako komparatora, jest przedstawiona w Tabeli 14.

Tabela 14: Badanie równoważności matrycy

Probówka do pobierania krwi	Regresja Deminga	95% CI nachylenia		95% CI punktu przecięcia		R ²	Średnia różnica (Log ₁₀)
		Dolna granica	Górna granica	Dolna granica	Górna granica		
ACD	$y = 1,01x - 0,04$	1,00	1,02	-0,10	0,01	0,998	-0,01
K2 EDTA	$y = 1,02x - 0,14$	1,00	1,03	-0,20	-0,07	0,997	-0,07
K3 EDTA	$y = 1,01x - 0,12$	1,00	1,03	-0,18	-0,06	0,997	-0,06
PPT	$y = 1,02x - 0,14$	1,00	1,03	-0,21	-0,07	0,996	-0,06
SST	$y = 1,00x - 0,03$	0,99	1,01	-0,07	0,03	0,999	-0,01

CI = przedział ufności.

Rozcieńczanie próbki przy użyciu rozcieńczalnika do próbek Aptima (1:3)

Aby ocenić dokładność wykrywania DNA wirusa HBV w próbkach rozcieńczonych rozcieńczalnikiem do próbek Aptima, próbki, które obejmowały zakres liniowy, rozcieńczono 1:3 rozcieńczalnikiem do próbek Aptima (np. 240 µL próbki połączono z 480 µL rozcieńczalnika do próbek Aptima). Każda próbka była badana w postaci czystej i rozcieńczonej (1:3) w trzech replikatach. Testy przeprowadzono przy użyciu jednej partii odczynników do testów na dwóch systemach Panther z dwoma partiami rozcieńczalnika do próbek Aptima. Różnice między średnim podawanym stężeniem w matrycy natywnej (współczynnik rozcieńczenia zastosowany do wyniku rozcieńczonej próbki) a średnim stężeniem rozcieńczalnika do próbek Aptima są pokazane w Tabeli 15 dla osocza i Tabela 16 dla surowicy. Stężenia próbek zostały dokładnie odtworzone w rozcieńczonych próbkach.

Tabela 15: Zestawienie porównawcze próbek osocza w matrycy rozcieńczeń 1:3

Matryca osocza Średnie zgłoszone stężenie (Log ₁₀ j.m./mL) n = 9	Rozcieńczalnik Średnie zgłoszone stężenie (Log ₁₀ j.m./mL) n = 18	Różnica Rozcieńczalnik z matrycy osocza (Log ₁₀ j.m./mL)
1,20 ^a	1,11 ^b	-0,09
1,56 ^a	1,36 ^b	-0,20
2,15	2,04	-0,11
3,10	2,97	-0,13
3,92	3,89	-0,03
4,82	4,79	-0,03
5,70	5,70	0,00
7,07	6,98	-0,09
7,74	7,60	-0,14
8,74	8,62	-0,12
9,29	9,19	-0,10
9,39	9,29	-0,10

^an=21.^bn=42.

Tabela 16: Zestawienie porównawcze próbek surowicy w matrycy rozcieńczeń 1:3

Matryca surowicy Średnie zgłoszone stężenie (Log ₁₀ j.m./mL) n = 9	Rozcieńczalnik Średnie zgłoszone stężenie (Log ₁₀ j.m./mL) n = 18	Różnica Rozcieńczalnik z matrycy surowicy (Log ₁₀ j.m./mL)
1,21 ^a	1,11 ^b	-0,10
1,54 ^a	1,36 ^b	-0,18
2,21	2,03	-0,18
3,06	2,98	-0,08
3,90	3,83	-0,07
4,77	4,76	-0,01
5,77	5,74	-0,03
7,03	7,00	-0,03
7,85	7,71	-0,14
8,87	8,76	-0,11
9,37	9,30	-0,07
9,46	9,36	-0,10

^an=21.^bn=42.

Rozcieńczanie próbki przy użyciu rozcieńczalnika do próbek Aptima (1:100)

W celu oceny dokładności wykrywania DNA wirusa HBV w próbkach rozcieńczonych rozcieńczalnikiem do próbek Aptima, osocza lub surowicy, osiem pojedynczych próbek osocza i osiem pojedynczych próbek surowicy wzbogaconych o wirus HBV o wartości docelowej od 6 do 8 log₁₀ j.m./mL, wraz z ośmioma pojedynczymi próbkami osocza i ośmioma pojedynczymi próbkami surowicy wzbogaconymi o plazmidowe DNA wirusa HBV o wartości docelowej 9,16 log₁₀ j.m./mL, zostało przebadanych w 5 replikatach. Rozcieńczenie 1:100 z jednej części próbki i 99 części rozcieńczalnika do próbek Aptima wykonano tuż przed badaniem. Testy przeprowadzono przy użyciu jednej partii odczynników do testów na dwóch systemach Panther z dwoma partiami rozcieńczalnika do próbek Aptima. Różnice między średnim podawanym stężeniem w matrycy natywnej (współczynnik rozcieńczenia zastosowany do wyniku rozcieńczonej próbki) a średnim stężeniem rozcieńczalnika do próbek Aptima obliczono dla każdej próbki i pokazano w Tabeli 17 dla osocza i Tabeli 18 dla surowicy.

Tabela 17: Zestawienie porównawcze próbek osocza w matrycy rozcieńczeń 1:100

Matryca osocza Średnie zgłoszone stężenie (Log ₁₀ j.m./mL) n = 5	Rozcieńczalnik Średnie zgłoszone stężenie (Log ₁₀ j.m./mL) n = 10	Różnica Rozcieńczalnik z matrycy osocza (Log ₁₀ j.m./mL)
7,86	7,85	-0,01
7,84	7,83	-0,01
7,78	7,75	-0,03
7,80	7,80	0,00
6,58	6,53	-0,05
6,58	6,52	-0,06
6,58	6,53	-0,05
6,58	6,53	-0,05
9,24 ^a	9,05 ^a	-0,19
9,21 ^a	9,05 ^a	-0,16
9,25 ^a	9,03 ^a	-0,22
9,27 ^a	9,04 ^a	-0,23
9,13 ^a	8,82 ^a	-0,31
9,12 ^a	8,81 ^a	-0,31
9,09 ^a	8,84 ^a	-0,25
9,05 ^a	8,84 ^a	-0,21

^aWzbogacone o plazmidowe DNA.

Tabela 18: Zestawienie porównawcze próbek surowicy w matrycy rozcieńczeń 1:100

Matryca surowicy Średnie zgłoszone stężenie (Log ₁₀ j.m./mL) n = 5	Rozcieńczalnik Średnie zgłoszone stężenie (Log ₁₀ j.m./mL) n = 10	Różnica Rozcieńczalnik z matrycy surowicy (Log ₁₀ j.m./mL)
7,70	7,85	0,15
7,84	7,85	0,01
7,79	7,82	0,03
7,75	7,79	0,04
6,77	6,77	0,00
6,75	6,80	0,05
6,75	6,71	-0,04
6,70	6,73	0,03
9,27 ^a	9,08 ^a	-0,19
9,24 ^a	9,06 ^a	-0,18
9,29 ^a	9,08 ^a	-0,21
9,31 ^a	9,11 ^a	-0,20
9,14 ^a	8,91 ^a	-0,23
9,18 ^a	8,92 ^a	-0,26
9,19 ^a	8,90 ^a	-0,29
9,08 ^a	8,84 ^a	-0,24

^aWzbogacone o plazmidowe DNA.

Potwierdzenie LLoQ w próbkach rozcieńczonych w rozcieńczalniku do próbek Aptima.

LLoQ testu Aptima HBV Quant zostało potwierdzone przy użyciu próbek klinicznych genotypu A wirusa HBV rozcieńczonych w rozcieńczalniku do próbek Aptima. Próbki przygotowano w osoczu i surowicy ludzkiej ujemnej pod względem HBV w stężeniu 21, 30 i 45 j.m./mL. Każdy panel został rozcieńczony w stosunku 1:3 w rozcieńczalniku do próbek Aptima tuż przed badaniem, aby uzyskać końcowe stężenia około 7, 10 i 15 j.m./mL. W ciągu trzech dni przebadano łącznie 36 powtórzeń każdego elementu panelu przy użyciu jednej partii odczynników. Potwierdzono LLoQ ≤ 10 j.m./mL dla osocza i surowicy z HBV rozcieńczonych w rozcieńczalniku do próbek Aptima, jak pokazano w Tabeli 19.

Tabela 19: Potwierdzenie LLoQ – próbki w rozcieńczalniku do próbek Aptima

Matryca	% wykrytych	Aptima	Aptima	SD	Obciążenie	Obliczony TE	Obliczony TAE
		HBV Quant (j.m./mL)	HBV Quant (Log ₁₀ j.m./mL)				
Osocze	100%	3	0,50	0,19	0,10	0,54	0,48
Surowica	100%	2	0,38	0,12	0,46	0,33	0,70

Precyzja rozcieńczonych próbek

Panel precyzyjny Aptima HBV Quant został zbudowany przez rozcieńczenie HBV-dodatniego osocza i plazmidowego DNA wirusa HBV w HBV-ujemnym osoczu klinicznym i surowicy. Panele dodatkowo zostały rozcieńczone w rozcieńczalniku do próbek Aptima. Zostały one przetestowane w pięciu replikatach w każdym przebiegu przez jednego operatora, przy użyciu trzech partii rozcieńczalnika do próbek Aptima na jednym systemie Panther w ciągu trzech dni testowych, po dwie serie dziennie.

Tabela 20 pokazuje precyzję wyników testu (w SD log₁₀ j.m./mL) dla trzech serii rozcieńczalnika do próbek Aptima. Całkowita zmienność wynosiła $\leq 0,15$ SD dla wszystkich elementów panelu i partii rozcieńczalnika.

Tabela 20: Precyzja paneli rozcieńczonych w rozcieńczalniku do próbek Aptima

Matryca	Stężenie docelowe log ₁₀ j.m./mL	Rozcieńczenie	Partia 1 rozcieńczalnika do próbek (n=10)		Partia 2 rozcieńczalnika do próbek (n=10)		Partia 3 rozcieńczalnika do próbek (n=10)		Połączone partie(n=30)	
			Średnia wartość log ₁₀ j.m./mL	SD	Średnia wartość log ₁₀ j.m./mL	SD	Średnia wartość log ₁₀ j.m./mL	SD	Średnia wartość log ₁₀ j.m./mL	SD
Osocze	3,30	Czyste	3,46	0,07	3,43	0,08	3,46	0,06	3,45	0,07
		1:3	3,36	0,09	3,35	0,07	3,39	0,09	3,37	0,08
	4,30	Czyste	4,33	0,06	4,27	0,03	4,41	0,05	4,34	0,08
		1:3	4,34	0,05	4,35	0,05	4,38	0,10	4,35	0,07
	9,18	Czyste	9,13	0,05	9,10	0,03	9,26 ^a	0,15	9,16 ^a	0,11
		1:100	9,18	0,03	9,14	0,04	9,33	0,10	9,21	0,10
Surowica	3,30	Czysta	3,52	0,05	3,48	0,06	3,50	0,07	3,50	0,06
		1:3	3,45	0,08	3,40	0,06	3,39	0,08	3,41	0,07
	4,30	Czysta	4,35	0,05	4,37	0,06	4,43	0,06	4,38	0,06
		1:3	4,35	0,05	4,37	0,05	4,41	0,04	4,37	0,05
	9,18	Czysta	9,08	0,03	9,14	0,05	9,31 ^b	0,12	9,17 ^b	0,12
		1:100	9,18	0,02	9,14	0,03	9,33	0,09	9,22	0,10

SD = odchylenie standardowe.

^a1 replikat wykluczony (powyżej obliczalnego zakresu).

^b2 replikaty wykluczone (powyżej obliczalnego zakresu).

Przenoszenie

Aby ustalić, że system Panther minimalizuje ryzyko fałszywie dodatnich wyników wynikających z kontaminacji przez przeniesienie, przeprowadzono badanie z wykorzystaniem paneli z domieszkami przy użyciu trzech aparatów systemu Panther. Przenoszenie zostało ocenione przy użyciu próbek osocza z wysokim mianem z domieszką DNA wirusa HBV ($8 \log_{10}$ j.m./mL), przeplatanych z próbkami HBV-ujemnymi w układzie szachownicy. Testy przeprowadzono w piętnastu seriach. Ogólny wskaźnik przenoszenia wyniósł 0,14% (1/705).

Powtarzalność

Powtarzalność została oceniona przy użyciu systemu Panther w trzech zewnętrznych ośrodkach w USA. W każdym ośrodku testy przeprowadzało dwóch operatorów. Każdy operator wykonywał dwie serie testów dziennie w ciągu trzech dni, korzystając z trzech partii odczynników. W ramach każdej serii testów badano trzy replikaty każdego elementu panelu. W sumie przebadano 108 powtórzeń każdego elementu panelu.

Powtarzalność testowano przy użyciu elementów panelu przygotowanych z osocza HBV-ujemnego. Dodatnie elementy panelu były dodatnie dla genotypów HBV typu A lub C. Stężenia DNA wirusa HBV mieściły się w zakresie liniowym testu.

Tabela 21 wykazuje powtarzalność i precyzję wyników testów dla każdego dodatniego elementu panelu między ośrodkami, między operatorami/dniami, między partiami, między seriami, w obrębie serii i ogólnie.

Współczynnik zmienności obliczono przy użyciu następującego równania, gdzie σ^2 jest wariancją próby danych po transformacji \log_{10} .

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

Dla wszystkich HBV-dodatnich elementów panelu wartości zgodności wynosiły 100%.

Tabela 21: Powtarzalność stężeń DNA wirusa HBV w teście Aptima HBV Quant w systemie Panther w dodatnich elementach panelu

GT	N	Uzyskana średnia		Procentowy udział w całkowitej wariancji SD (%CV)					Wariancja całkowita SD (%CV)
		j.m./mL	Log ₁₀ j.m./mL	Między ośrodkami	Między operatorami/dniami ^a	Między partiami	Między seriami	W obrębie serii	
A	108	17,6	1,2	0,059 (13,578)	< 0,001 (< 0,001)	0,138 (32,693)	0,090 (20,869)	0,178 (42,883)	0,250 (62,666)
	108	129,4	2,1	0,009 (2,162)	0 (0)	0,074 (17,109)	0,051 (11,869)	0,106 (24,736)	0,139 (32,886)
	107	1056,0	3,0	0,035 (7,994)	0,032 (7,432)	0,014 (3,246)	0,032 (7,356)	0,085 (19,666)	0,103 (24,060)
	108	7663,0	3,9	0 (0)	0,027 (6,262)	0,040 (9,235)	0,044 (10,088)	0,066 (15,194)	0,092 (21,540)
	108	188172,1	5,3	0,027 (6,281)	0,042 (9,707)	0,042 (9,787)	0,030 (6,829)	0,072 (16,689)	0,102 (23,772)
	108	9389094,1	7,0	0,038 (8,846)	0 (0)	0,031 (7,237)	0,064 (14,791)	0,068 (15,756)	0,106 (24,692)
	107	86664677,2	7,9	0,038 (8,692)	0,029 (6,753)	0,020 (4,584)	0,037 (8,635)	0,049 (11,375)	0,081 (18,725)
	107	753726183,2	8,9	0,024 (5,476)	0,052 (11,997)	0,015 (3,499)	0,045 (10,304)	0,053 (12,187)	0,091 (21,163)
	107	17,0	1,2	0,041 (9,521)	0,041 (9,392)	0,074 (17,147)	0,092 (21,438)	0,189 (45,704)	0,230 (57,010)
	108	152,9	2,2	0,035 (8,127)	0 (0)	0,055 (12,706)	0,064 (14,925)	0,131 (30,748)	0,160 (38,013)
C	108	1363,8	3,1	0,042 (9,583)	0,023 (5,316)	0 (0)	0,061 (14,033)	0,055 (12,623)	0,094 (22,002)
	108	9871,9	4,0	0,011 (2,472)	0,014 (3,270)	0,040 (9,337)	0,038 (8,801)	0,059 (13,651)	0,083 (19,291)
	108	217400,5	5,3	0,031 (7,255)	0,047 (10,843)	0,016 (3,791)	0,026 (6,023)	0,063 (14,685)	0,090 (21,044)
	108	12087179,5	7,1	0,046 (10,543)	0 (0)	0,020 (4,652)	0,064 (14,762)	0,073 (16,922)	0,109 (25,501)
	108	57743712,8	7,8	0,044 (10,232)	0,028 (6,472)	0,013 (2,944)	0,043 (10,026)	0,052 (12,010)	0,087 (20,146)
	108	572184754,9	8,7	0,042 (9,711)	0,048 (11,160)	0,028 (6,374)	0,034 (7,740)	0,048 (11,081)	0,091 (21,208)

%CV = współczynnik zmienności logarytmu naturalnego, GT = genotyp, SD = odchylenie standardowe.

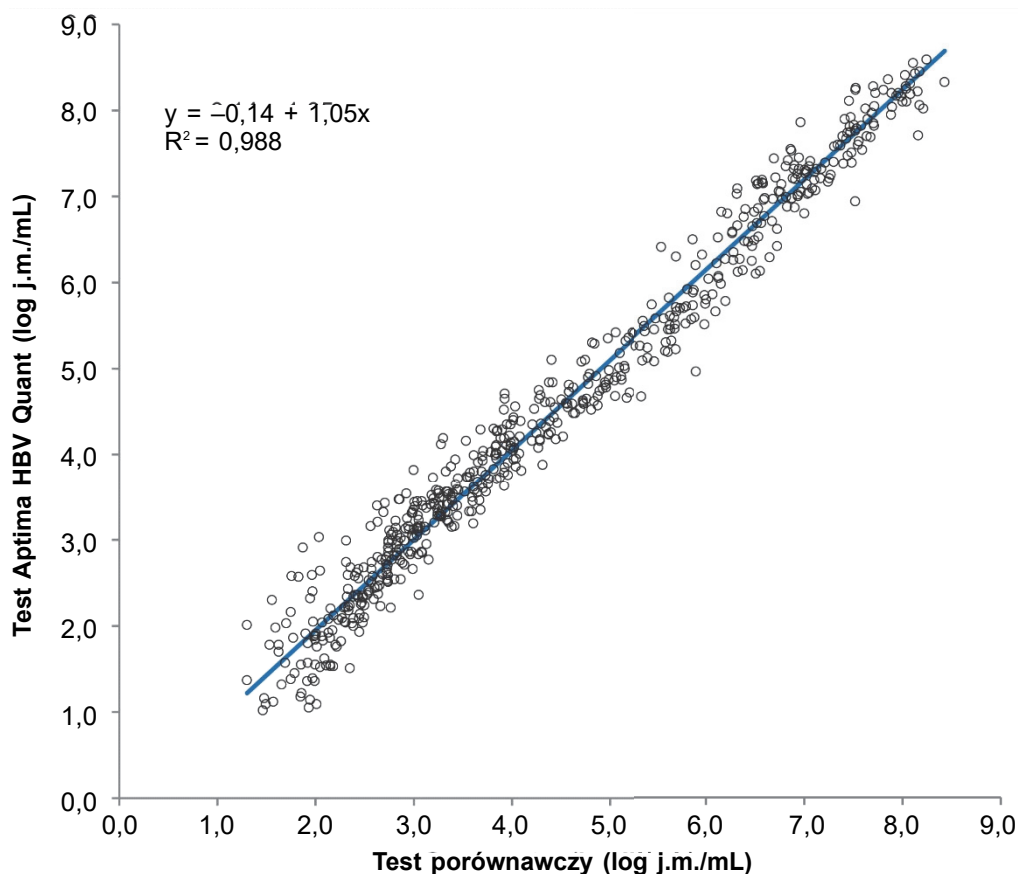
Uwaga: Zmienność w przypadku niektórych czynników może być liczbowo ujemna. Może to nastąpić wtedy, gdy zmienność wywołana tymi czynnikami jest bardzo niska. W takich przypadkach wartości SD i CV przedstawiono jako 0.

^a Wartości Między operatorami można pomylić z wartościami Między dniami, dlatego szacunki Między operatorami i Między dniami są łączone w ramach wartości Między operatorami/Dniami.

Skuteczność kliniczna

Korelacja metod

Skuteczność testu Aptima HBV Quant została oceniona w porównaniu z testem porównawczym mającym znak CE i licencję Health Canada. W tym celu przeprowadzono badanie nierozcieńczonych próbek klinicznych od pacjentów zakażonych wirusem HBV. Do regresji liniowej wykorzystano łącznie 614 próbek klinicznych w zakresie liniowym wspólnym dla obu testów, jak pokazano w Rysunek 9.



Rysunek 9. Korelacja między testem Aptima HBV Quant a testem porównawczym

Użyteczność kliniczna

Badanie miało na celu ocenę zdolności testu Aptima HBV Quant do przewidywania wirusologicznych, biochemicznych i serologicznych punktów końcowych użyteczności klinicznej po 48 tygodniach od rozpoczęcia terapii. Próbkę zostały pobrane prospektywnie od osób z przewlekłym zakażeniem HBV, u których rozpoczęto monoterapię entekawirem lub tenofowirem w ramach standardowego leczenia.

Z 331 włączonych uczestników, 86 uczestników nie mogło zostać ocenionych z powodu wycofania, przerwania, wczesnego przerwania leczenia, braku wyników z tygodnia 48., braku lub niskiej wyjściowej wirerii DNA wirusa HBV. Pozostałych 245 osób można było ocenić pod kątem co najmniej jednego z punktów końcowych dotyczących przydatności klinicznej. Wśród nich było 126 osób z HBeAg(+) i 119 osób z HBeAg(-). Tabela 22 przedstawia dane demograficzne i wyjściowe cechy kliniczne osób podlegających ocenie. Rozkład demograficzny uczestników tego badania był zgodny z rozkładem demograficznym pacjentów z przewlekłą chorobą HBV w USA. Dane osób z HBeAg(+) i HBeAg(-) zostały przeanalizowane oddzielnie.

Tabela 22: Dane demograficzne i wyjściowa charakterystyka kliniczna ocenianych uczestników

Charakterystyka		Ogółem
Ogółem, N	N	245
Entekawir	n (%)	94 (38,4)
Tenofowir	n (%)	151 (61,6)
Płeć, n (%)	Mężczyzna	154 (62,9)
	Kobieta	91 (37,1)
Wiek (lata)	Średnia ± SD	43,5 ± 13,63
	Mediana	44,0
	Zakres	18–83
Kategoria wiekowa (lata), n (%)	18–29	40 (16,3)
	30–49, n (%)	120 (49,0)
	50–70, n (%)	80 (32,7)
	>70, n (%)	5 (2,0)
Pochodzenie etniczne, n (%)	Latynos lub Latynoska	7 (2,9)
	Inne niż Latynos lub Latynoska	236 (96,3)
	Nieznane/Odmowa	2 (0,8)
Rasa ^a , n (%)	Biała	89 (36,3)
	Czarnoskóry(-a) lub Afroamerykanin(-nka)	16 (6,5)
	Azjatycka	132 (53,9)
	Rdzenny mieszkaniec Ameryki/ Rdzenny mieszkaniec Alaski	0 (0,0)
	Rdzenny mieszkaniec Hawajów / mieszkaniec Wysp Pacyficznych	6 (2,4)
Genotyp, n (%)	Inne	1 (0,4)
	Nieznane/Odmowa	1 (0,4)
	A	28 (11,4)
	B	64 (26,1)
	C	36 (14,7)
	D	47 (19,2)
	E	2 (0,8)
	F	0 (0,0)
	G	0 (0,0)
H	3 (1,2)	
Status leczenia HBV, n (%)	Nieznane	65 (26,5)
	Doświadczony	27 (11,0)
Poprzednie leczenie farmakologiczne, n (%)	Niedoświadczony	218 (89,0)
	Tenofowir	5 (18,5)
	Entekawir	4 (14,8)
	Adefowir	2 (7,4)
	Lamiwudyna	1 (3,7)
	Telbiwudyna	0 (0,0)
	Interferon	10 (37,0)
Inne ^b	5 (18,5)	
Poprzedni wynik leczenia, n (%)	Niepowodzenie	1 (3,7)
	Powodzenie	0 (0,0)
	Przerwane z innego powodu	26 (96,3)
Wynik na obecność markera serologicznego HBsAg, n (%)	Dodatni/reaktywny	210 (85,7)
	Nie wykonano	35 (14,3)

Tabela 22: Dane demograficzne i wyjściowa charakterystyka kliniczna ocenianych uczestników (ciąg dalszy)

Charakterystyka	Ogółem	
Status marskości wątroby, n (%)	Marskość wątroby	26 (10,6)
	Inne niż marskość wątroby	201 (82,0)
	Nie wykonano	18 (7,3)
Obciążenie wirusowe HBV (log ₁₀ j.m./mL)	Średnia ± SD	6,3 ± 1,93
	Mediana	6,4
	Zakres	3–9
ALT (U/L)	Średnia ± SD	102,4 ± 175,97
	Liczba powyżej ULN ^c	177 (85,9)

^a Badani mogą zgłaszać wiele ras.

^b Różne skojarzenia wymienionych leków.

^c Górna granica normy (ULN) dla aminotransferazy alaninowej (ALT) wynosiła 30 U/L dla mężczyzn i 19 U/L dla kobiet.

Przewidywana reakcja na terapię przeciwwirusową

Użyteczność kliniczna testu Aptima HBV Quant została oceniona dla osób leczonych tenofowirem i entekawirem. W przypadku stosowania innych terapii przeciwwirusowych HBV nie są dostępne informacje na temat przydatności klinicznej testu.

Definicje:

Wyniki wczesnej reakcji wirusologicznej

Odpowiedź wirusologiczna w 12. i 24. tygodniu = DNA wirusa HBV <10 j.m./mL (<LLOQ) oceniane za pomocą testu Aptima HBV Quant w systemie Panther

Alternatywna reakcja wirusologiczna w 12. tygodniu = spadek DNA wirusa HBV $\geq 2 \log_{10}$ w stosunku do wartości wyjściowej

Alternatywna reakcja wirusologiczna w 24. tygodniu = DNA wirusa HBV <2000 j.m./mL (dla HBeAg+) lub <50 j.m./mL (dla HBeAg-)

Punkty końcowe użyteczności klinicznej

Reakcja wirusologiczna w 48. tygodniu = DNA wirusa HBV <10 j.m./mL (<LLOQ) według wyników zatwierdzonego testu ilościowego HBV

Alternatywna reakcja wirusologiczna w 48. tygodniu = DNA wirusa HBV <50 j.m./mL według oceny zatwierdzonego testu ilościowego HBV

Reakcja biochemiczna = normalizacja wyników testu ALT w 48. tygodniu (ALT <30 U/L dla mężczyzn i <19 U/L dla kobiet)

Reakcja serologiczna = utrata HBeAg (wyniki HBeAg-ujemne) w 48. tygodniu

Miary skojarzeń i wartość predykcyjna

Dodatnia wartość predykcyjna (PPV) = wynik prawdziwie dodatni / (wynik prawdziwie dodatni + wynik fałszywie dodatni) lub prawdopodobieństwo wystąpienia reakcji w 48. tygodniu (dla ocenianego punktu końcowego użyteczności klinicznej) u osób, u których wystąpiła reakcja wirusologiczna we wczesnym okresie

Ujemna wartość predykcyjna (NPV) = wynik prawdziwie ujemny / (wynik fałszywie ujemny + wynik prawdziwie ujemny) lub prawdopodobieństwo braku reakcji w 48. tygodniu (dla ocenianego punktu końcowego użyteczności klinicznej) u osób, u których nie wystąpiła reakcja wirusologiczna we wczesnym okresie

Współczynnik szans (OR) = (wynik prawdziwie dodatni × wynik prawdziwie ujemny) / (wynik fałszywie dodatni × wynik fałszywie ujemny)

Przewidywana reakcja wirusologiczna w 48. tygodniu, określona jako DNA wirusa HBV <10 j.m./mL

W tym badaniu pierwotną definicją odpowiedzi wirusologicznej było DNA wirusa HBV <10 j.m./mL i ta definicja była stosowana zarówno dla wczesnej reakcji wirusologicznej w tygodniach 12. i 24., jak i reakcji wirusologicznej w tygodniu 48. Oceniano związek między wczesnymi reakcjami wirusologicznymi w tygodniach 12. i 24. a punktami końcowymi użyteczności klinicznej w tygodniu 48. (reakcja wirusologiczna, reakcja biochemiczna, reakcja serologiczna).

Przewidywanie odpowiedzi wirusologicznej w 48. tygodniu

Związki pomiędzy reakcją wirusologiczną w tygodniu 48. a reakcją wirusologiczną w tygodniu 12. i 24. podsumowano w Tabeli 23.

Wczesne reakcje wirusologiczne w tygodniach 12. i 24., jako predyktory reakcji wirusologicznej w tygodniu 48., różniły się w zależności od tygodnia i leczenia.

Tabela 23: PPV, NPV i współczynniki szans dla reakcji wirusologicznej przewidywanej na podstawie wczesnej odpowiedzi wirusologicznej podczas leczenia: Reakcja wirusologiczna w 48. tygodniu definiowana jako <10 j.m./mL

Status HBeAg	Tydzień wczesnej reakcji wirusologicznej	Leczenie	PPV (%)		NPV (%)		LUB
			Szacunek (95% CI)	n/N	Szacunek (95% CI)	n/N	Szacunek (95% CI) ^{a,b}
HBeAg(+)	12	Entekawir	0,0 (0,0, 93,2)	0/1	82,5 (80,0, 88,4)	33/40	1,49 (<0,01; 30,95)
		Tenofowir	100 (27,3, 100)	2/2	74,4 (72,6, 78,7)	61/82	14,30 (1,11, >999,99)
		Ogółem	66,7 (15,4, 98,2)	2/3	77,0 (75,7, 79,9)	94/122	6,71 (0,62, 147,55)
	24	Entekawir	50,0 (6,4, 93,2)	2/4	88,2 (83,5, 95,4)	30/34	7,50 (0,74, 79,76)
		Tenofowir	75,0 (52,7, 92,3)	12/16	84,1 (78,5, 90,0)	58/69	15,81 (4,62, 65,54)
		Ogółem	70,0 (50,3, 88,1)	14/20	85,4 (81,3, 90,1)	88/103	13,69 (4,74, 44,16)
HBeAg(-)	12	Entekawir	94,1 (87,1, 99,0)	32/34	22,2 (7,6, 36,0)	4/18	4,57 (0,80, 35,85)
		Tenofowir	83,3 (70,5, 93,2)	25/30	46,9 (35,0, 58,9)	15/32	4,41 (1,42, 15,71)
		Ogółem	89,1 (82,1, 94,7)	57/64	38,0 (29,0, 47,1)	19/50	4,99 (1,96, 14,00)
	24	Entekawir	93,0 (88,0, 98,1)	40/43	37,5 (6,4, 67,2)	3/8	8,00 (1,21, 55,54)
		Tenofowir	82,6 (74,3, 90,4)	38/46	75,0 (54,1, 92,0)	12/16	14,25 (3,92, 62,71)
		Ogółem	87,6 (82,7, 92,6)	78/89	62,5 (44,8, 78,0)	15/24	11,82 (4,30, 34,94)

CI = 95% przedział ufności prawdopodobieństwa profilu

^a Zacienienie wskazuje na istotność statystyczną ilorazów szans.

^b W celu obliczenia ilorazów szans i ich przedziałów ufności, do wszystkich komórek dodano 0,5, gdy przynajmniej jedna komórka miała wartość zero.

Przewidywanie reakcji biochemicznej w 48. tygodniu

Związki pomiędzy reakcją biochemiczną w tygodniu 48. a reakcją wirusologiczną w tygodniu 12. i 24. podsumowane w Tabeli 24.

Wartość wczesnych reakcji wirusologicznych w tygodniach 12. i 24. jako predyktor reakcji biochemicznej w tygodniu 48. różniła się w zależności od tygodnia i leczenia.

Tabela 24: PPV, NPV i ilorazy szans dla reakcji biochemicznej przewidywanej na podstawie wczesnej odpowiedzi wirusologicznej podczas leczenia: Reakcja wirusologiczna w 48. tygodniu definiowana jako <10 j.m./mL

Status HBeAg	Tydzień wczesnej reakcji wirusologicznej	Leczenie	PPV (%)		NPV (%)		LUB
			Szacunek (95% CI)	n/N	Szacunek (95% CI)	n/N	Szacunek (95% CI) ^a
HBeAg(+)	12	Entekawir	NC (NC)	0/0	67,9 (63,4-76,1)	19/28	2,05 (0,01-393,52)
		Tenofowir	100 (27,6, 100)	2/2	58,5 (55,1, 63,9)	31/53	7,00 (0,54, 983,90)
		Ogółem	100 (27,3, 100)	2/2	61,7 (59,7, 65,5)	50/81	8,02 (0,63, >999,99)
	24	Entekawir	66,7 (16,4-98,2)	2/3	68,2 (60,1-80,0)	15/22	4,29 (0,35-101,82)
		Tenofowir	58,3 (33,2, 81,0)	7/12	61,4 (54,3, 69,7)	27/44	2,22 (0,61, 8,61)
		Ogółem	60,0 (36,6, 80,9)	9/15	63,6 (58,2, 70,0)	42/66	2,62 (0,84, 8,70)
HBeAg(-)	12	Entekawir	43,8 (25,1, 61,2)	7/16	50,0 (25,1, 74,9)	6/12	0,78 (0,17, 3,53)
		Tenofowir	52,9 (35,1, 72,2)	9/17	76,2 (61,2, 89,8)	16/21	3,60 (0,93, 15,39)
		Ogółem	48,5 (36,0, 60,9)	16/33	66,7 (54,5, 78,6)	22/33	1,88 (0,70, 5,20)
	24	Entekawir	45,8 (36,0, 56,0)	11/24	75,0 (25,2, 98,7)	3/4	2,54 (0,28, 55,45)
		Tenofowir	42,9 (32,8, 53,1)	12/28	80,0 (53,0, 97,1)	8/10	3,00 (0,61, 22,34)
		Ogółem	44,2 (37,8, 50,8)	23/52	78,6 (55,1, 95,0)	11/14	2,91 (0,80, 13,98)

CI = 95% przedział ufności prawdopodobieństwa profilu, NC = nieobliczalne

^aW celu obliczenia współczynników szans i ich przedziałów ufności, do wszystkich komórek dodano 0,5, gdy przynajmniej jedna komórka miała wartość zero.

Przewidywanie odpowiedzi serologicznej w 48. tygodniu

Związki pomiędzy reakcją serologiczną w tygodniu 48. a reakcją wirusologiczną w tygodniu 12. i 24. podsumowane w Tabela 25.

Wartość wczesnych reakcji wirusologicznych w tygodniach 12. i 24. jako predyktor reakcji serologicznej w tygodniu 48. różniła się w zależności od tygodnia i leczenia.

Tabela 25: PPV, NPV i współczynniki szans dla reakcji serologicznej przewidywanej na podstawie wczesnej odpowiedzi wirusologicznej podczas leczenia: Reakcja wirusologiczna w 48. tygodniu definiowana jako <10 j.m./mL

Status HBeAg	Tydzień wczesnej reakcji wirusologicznej	Leczenie	PPV (%)		NPV (%)		LUB
			Szacunek (95% CI)	n/N	Szacunek (95% CI)	n/N	Szacunek (95% CI) ^a
HBeAg(+)	12	Entekawir	100 (6,5, 100)	1/1	86,8 (84,2, 93,9)	33/38	18,27 (0,86, >999,99)
		Tenofowir	0,0 (0,0, 72,0)	0/2	82,9 (81,7, 86,0)	68/82	0,95 (<0,01; 12,45)
		Ogółem	33,3 (1,8, 84,3)	1/3	84,2 (83,1, 86,8)	101/120	2,66 (0,12, 29,11)
	24	Entekawir	50,0 (6,4, 93,2)	2/4	88,2 (83,5, 95,4)	30/34	7,50 (0,74, 79,76)
		Tenofowir	18,8 (3,1, 39,1)	3/16	84,1 (80,6, 89,1)	58/69	1,22 (0,25, 4,59)
		Ogółem	25,0 (8,5, 43,6)	5/20	85,4 (82,5, 89,4)	88/103	1,96 (0,57, 5,94)

CI = 95% przedział ufności prawdopodobieństwa profilu

^a W celu obliczenia ilorazów szans i ich przedziałów ufności, do wszystkich komórek dodano 0,5, gdy przynajmniej jedna komórka miała wartość zero.

Przewidywana reakcja wirusologiczna w 48. tygodniu, określona jako DNA wirusa HBV <50 j.m./mL (Definicja alternatywna)

Oceniono również alternatywne definicje reakcji wirusologicznej wczesnej (tydzień 12. i 24.) i w tygodniu 48. (patrz alternatywne definicje reakcji powyżej).

Związki między punktami końcowymi użyteczności klinicznej a reakcją wirusologiczną w tygodniu 12. i 24., przy zastosowaniu tych alternatywnych definicji reakcji wirusologicznej, podsumowano w Tabela 26 (reakcja wirusologiczna), Tabela 27 (reakcja biochemiczna) oraz Tabela 28 (reakcja serologiczna).

Tabela 26: PPV, NPV i współczynniki szans dla reakcji wirusologicznej przewidywanej na podstawie wczesnej odpowiedzi wirusologicznej podczas leczenia: Reakcja wirusologiczna w 48. tygodniu definiowana jako <50 j.m./mL

Status HBeAg	Tydzień wczesnej reakcji wirusologicznej	Leczenie	PPV (%)		NPV (%)		LUB
			Szacunek (95% CI)	n/N	Szacunek (95% CI)	n/N	Szacunek (95% CI) ^{a,b}
HBeAg(+)	12	Entekawir	34,2 (26,9, 39,2)	13/38	66,7 (16,1, 98,2)	2/3	1,04 (0,09, 23,60)
		Tenofowir	55,1 (51,9, 59,4)	43/78	83,3 (43,5, 99,2)	5/6	6,14 (0,93, 120,54)
		Ogółem	48,3 (45,6, 51,3)	56/116	77,8 (45,3, 97,1)	7/9	3,27 (0,75, 22,54)
	24	Entekawir	65,0 (51,3, 81,2)	13/20	100 (86,3, 100)	18/18	66,59 (7,20, >999,99)
		Tenofowir	72,4 (64,7, 80,6)	42/58	88,9 (74,6, 97,2)	24/27	21,00 (6,28, 97,36)
		Ogółem	70,5 (63,5, 77,9)	55/78	93,3 (84,0, 98,3)	42/45	33,47 (10,81, 148,13)
HBeAg(-)	12	Entekawir	100 (NC)	52/52	NC (NC)	0/0	NC
		Tenofowir	93,0 (89,1, 97,5)	53/57	60,0 (21,3, 93,3)	3/5	19,87 (2,62, 191,49)
		Ogółem	96,3 (94,4, 98,7)	105/109	60,0 (21,1, 93,3)	3/5	39,37 (5,24, 376,77)
	24	Entekawir	100 (NC)	47/47	0,0 (NC)	0/4	NC
		Tenofowir	93,9 (88,6, 98,3)	46/49	30,8 (6,7, 52,4)	4/13	6,81 (1,30, 39,97)
		Ogółem	96,9 (93,8, 99,2)	93/96	23,5 (7,0, 39,8)	4/17	9,54 (1,91, 53,22)

CI = 95% przedział ufności prawdopodobieństwa profilu, NC = nieobliczalne

^a Zacienienie wskazuje na istotność statystyczną ilorazów szans.

^b W celu obliczenia ilorazów szans i ich przedziałów ufności, do wszystkich komórek dodano 0,5, gdy przynajmniej jedna komórka miała wartość zero, chyba że nie było reakcji w tygodniu 48. lub nie było braku reakcji w tygodniu 48., co skutkowało podaniem ilorazu szans jako NC.

Tabela 27: PPV, NPV i ilorazy szans dla reakcji biochemicznej przewidywanej na podstawie wczesnej odpowiedzi wirusologicznej podczas leczenia: Reakcja wirusologiczna w 48. tygodniu definiowana jako <50 j.m./mL

Status HBeAg	Tydzień wczesnej reakcji wirusologicznej	Leczenie	PPV		NPV		LUB
			Szacunek (95% CI)	n/N	Szacunek (95% CI)	n/N	Szacunek (95% CI) ^{a,b}
HBeAg(+)	12	Entekawir	33,3 (25,1–39,0)	9/27	100 (6,7–100)	1/1	1,54 (0,07–233,77)
		Tenofowir	44,2 (39,6, 48,6)	23/52	66,7 (15,7, 98,2)	2/3	1,59 (0,14, 35,36)
		Ogółem	40,5 (37,1, 43,7)	32/79	75,0 (23,9, 98,7)	3/4	2,04 (0,25, 42,30)
	24	Entekawir	50,0 (31,2–69,5)	7/14	81,8 (58,9–97,1)	9/11	4,50 (0,79–37,15)
		Tenofowir	52,5 (44,0, 61,8)	21/40	81,3 (60,1–96,7)	13/16	4,79 (1,30, 23,28)
		Ogółem	51,9 (44,1, 60,2)	28/54	81,5 (66,4, 93,1)	22/27	4,74 (1,66, 15,82)
HBeAg(-)	12	Entekawir	46,4 (39,5, 52,6)	13/28	NC (NC)	0/0	0,87 (<0,01; 166,17)
		Tenofowir	40,0 (33,6, 46,3)	14/35	100 (41,4, 100)	3/3	4,72 (0,41, 653,11)
		Ogółem	42,9 (39,6, 46,7)	27/63	100 (41,2, 100)	3/3	5,27 (0,48, 720,38)
	24	Entekawir	44,0 (34,4, 52,7)	11/25	66,7 (16,3–98,2)	2/3	1,57 (0,13, 36,42)
		Tenofowir	41,4 (31,3, 51,1)	12/29	77,8 (48,6, 97,1)	7/9	2,47 (0,49, 18,57)
		Ogółem	42,6 (36,4, 48,9)	23/54	75,0 (48,8, 93,7)	9/12	2,23 (0,59, 10,87)

CI = 95% przedział ufności prawdopodobieństwa profilu

^a Zacienienie wskazuje na istotność statystyczną ilorazów szans.

^b W celu obliczenia ilorazów szans i ich przedziałów ufności, do wszystkich komórek dodano 0,5, gdy przynajmniej jedna komórka miała wartość zero.

Tabela 28: PPV, NPV i współczynniki szans dla reakcji serologicznej przewidywanej na podstawie wczesnej odpowiedzi wirusologicznej podczas leczenia: Reakcja wirusologiczna w 48. tygodniu definiowana jako <50 j.m./mL

Status HBeAg	Tydzień wczesnej reakcji wirusologicznej	Leczenie	PPV		NPV		LUB
			Szacunek (95% CI)	n/N	Szacunek (95% CI)	n/N	Szacunek (95% CI) ^{a,b}
HBeAg(+)	12	Entekawir	16,7 (10,4, 19,6)	6/36	100 (44,1, 100)	3/3	1,49 (0,12, 209,89)
		Tenofowir	16,7 (12,9, 18,6)	13/78	83,3 (44,2, 99,2)	5/6	1,00 (0,14, 19,98)
		Ogółem	16,7 (13,9, 18,1)	19/114	88,9 (58,8, 99,5)	8/9	1,60 (0,27, 30,56)
	24	Entekawir	30,0 (16,5, 41,6)	6/20	100 (86,3, 100)	18/18	16,59 (1,72, >999,99)
		Tenofowir	22,4 (16,9, 26,8)	13/58	96,3 (84,7, 99,9)	26/27	7,51 (1,37, 140,31)
		Ogółem	24,4 (20,0, 28,4)	19/78	97,8 (90,4, 99,9)	44/45	14,17 (2,77, 259,25)

CI = 95% przedział ufności prawdopodobieństwa profilu

^a Zacienienie wskazuje na istotność statystyczną ilorazów szans.

^b W celu obliczenia ilorazów szans i ich przedziałów ufności, do wszystkich komórek dodano 0,5, gdy przynajmniej jedna komórka miała wartość zero.

Wniosek

Ogólnie rzecz biorąc, wyniki pokazują, że test Aptima HBV Quant może określać ilościowo poziom DNA wirusa HBV na poziomie wyjściowym i podczas leczenia, co ułatwia ocenę odpowiedzi wirusowej na leczenie. Badanie to wykazało, że wczesna reakcja wirusologiczna w tygodniach 12. i 24., jako predyktor odpowiedzi wirusologicznej w tygodniu 48., różni się w zależności od tygodnia i leczenia.

Test Aptima HBV Quant może być stosowany jako pomoc w prowadzeniu pacjentów przewlekle zakażonych wirusem HBV, którzy są poddawani terapii lekami przeciwwirusowymi HBV.

Bibliografia

1. **World Health Organization.** Global progress report on HIV, viral hepatitis and sexually transmitted infections, 2021. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240027077>. Dostęp: wrzesień 2022 r.
2. **Liaw YF, Chu CM.** Hepatitis B virus infection. *Lancet.* 2009;373(9663):582-592.
3. **European Association for the Study of the Liver.** EASL Clinical Practice Guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. *Journal of Hepatology* 2012; 57:167-185.
4. **International Agency for Research on Cancer.** Hepatitis B Virus. IARC Monographs 2012; 100B: 93-133.
5. **Price, J.** An Update on Hepatitis B, D, and E Viruses. *Topics in Antiviral Medicine* 2014; 21(5): 157-163.
6. **Terrault NA, Bzowej NH, Chang KM, Hwang JP, Jonas MM, Murad MH; American Association for the Study of Liver Diseases.** AASLD guidelines for treatment of chronic hepatitis B. *Hepatology.* 2016 Jan;63(1):261-83.
7. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2005. Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods; Approved Guideline. CLSI Document MM13-A. Wayne, PA.
8. **29 CFR Part 1910.1030.** Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens; current version.
9. **Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health.** Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL); wersja bieżąca.
10. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2002. Clinical Laboratory Waste Management. CLSI dokument GP5-A2. Villanova, PA.
11. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2012. Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline – Second Edition. CLSI dokument EP17-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
12. **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
13. **Ghany MG, Perrillo R, Li R, et al.** Characteristics of adults in the Hepatitis B Research Network in North America reflect their country of origin and hepatitis B virus genotype. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2015;13(1):183-192. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.cgh.2014.06.028>.

Dane kontaktowe i historia wersji



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



Hologic BV
Da Vincilaan 5
1930 Zaventem
Belgium

Sponsor w Australii

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

Adres e-mail i numer telefonu działu pomocy technicznej i obsługi klienta właściwe dla danego kraju można znaleźć na stronie www.hologic.com/support.

W Unii Europejskiej należy zgłaszać poważne incydenty, które wystąpiły w związku z wyrobem, do wytwórcy i właściwego organu państwa członkowskiego, w którym użytkownik i/lub pacjent ma siedzibę/miejsce zamieszkania.

Hologic, Aptima, Panther, Panther Fusion oraz powiązane logo są znakami towarowymi i/lub zastrzeżonymi znakami towarowymi firmy Hologic, Inc. i/lub jednostek zależnych w Stanach Zjednoczonych i/lub innych państwach. Wszystkie inne znaki towarowe, które mogą się pojawić w tej ulotce załączonej do opakowania, należą do ich odpowiednich właścicieli.

Wszystkie inne znaki towarowe, które mogą się pojawić w tej ulotce załączonej do opakowania, należą do ich odpowiednich właścicieli.

Opisywany produkt może być objęty co najmniej jednym patentem USA spośród wymienionych na stronie www.hologic.com/patents.

© 2017–2025 Hologic, Inc. Wszelkie prawa zastrzeżone.

AW-28215-3401 wersja 003

2025-10

Historia zmian	Data	Opis
AW-28215-3401 wersja 001	Lipiec 2025 r.	<ul style="list-style-type: none"> Pierwsze wydanie nowej Instrukcji użycia testu Aptima HBV AW-28215 wersja 001 ma na celu zapewnienie zgodności z przepisami IVDR i zastąpi test AW-13182.
AW-28215-3401 wersja 002	Sierpień 2025 r.	<ul style="list-style-type: none"> Aktualizacja znaków towarowych w celu spełnienia wymogów BSI.
AW-28215-3401 wersja. 003	Październik 2025 r.	<ul style="list-style-type: none"> Dodano opcję dotyczącą stojaka na próbówki Zaktualizowano kartę charakterystyki