

## Aptima® HBV Quant Assay

Gebrauchsanweisung  
Zur *in-vitro*-diagnostischen Anwendung  
Nur für den U.S.-Export

<b>Allgemeine Informationen</b> .....	<b>2</b>
Verwendungszweck .....	2
Zusammenfassung und Testerklärung .....	2
Verfahrensprinzipien .....	3
Zusammenfassung von Sicherheit und Leistung .....	3
Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen .....	4
Lagerungs- und Handhabungsbedingungen für Reagenzien .....	9
Probenentnahme und -lagerung .....	10
Proben im Panther System .....	13
Transport von Patientenproben .....	13
<b>Panther System</b> .....	<b>14</b>
Im Lieferumfang enthaltene Reagenzien und Materialien .....	14
Erforderliche, jedoch nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien .....	15
Optionale Materialien .....	16
Testverfahren mit dem Panther System .....	17
Verfahrenshinweise .....	21
<b>Qualitätskontrolle</b> .....	<b>22</b>
Assay-Kalibrierung .....	22
Negativ- und Positivkontrollen .....	22
Interner Kalibrator/Interne Kontrolle .....	22
<b>Interpretation der Ergebnisse</b> .....	<b>23</b>
<b>Einschränkungen</b> .....	<b>24</b>
<b>Analytische Leistung</b> .....	<b>25</b>
Nachweisgrenze mit dem 3. Internationalen WHO-Standard .....	25
Nachweisgrenze bei HBV-Genotypen .....	25
Linearer Bereich .....	26
Linearität bei HBV-Genotypen .....	27
Untere Quantifizierungsgrenze mit dem 3. Internationalen WHO-Standard .....	27
Untere Qualifizierungsgrenze bei HBV-Genotypen .....	29
Rückführbarkeit auf den 3. Internationalen WHO-Standard .....	31
Präzision .....	31
Mögliche interferierende Substanzen .....	33
Analytische Spezifität .....	35
Matrix-Äquivalenz .....	36
Probenverdünnung mit Aptima Probenverdünnner (1:3) .....	36
Probenverdünnung mit Aptima Probenverdünnner (1:100) .....	37
Bestätigung der LLoQ in mit Aptima Probenverdünnner verdünnten Proben .....	39
Präzision verdünnter Proben .....	39
Verschleppung .....	40
Reproduzierbarkeit .....	40
<b>Klinische Leistungsdaten</b> .....	<b>42</b>
Methodenkorrelation .....	42
Klinischer Nutzen .....	42
<b>Bibliographie</b> .....	<b>51</b>
<b>Kontaktinformationen und Änderungsprotokoll</b> .....	<b>52</b>

## Allgemeine Informationen

### Verwendungszweck

Der Aptima® HBV Quant Assay ist ein In-vitro-Nukleinsäure-Amplifikationstest zur Quantifizierung der DNA des Hepatitis-B-Virus (HBV) in Humanplasma und -serum auf dem voll automatisierten Panther™ System.

Das Plasma kann in Ethyldiamintetraacetat (EDTA), gerinnungshemmender Acid-Citrate-Dextrose-Lösung (ACD-Stabilisator) und Plasmavorbereitungsröhrchen (PPTs) vorbereitet werden. Das Serum kann in Serumröhrchen und Serum-Separator-Röhrchen (SSTs) vorbereitet werden. Die Aufbereitung, Amplifikation und Quantifizierung der Proben für den Test erfolgen auf dem voll automatischen Panther System. Proben, die HBV-Genotypen A, B, C, D, E, F, G und H enthalten, sind im Assay für die Quantifizierung validiert.

Der Aptima HBV Quant Assay ist als Hilfsmittel bei der Betreuung von chronisch HBV-infizierten Patienten vorgesehen, die sich einer antiviralen medikamentösen HBV-Therapie unterziehen. Der Test kann verwendet werden, um den HBV-DNA-Spiegel zu Beginn und während der Behandlung zu messen, um so das virologische Ansprechen auf die Therapie beurteilen zu können. Die Ergebnisse des Aptima HBV Quant Assays sind im Kontext aller relevanten klinischen und laborbezogenen Erkenntnisse zu deuten.

Der Aptima HBV Quant Assay ist weder für das Screening auf das Vorhandensein von HBV-DNA in Blut und Blutprodukten geeignet noch als Diagnostikum zur Bestätigung einer vorliegenden HBV-Infektion.

### Zusammenfassung und Testerklärung

Als einer der bekannten viralen Auslöser einer Hepatitis wird das Hepatitis-B-Virus mit chronischer HBV-Infektion, Leberzirrhose, Leberkarzinom, Leberinsuffizienz-/versagen bis hin zu Todesfällen in Verbindung gebracht. Laut der Weltgesundheitsorganisation (WHO) handelt es sich bei der HBV-Infektion um eine der häufigsten Infektionskrankheiten überhaupt. Weltweit zeigen Prävalenz und Übertragungswege der HBV-Infektion große Unterschiede. Im Jahr 2019 lebten geschätzte 296 Millionen Personen weltweit mit einer chronischen HBV-Infektion.<sup>1</sup> Eine HBV-Infektion führt zu einem erhöhten Risiko einer hepatischen Dekompensation, Zirrhose und eines hepatzellulären Karzinoms (HCC) mit einer Mortalität von jährlich 0,5 bis 1,2 Millionen Todesfällen und 5 - 10 % Fällen mit einer Lebertransplantation weltweit.<sup>2,3</sup> Ohne angemessene Behandlung, Intervention und Überwachung nach der Diagnose variiert die kumulative 5-Jahres-Inzidenz einer Zirrhose von 8 - 20 %. Nachdem eine Zirrhose vorliegt, steigt das Risiko, an einem hepatzellulären Karzinom zu erkranken, jährlich um 2 - 5 %.<sup>4</sup>

Das Genom des HBV besteht aus zirkulär-geschlossener DNA, jedoch ist die DNA nicht vollständig doppelsträngig; sie enthält etwa 3.200 Basenpaare, die vier sich teilweise überlappende offene Leserahmen (ORF) kodieren, welche die Polymerase-, Oberflächen-, Präkern-/Kern- und X-Proteine exprimieren. Der Polymerase-ORF überlappt die drei anderen ORFs und kodiert die Polymerase, ein Schlüsselprotein für die Virusreplikation. Der Oberflächen-ORF exprimiert drei Proteine, die für die Morphogenese des Virus, das Einschleusen des Virus in die Hepatozyten und das Auslösen der Immunreaktion des Wirts von entscheidender Bedeutung sind.<sup>5</sup> Es gibt 8 HBV-Genotypen (A-H), die sich typischerweise in unterschiedlichen geografischen Gegenden finden.

Aufgrund der Dynamik von chronischen Hepatitis-B-Infektionen ist eine kontinuierliche Überwachung der HBV-DNA und der Alaninaminotransferase (ALT)-Werte wichtig.<sup>6</sup> Bei der Mehrheit der Personen mit einer HBV-Infektion, die sich einer antiviralen Therapie unterziehen, ist das Ziel die Unterdrückung der HBV-DNA. Quantitative Nukleinsäuretests mit einem großen linearen Bereich sind wirksame Werkzeuge zur Überwachung der HBV-DNA-Viruslast während des Behandlungsverlaufs.

## Verfahrensprinzipien

Der Aptima HBV Quant Assay ist ein *In-vitro*-Nukleinsäure-Amplifikationstest mit der transkriptionsvermittelten Amplifikationstechnik (TMA - Transcription Mediated Amplification) des Panther-Systems zur Quantifizierung der HBV-DNA der Genotypen A, B, C, D, E, F, G und H. Der Aptima HBV Quant Assay zielt auf hoch konservierte Regionen in den Polymerase- und den Oberflächengenen (für eine erhöhte Toleranz gegenüber potenziellen Mutationen) ab. Der Assay ist auf den 3. Internationalen Standard der WHO für das Hepatitis-B-Virus standardisiert (NIBSC-Kode: 10/264).

Der Aptima HBV Quant Assay umfasst drei Hauptschritte, die alle in einem einzigen Röhrchen auf dem Panther System stattfinden: Target Capture, Target-Amplifikation durch transkriptionsvermittelte Amplifikation (TMA) und Detektion der Amplifikationsprodukte (Amplikons) mithilfe der fluoreszenzmarkierten Sonden (Torches).

Beim Target Capture wird die Virus-DNA von den Proben isoliert. Die Patientenprobe wird mit einem Detergens behandelt, um die Virushülle zu solubilisieren, Proteine zu denaturieren und die genomische Virus-DNA freizusetzen. Capture-Oligonukleotide hybridisieren an hoch konservierte Regionen der ggf. in der Testprobe vorhandenen HBV-DNA. Das hybridisierte Target wird anschließend an magnetische Mikropartikel gebunden, die dann in einem Magnetfeld von der Patientenprobe getrennt werden. Irrelevante Bestandteile werden durch Waschschritte aus dem Reaktionsröhren entfernt.

Die Target-Amplifikation findet durch TMA statt, eine transkriptionsvermittelte Nukleinsäureamplifikationsmethode, bei der zwei Enzyme, die reverse Transkriptase des MMLV (Moloney murines Leukämievirus) und die T7-RNA-Polymerase zum Einsatz kommen. Die reverse Transkriptase erzeugt eine DNA-Kopie (mit einer Promotorsequenz für die T7-RNA-Polymerase) der Targetsequenz. T7-RNA-Polymerase produziert vielfache Kopien des RNA-Amplikons vom Template der DNA-Kopie. Der Aptima HBV Quant Assay verwendet die TMA-Methode zur Amplifizierung von zwei Regionen des HBV-Genoms (Polymerase- sowie Oberflächengen). Die Amplifikation dieser Region erfolgt über spezielle Primer, die zur Amplifikation der HBV-Genotypen A, B, C, D, E, F, G und H bestimmt sind. Der Ansatz mit zwei Target-Regionen, bei dem das Primer-Design auf hoch konservierte Regionen abzielt, gewährleistet eine präzise Quantifizierung der HBV-DNA.

Die Detektion wird erreicht, indem einzelsträngige Nukleinsäure-Sonden (Torches) verwendet werden, die während der Amplifikation des Targets vorhanden sind und spezifisch sowie in Echtzeit an das Amplikon hybridisieren. Jede Sonde hat einen Fluorophor und einen Quencher. Wenn die Sonde nicht mit dem Amplikon hybridisiert, befindet sich der Quencher nahe bei dem Fluorophor und unterdrückt die Fluoreszenz. Bindet die Sonde jedoch an das Amplikon, ist der Abstand zwischen Quencher und Fluorophor größer, sodass dieses bei Anregung mit einer Lichtquelle ein Signal mit einer bestimmten Wellenlänge abgibt. Je mehr Sonden an Amplikons hybridisieren, desto stärker ist das erzeugte Fluoreszenzsignal. Der Zeitraum, der verstreicht, bis das Fluoreszenzsignal einen bestimmten Schwellenwert erreicht hat, ist zur HBV-Ausgangskonzentration proportional. Jede Reaktion hat einen internen Kalibrator/eine interne Kontrolle (Internal Control, IC) zur Überprüfung auf Schwankungen bei der Probenbearbeitung, Amplifikation und Detektion. Die Konzentration einer Probe wird von der Panther-System-Software bestimmt, indem die HBV- und IC-Signale in jeder Reaktion mit Kalibrierungsdaten verglichen werden.

## Zusammenfassung von Sicherheit und Leistung

Die SSP (Zusammenfassung von Sicherheit und Leistung, Summary of Safety and Performance) ist in der Europäischen Datenbank für Medizinprodukte (Eudamed) verfügbar und dort mit den Gerätekennungen (Basis UDI-DI) verknüpft. Die SSP für den Aptima HBV Quant Assay finden sie unter der grundlegenden eindeutigen Gerätekennung (Basic Unique Device Identifier, BUDI): 54200455DIAGAPTHBVAF.

## Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- A. Zur *in-vitro*-diagnostischen Anwendung
- B. Für den professionellen Einsatz.
- C. Zur Verringerung des Risikos ungültiger Ergebnisse müssen die Packungsbeilage und das *Panther/Panther Fusion™ System Operator's Manual* (Bedienungsanleitung für das Panther/Panther Fusion System) vollständig durchgelesen werden, bevor dieser Assay durchgeführt wird.
- D. Target Enhancer-Reagenz (TER) ist ätzend. Siehe die Informationen des Sicherheitsdatenblatts am Ende dieses Abschnitts.

## Laborbezogen

- E. VORSICHT! Die Kontrollen für diesen Assay enthalten Humanplasma. In von der US-amerikanischen Zulassungsbehörde FDA (Food and Drug Administration) zugelassenen Verfahren ist das Plasma nicht-reakтив auf Hepatitis B-Oberflächenantigen (HBsAg), Antikörper gegen HCV, Antikörper gegen HIV-1 und HIV-2 und HIV-Antigen. Das Plasma ist außerdem bei Testung mit zugelassenen Nukleinsäuretests nicht-reakтив auf HBV-DNA, HCV-RNA und HIV-1-RNA. Alle aus Humanblut stammenden Materialien sind als potenziell infektiös zu betrachten und mit den allgemeinen Vorsichtsmaßnahmen zu handhaben.<sup>7,8,9</sup>
- F. Dieses Verfahren sollte nur von Personen durchgeführt werden, die in der Anwendung des Aptima HBV Quant Assays und in der Handhabung potenziell infektiösen Materials entsprechend geschult sind. Bei Materialverschüttung sind die betroffenen Flächen unter Einhaltung entsprechender vor Ort gültiger Verfahren sofort zu desinfizieren.
- G. Nur die im Lieferumfang enthaltenen oder angegebenen Einweg-Laborprodukte verwenden.
- H. Die normalen Vorsichtsmaßnahmen im Labor ergreifen. Nicht mit dem Mund pipettieren. In den ausgewiesenen Arbeitsbereichen nicht essen, trinken oder rauchen. Ungepuderte Einweghandschuhe, Augenschutz und Laborkittel beim Umgang mit Proben und Kitreagenzien tragen. Nach der Handhabung von Proben und Kitreagenzien die Hände gründlich waschen.
- I. Arbeitsflächen, Pipetten und andere Geräte müssen regelmäßig mit einer 2,5%igen bis 3,5%igen (0,35 M bis 0,5 M) Natriumhypochloritlösung dekontaminiert werden.
- J. Material, das in Kontakt mit Patientenproben und Reagenzien gekommen ist, nach allen geltenden lokalen, bundestaatlichen und bundesweiten Vorschriften entsorgen.<sup>7,8,9,10</sup> Alle Arbeitsflächen gründlich reinigen und desinfizieren.
- K. Die Kontrollen enthalten Natriumazid als Konservierungsmittel. Für den Reagenzientransfer keine Metallröhren verwenden. Wenn Lösungen mit Natriumazidverbindungen in ein Rohrsystem entsorgt werden, sind sie zu verdünnen und mit reichlich fließendem Leitungswasser hinunterzuspülen. Diese Vorsichtsmaßnahmen werden empfohlen, um Ablagerungen in Metall-Abflussrohren zu vermeiden, die eine Explosionsgefahr bilden können.
- L. Zu der guten Standardpraxis für Molekularbiologie-Laboratorien gehört auch die Überwachung der Laborumgebung. Zur Überwachung der Laborumgebung wird folgende Vorgehensweise empfohlen:
  1. Einen Tupfer mit Wattespitze und ein Aptima Probenaliquotröhrchen (Specimen Aliquot Tube, SAT) bereitlegen.
  2. Jedes SAT entsprechend beschriften.
  3. Jedes SAT mit 1 ml Aptima Probenverdünner füllen.
  4. Zur Erfassung der Oberflächenproben einen Tupfer leicht mit nukleasefreiem entionisiertem Wasser befeuchten.

5. Den Probenentnahmetupfer auf der betreffenden Oberfläche in einer vertikalen Bewegung von oben nach unten führen. Während der Probengewinnung den Probenentnahmetupfer etwa eine halbe Drehung drehen.
6. Die Tupferprobe sofort in das Röhrchen geben und im Verdünner vorsichtig schwenken, um möglicherweise auf dem Tupfer vorhandenes Material zu extrahieren. Den Tupfer an der Seite des Transportröhrchens ausdrücken, um so viel Flüssigkeit wie möglich zu extrahieren. Den Tupfer entsorgen und das Röhrchen mit dem Deckel verschließen.
7. Die Schritte mit den verbleibenden Tupferproben wiederholen.
8. Die Tupferprobe mit dem molekularen Assay testen.

### Probenbezogen

- M. Patientenproben können infektiös sein. Bei der Durchführung dieses Assay sind die allgemein gültigen Vorsichtsmaßnahmen<sup>7,8,9</sup> zu befolgen. Entsprechend den vor Ort geltenden Bestimmungen sind angemessene Handhabungs- und Entsorgungsmethoden festzulegen.<sup>10</sup> Dieses Verfahren sollte nur von Personen durchgeführt werden, die in der Anwendung des Aptima HBV Quant Assays und in der Handhabung infektiösen Materials entsprechend geschult sind.
- N. Um die Probenintegrität zu wahren, müssen während des Probenversands die ordnungsgemäßen Lagerungsbedingungen aufrechterhalten werden. Die Probenstabilität unter anderen Versandbedingungen als den hier empfohlenen wurde nicht untersucht.
- O. Kreuzkontamination während der Probenhandhabungsschritte vermeiden. Insbesondere ist darauf zu achten, beim Lösen oder Entfernen von Deckel von Patientenproben eine Kontamination durch Verbreitung von Aerosolen zu vermeiden. Die Proben können sehr hohe Konzentrationen von Organismen aufweisen. Es ist sicherzustellen, dass die Probenbehälter nicht miteinander in Berührung kommen. Benutzte Materialien dürfen nicht über offene Behälter hinweg entsorgt werden. Die Handschuhe wechseln, wenn diese mit Proben in Kontakt kommen.

### Hinweise zum Assay

- P. Das Reagenzien-Kit, den Kalibrator oder die Kontrollen nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden.
- Q. Assay-Reagenzien aus Kits mit verschiedenen Hauptchargennummern nicht austauschen, vermischen oder kombinieren. Assay-Flüssigkeiten dürfen verschiedene Chargennummern aufweisen. Kontrollen und Kalibratoren dürfen verschiedene Chargennummern aufweisen.
- R. Eine Kontamination der Reagenzien mit Mikroben oder Nuklease ist zu vermeiden.
- S. Alle Assay-Reagenzien verschließen und bei den angegebenen Temperaturen lagern. Die Assay-Leistung kann durch Verwendung von falsch gelagerten Assay-Reagenzien beeinträchtigt werden. Siehe *Lagerungs- und Handhabungsbedingungen für Reagenzien und Testverfahren mit dem Panther System* für weitere Informationen.
- T. Assay-Reagenzien oder Flüssigkeiten nur auf ausdrückliche Anweisung miteinander kombinieren. Reagenzien und Flüssigkeiten nicht nachfüllen. Das Panther System überprüft die Reagenzien-Füllstände.
- U. Berührung des TER mit Haut, Augen und Schleimhäuten vermeiden. Bei Kontakt mit diesem Reagenz den betroffenen Bereich mit Wasser abspülen. Wird dieses Reagenz verschüttet, muss es mit Wasser verdünnt und anschließend entsprechend den örtlich geltenden Vorschriften beseitigt werden.
- V. Einige Reagenzien in diesem Kit sind mit Gefahrenhinweisen versehen.

**Hinweis:** Die Gefahrenkommunikation spiegelt die Einstufung der EU-Sicherheitsdatenblätter (SDS) wider. Informationen zur Gefahrenkommunikation spezifisch für Ihre Region finden Sie im regionsspezifischen SDB in der Sicherheitsdatenblatt-Sammlung (Safety Data Sheet Library) unter [www.hologicsds.com](http://www.hologicsds.com). Weitere Informationen zu anderen Symbolen finden Sie in der Symbollegende auf <https://www.hologic.com/package-inserts>.

<b>Gefahrenhinweise für Nordamerika</b>	
<b>HBV VL Kit Controls</b>	<p><i>Human Serum / Human Plasma 95–100 %</i>  <i>Natriumazid &lt;1 %</i></p> <p>—</p> <p>—</p>
<b>Target Enhancer-Reagenz</b>	<p><i>Lithiumhydroxid, Monohydrat 5–10 %</i></p> <p>—</p> <p>—</p>
<b>GEFAHR</b>	<p>H302 – Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.</p> <p>H314 – Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.</p> <p>P264 – Nach Gebrauch Gesicht, Hände und ungeschützte Hautpartien gründlich waschen.</p> <p>P270 – Beim Arbeiten mit diesem Produkt nicht essen, trinken oder rauchen.</p> <p>P330 – Mund ausspülen.</p> <p>P501 – Inhalt/Behälter einer zugelassenen Einrichtung zur Abfallentsorgung zuführen.</p> <p>P260 – Stäube oder Nebel nicht einatmen.</p> <p>P280 – Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.</p> <p>P301 + P330 + P331 – FALLS GESCHLUCKT: Mund ausspülen KEIN Erbrechen auslösen.</p> <p>P303 + P361 + P353 – BEI KONTAKT MIT DER HAUT (oder dem Haar): Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen/duschen.</p> <p>P304 + P340 – BEI EINATMEN: Die Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen.</p> <p>P305 + P351 + P338: BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen.</p> <p>P321 – Besondere Behandlung (siehe ergänzende Erste-Hilfe-Anleitung im Sicherheitsdatenblatt).</p> <p>P363 – Kontaminierte Kleidung vor erneuter Verwendung waschen.</p> <p>P405 – Abgeschlossen lagern.</p> <p>P301 + P317 – BEI VERSCHLUCKEN: ärztliche Hilfe hinzuziehen.</p> <p>P316 – Sofort medizinische Notfallhilfe hinzuziehen.</p>
<b>Gefahrenhinweise für die EU</b>	
<b>Amplifikationsreagenz</b>	<p><i>Magnesiumchlorid 60–65 %</i></p> <p>—</p> <p>—</p> <p>H412 – Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.</p> <p>P273 – Freisetzung in die Umwelt vermeiden.</p> <p>P501 – Inhalt/Behälter einer zugelassenen Einrichtung zur Abfallentsorgung zuführen.</p>
<b>Enzymreagenz</b>	<p><i>HEPES 1–5 %</i>  <i>Triton X-100 1–5 %</i></p> <p>—</p> <p>—</p> <p>H412 – Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.</p> <p>P273 – Freisetzung in die Umwelt vermeiden.</p> <p>P501 – Inhalt/Behälter einer zugelassenen Einrichtung zur Abfallentsorgung zuführen.</p>

<b>Enzymrekonstitutionslösung</b> <i>Glycerin 20–25 %</i> <i>Triton X-100 5–10 %</i> <i>HEPES 1–5 %</i>
— — H412 – Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung. P273 – Freisetzung in die Umwelt vermeiden. P501 – Inhalt/Behälter einer zugelassenen Einrichtung zur Abfallentsorgung zuführen.
<b>Promotorreagenz</b> <i>Magnesiumchlorid 60–65 %</i>
— — H412 – Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung. P273 – Freisetzung in die Umwelt vermeiden. P501 – Inhalt/Behälter einer zugelassenen Einrichtung zur Abfallentsorgung zuführen.
<b>Target Capture-Reagenz</b> <i>HEPES 15–20 %</i> <i>Lauryl Sulfate Lithium Salt 5–10 %</i> <i>Bernsteinsäure 1–5 %</i> <i>Lithiumhydroxid, Monohydrat 1–5 %</i>
— — H412 – Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung. P273 – Freisetzung in die Umwelt vermeiden. P501 – Inhalt/Behälter einer zugelassenen Einrichtung zur Abfallentsorgung zuführen.
<b>HBV VL Kit Calibrators</b> <i>HEPES 15–20 %</i> <i>Lauryl Sulfate Lithium Salt 5–10 %</i> <i>Succinylsäure 1–5 %</i> <i>Lithiumhydroxid, Monohydrat 1–5 %</i>
— — H412 – Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung. P273 – Freisetzung in die Umwelt vermeiden. P501 – Inhalt/Behälter einer zugelassenen Einrichtung zur Abfallentsorgung zuführen.
<b>HBV VL Kit Controls</b> <i>Human Serum / Human Plasma 95–100 %</i> <i>Natriumazid &lt;1 %</i>
—  <b>GEFAHR</b>    H300 – Lebensgefahr bei Verschlucken. H410 – Sehr giftig für Wasserorganismen mit langfristiger Wirkung. P264 – Nach Gebrauch Gesicht, Hände und exponierte Haut gründlich waschen. P273 – Freisetzung in die Umwelt vermeiden. P301 + P310 – BEI VERSCHLUCKEN: Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRALE oder Arzt anrufen. P321 – Besondere Behandlung (siehe ergänzende Anweisungen zur Ersten Hilfe auf diesem Kennzeichnungsetikett). P330 – Mund ausspülen. P391 – Verschüttete Mengen aufnehmen.

**Target Enhancer-Reagenz**  
*Lithiumhydroxid, Monohydrat 5–10 %*

**GEFAHR**



H302 – Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.  
H314 – Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.  
P264 – Nach Gebrauch Gesicht, Hände und ungeschützte Hautpartien gründlich waschen.  
P270 – Bei Gebrauch nicht essen, trinken oder rauchen.  
P330 – Mund ausspülen.  
P501 – Inhalt/Behälter einer zugelassenen Einrichtung zur Abfallentsorgung zuführen.  
P260 – Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol nicht einatmen.  
P280 – Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.  
P301 + P330 + P331 – BEI VERSCHLUCKEN: Mund ausspülen. KEIN Erbrechen herbeiführen.  
P303 + P361 + P353 – BEI KONTAKT MIT DER HAUT (oder dem Haar): Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen [oder duschen].  
P304 + P340 – BEI EINATMEN: Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen.  
P305 + P351 + P338: BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.  
P310 – Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.  
P321 – Besondere Behandlung (siehe ergänzende Erste-Hilfe-Anweisungen auf diesem Kennzeichnungsetikett).  
P363 – Kontaminierte Kleidung vor erneutem Tragen waschen.  
P405 – Unter Verschluss aufbewahren.

## Lagerungs- und Handhabungsbedingungen für Reagenzien

A. Die folgende Tabelle zeigt die Lagerungsbedingungen und die Stabilität der Reagenzien, der Kontrollen und des Kalibrators.

Reagenz	Lagerung im ungeöffneten Zustand	Offenes Kit (rekonstituiert)	
		Lagerung	Stabilität
qHBV-Amplifikationsreagenz	2 °C bis 8 °C		
qHBV-Amplifikationsrekonstitutionslösung	2 °C bis 8 °C	2 °C bis 8 °C	30 Tage <sup>a</sup>
qHBV-Enzymreagenz	2 °C bis 8 °C		
qHBV-Enzymrekonstitutionslösung	2 °C bis 8 °C	2 °C bis 8 °C	30 Tage <sup>a</sup>
qHBV Promoter-Reagenz	2 °C bis 8 °C		
qHBV-Promotorrekonstitutionslösung	2 °C bis 8 °C	2 °C bis 8 °C	30 Tage <sup>a</sup>
qHBV Target Capture-Reagenz	2 °C bis 8 °C	2 °C bis 8 °C	30 Tage <sup>a</sup>
qHBV PCAL (Positivkalibrator)	-15 °C bis -35 °C	15 °C bis 30 °C	Fläschchen für den Einmalgebrauch Innerhalb von 24 Stunden verwenden
qHBV NC CONTROL- (Negativkontrolle)	-15 °C bis -35 °C	15 °C bis 30 °C	Fläschchen für den Einmalgebrauch Innerhalb von 24 Stunden verwenden
qHBV LPC CONTROL+ (schwach positive Kontrolle)	-15 °C bis -35 °C	15 °C bis 30 °C	Fläschchen für den Einmalgebrauch Innerhalb von 24 Stunden verwenden
qHBV HPC CONTROL+ (stark positive Kontrolle)	-15 °C bis -35 °C	15 °C bis 30 °C	Fläschchen für den Einmalgebrauch Innerhalb von 24 Stunden verwenden
qHBV Target Enhancer Reagent	15 °C bis 30 °C	15 °C bis 30 °C	30 Tage <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Wenn Reagenzien aus dem Panther System genommen werden, sind sie sofort wieder bei ihren jeweiligen Lagerungstemperaturen aufzubewahren.

B. Alle unbenutzten und rekonstituierten Reagenzien, das Target Capture Reagent (TCR) und das Target Enhancer Reagent (TER) nach 30 Tagen oder nach Ablauf des Verfallsdatums der Hauptcharge (das frühere Datum ist ausschlaggebend) entsorgen.

C. Im Panther System gelagerte Reagenzien sind im Gerät 72 Stunden stabil. Reagenzien können bis zu 8 Mal auf das Panther System geladen werden. Das Laden von Reagenzien wird jedes Mal im Panther System-Protokoll vermerkt.

D. Nach dem Auftauen des Kalibrators muss die Lösung klar sein, d. h., keine Trübungen oder Präzipitate aufweisen. Sicherstellen, dass sich Präzipitate gelöst haben. Den Kalibrator nicht verwenden, wenn darin Gelbildung, Präzipitat oder eine Trübung vorhanden ist.

E. Das Promoter Reagent und das rekonstituierte Promoter Reagent sind lichtempfindlich. Diese Reagenzien sind lichtgeschützt zu lagern und für die Anwendung vorzubereiten.

F. Das qHBV Target Enhancer Reagent muss vor Gebrauch eine Temperatur von 15 °C bis 30 °C erreichen.

## Probenentnahme und -lagerung

**Hinweis:** Alle Patientenproben sind als potenziell infektiös zu handhaben. Es sind allgemeine Vorsichtsmaßnahmen zu treffen.

**Hinweis:** Bei den Schritten, die eine Handhabung von Proben erfordern, darauf achten, dass es zu keiner Kreuzkontamination kommt. Benutztes Material ist beispielsweise so zu entsorgen, dass es nicht über geöffnete Röhrchen geführt wird.

**Hinweis:** Nur sekundäre Röhrchen aus Plastik werden für die Lagerung empfohlen.

Es können in die folgenden Glas- oder Kunststoffröhren entnommene Vollblutproben verwendet werden:

- Röhrchen, die Edetinsäure (EDTA) oder Acid-Citrate-Dextrose (ACD)-Antikoagulanzien enthalten
- Plasmapräparationsröhrchen
- Serumröhren
- Serumtrennröhrchen

Bei Serum ist vor der Weiterverarbeitung die Koagelbildung abzuwarten.

### A. Probenentnahme

Vollblut kann bei 2 °C bis 30 °C für bis zu 24 Stunden gelagert werden und Plasma muss vor der Verarbeitung in einem primären Röhrchen abzentrifugiert werden. Plasma oder Serum unter Einhaltung der Herstelleranweisungen für das jeweils verwendete Röhrchen von den Erythrozyten trennen. Plasma oder Serum kann in einem primären Röhrchen auf dem Panther System getestet oder zuvor in ein sekundäres Röhrchen wie das Aptima® Probenaliquotröhren (Specimen Aliquot Tube) überführt werden. Um 500 µl Reaktionsvolumen zu erhalten, beträgt das Serum- oder Plasmamindestvolumen für primäre Entnahmeröhrchen bis zu 1200 µl; für sekundäre Röhrchen beträgt das Mindestvolumen 700 µl. In der folgenden Tabelle sind die Anforderungen an das Totvolumen für jeden primären und sekundären Röhrchentyp angegeben.

Röhrchen (Größe und Typ)	Totvolumen im Panther-System
Aptima Probenaliquotröhren (Sample Aliquot Tube; SAT)	0,2 ml
12 x 75 mm	0,5 ml
13 x 100 mm	0,5 ml
13 x 100 mm mit Gel	0,3 ml
16 x 100 mm mit Gel	0,7 ml

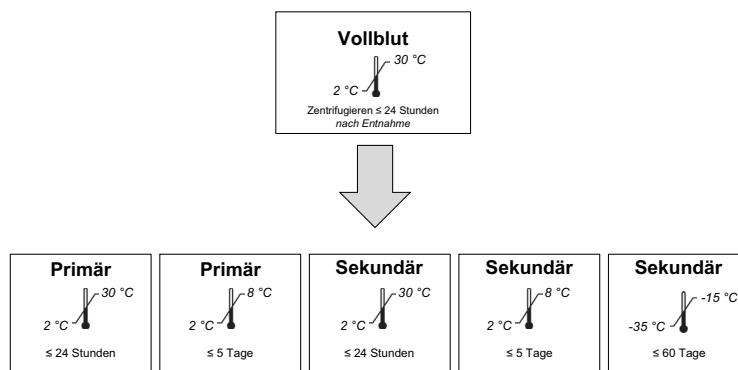
Wird der Test nicht sofort durchgeführt, können Plasma und Serum gemäß den nachstehenden Spezifikationen gelagert werden. In ein SAT oder sekundäres Röhrchen überführtes Plasma oder Serum kann bei -20 °C eingefroren werden. Die Proben sollten höchstens dreimal eingefroren und wieder aufgetaut werden. Patientenproben nicht in Edetinsäure-, ACD- oder primären Serumentnahmeröhrchen einfrieren.

## B. Bedingungen für die Lagerung von Patientenproben

### 1. Edetinsäure- und ACD-Plasmaproben

Vollblut kann bei 2 °C bis 30 °C gelagert werden und ist innerhalb von 24 Stunden nach der Probenentnahme zu zentrifugieren. Anschließend kann Plasma unter einer der folgenden Bedingungen längere Zeit gelagert werden:

- Im primären Entnahmeröhrchen oder sekundären Röhrchen bis zu 24 Stunden lang bei 2 °C bis 30 °C,
- Im primären Entnahmeröhrchen oder sekundären Röhrchen bis zu 5 Tage lang bei 2 °C bis 8 °C oder
- Im sekundären Röhrchen bis zu 60 Tage lang bei -20 °C.

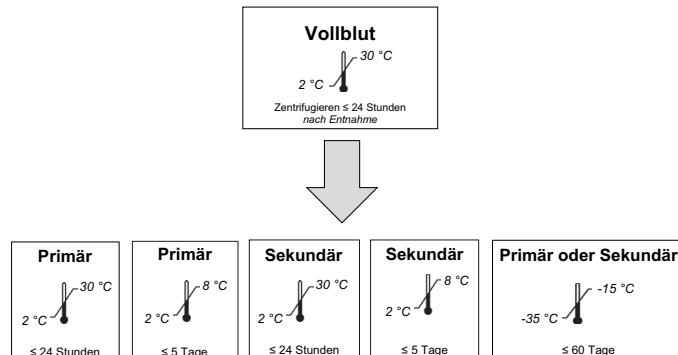


**Abb. 1. Bedingungen für die Lagerung von EDTA/ACD-Röhrchen**

### 2. PPT-Patientenproben

Vollblut kann bei 2 °C bis 30 °C gelagert werden und ist innerhalb von 24 Stunden nach der Probenentnahme zu zentrifugieren. Anschließend kann Plasma unter einer der folgenden Bedingungen längere Zeit gelagert werden:

- Im PPT oder sekundären Röhrchen bis zu 24 Stunden lang bei 2 °C bis 30 °C,
- Im PPT oder sekundären Röhrchen bis zu 5 Tage lang bei 2 °C bis 8 °C oder
- Im PPT oder sekundären Röhrchen bis zu 60 Tage lang bei -20 °C.

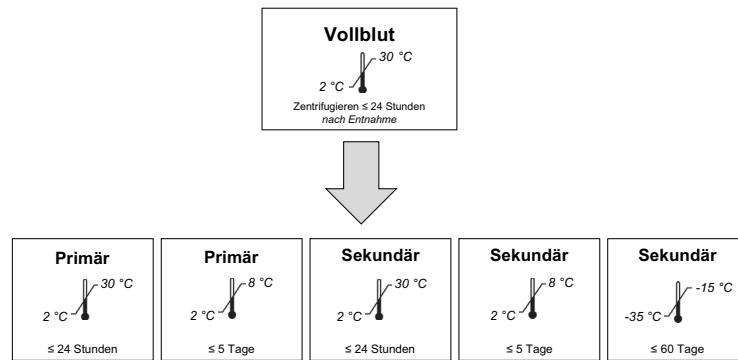


**Abb. 2. Bedingungen für die Lagerung von PPTs**

### 3. Patientenproben in Serumröhrchen

Vollblut kann bei 2 °C bis 30 °C gelagert werden und ist innerhalb von 24 Stunden nach der Probenentnahme zu zentrifugieren. Anschließend kann Serum unter einer der folgenden Bedingungen längere Zeit gelagert werden:

- Im Serumröhrchen oder sekundären Röhrchen bis zu 24 Stunden lang bei 2 °C bis 30 °C,
- Im Serumröhrchen oder sekundären Röhrchen bis zu 5 Tage lang bei 2 °C bis 8 °C oder
- Im sekundären Röhrchen bis zu 60 Tage lang bei -20 °C.

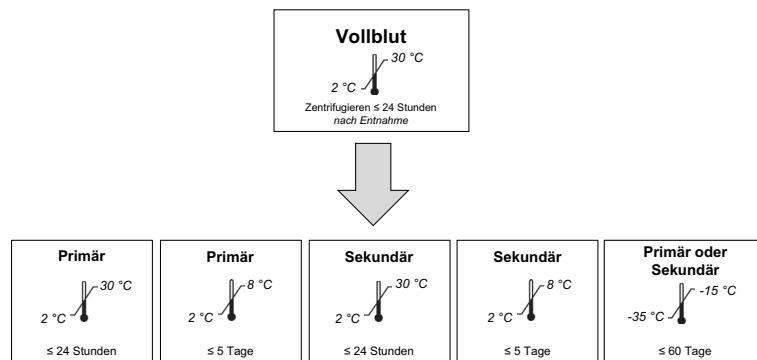


**Abb. 3. Bedingungen für die Lagerung von Serumröhrchen**

### 4. SST-Patientenproben

Vollblut kann bei 2 °C bis 30 °C gelagert werden und ist innerhalb von 24 Stunden nach der Probenentnahme zu zentrifugieren. Anschließend kann Serum unter einer der folgenden Bedingungen längere Zeit gelagert werden:

- Im SST oder sekundären Röhrchen bis zu 24 Stunden lang bei 2 °C bis 30 °C,
- Im SST oder sekundären Röhrchen bis zu 5 Tage lang bei 2 °C bis 8 °C oder
- Im SST oder sekundären Röhrchen bis zu 60 Tage lang bei -20 °C.



**Abb. 4. Bedingungen für die Lagerung von SSTs**

### C. Langzeitlagerung im gefrorenen Zustand

Plasma- oder Serumproben können in SATs bis zu 60 Tage lange bei -70°C gelagert werden.

#### D. Verdünnung von Plasma- und Serumproben

Plasma- oder Serumproben können zum Test auf dem Panther System im SAT oder einem sekundären Röhrchen verdünnt werden. Für weitere Informationen siehe *Testverfahren mit dem Panther System*, Schritt E.5.

**Hinweis:** Wenn eine Patientenprobe verdünnt wird, sollte sie sofort nach der Verdünnung analysiert werden. Eine verdünnte Patientenprobe nicht einfrieren.

### Proben im Panther System

Proben können bis zu 8 Stunden lang unverschlossen auf dem Panther System stehen gelassen werden. Solange die Gesamtverweildauer auf dem System vor dem Pipettieren der Probe durch das Panther System 8 Stunden nicht übersteigt, können die Proben wieder aus dem Panther System genommen und getestet werden.

### Transport von Patientenproben

Die unter *Probenentnahme und -lagerung* beschriebenen Lagerbedingungen für Proben müssen eingehalten werden.

**Hinweis:** Ein Versand der Patientenproben muss in Übereinstimmung mit geltenden nationalen, internationalen und regionalen Frachtbestimmungen erfolgen.

## Panther System

Nachstehend sind die Reagenzien für den Aptima HBV Quant Assay für das Panther System gelistet. Die Symbole zur Identifikation der Reagenzien sind neben den Reagenzbezeichnungen angegeben.

### Im Lieferumfang enthaltene Reagenzien und Materialien

**Kit mit Aptima HBV Quant Assay**, 100 Tests (Kat. Nr. PRD-03424)

(1 Assay-Box, 1 Kalibrator-Kit, 1 Kit mit Kontrollen und 1 Box mit Target Enhancer Reagent)

Zusätzliche Kalibratoren und Kontrollen können separat bestellt werden. Siehe die nachstehenden Einzel-Bestellnummern.

---

#### Aptima HBV Quant Assay-Box

(Lagerung bei 2 °C bis 8 °C nach Empfang)

Symbol	Komponente	Menge
A	<b>qHBV-Amplifikationsreagenz</b> <i>Nicht-infektiöse Nukleinsäuren, getrocknet, in Pufferlösung.</i>	1 Fläschchen
E	<b>qHBV-Enzymreagenz</b> <i>Reverse Transkriptase und RNA-Polymerase, getrocknet, in HEPES-gepufferter Lösung.</i>	1 Fläschchen
PRO	<b>qHBV Promoter-Reagenz</b> <i>Nicht-infektiöse Nukleinsäuren, getrocknet, in Pufferlösung.</i>	1 Fläschchen
AR	<b>qHBV-Amplifikationsrekonstitutionslösung</b> <i>Wässrige Lösung mit Glyzerol und Konservierungsmitteln.</i>	1 x 7,2 ml
ER	<b>qHBV-Enzymrekonstitutionslösung</b> <i>HEPES-gepufferte Lösung mit oberflächenaktiver Substanz und Glyzerol.</i>	1 x 5,8 ml
PROR	<b>qHBV-Promotorrekonstitutionslösung</b> <i>Wässrige Lösung mit Glyzerol und Konservierungsmitteln.</i>	1 x 4,5 ml
TCR	<b>qHBV Target Capture-Reagenz</b> <i>Nukleinsäuren in einer gepufferten Salzlösung mit nicht-infektiösen Nukleinsäuren in der Festphase und einem internen Kalibrator.</i>	1 x 72,0 ml
	<b>Rekonstitutionsverbindungsstücke</b>	3
	<b>Barcode-Blatt für Hauptcharge</b>	1 Blatt

---

#### Kit mit Aptima HBV Quant Kalibrator (Kat. Nr. PRD-03425)

(Lagerung bei -15 °C bis -35 °C nach Empfang)

Symbol	Komponente	Menge
PCAL	<b>qHBV Positivkalibrator</b> <i>Plasmid-DNA in Pufferlösung</i>	5 x 2,5 ml
	<b>Barcode-Etikett des Kalibrators</b>	—

---

---

**Kit mit Aptima HBV Quant Controls** (Kat. Nr. PRD-03426)  
(Lagerung bei -15 °C bis -35 °C nach Empfang)

Symbol	Komponente	Menge
NC	<b>qHBV Negativkontrolle</b> <i>HBV-negatives defibriniertes Humanplasma mit Gentamicin und 0,2% Natriumazid als Konservierungsmittel.</i>	5 x 0,8 ml
LPC	<b>qHBV Schwach positive Kontrolle</b> <i>Inaktiviertes HBV-positives Plasma in defibriniertem Humanplasma mit Gentamicin und 0,2 % Natriumazid als Konservierungsmittel.</i>	5 x 0,8 ml
HPC	<b>qHBV Stark positive Kontrolle</b> <i>Inaktiviertes HBV-positives Plasma in defibriniertem Humanplasma mit Gentamicin und 0,2 % Natriumazid als Konservierungsmittel.</i>	5 x 0,8 ml
<b>Barcode-Etikett der Kontrolle</b>		—

---

**Aptima HBV Quant Target Enhancer Reagent-Box**  
(Lagerung bei 15 °C bis 30 °C nach Empfang)

Symbol	Komponente	Menge
TER	<b>qHBV Target Enhancer Reagent</b> <i>Konzentrierte Lithiumhydroxid-Lösung</i>	1 x 46,0 ml

**Erforderliche, jedoch nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien**

**Hinweis:** Die von Hologic erhältlichen Materialien sind mit der Katalognummer aufgeführt, sofern nicht anders angegeben.

Material	Kat.-Nr.
Panther™ System	303095
Panther Fusion™ System	PRD-04172
Panther™ System, Continuous Fluid and Waste (Panther Plus)	PRD-06067
Kit mit Aptima® HBV Quant Calibrator	PRD-03425
Kit mit Aptima® HBV Quant Controls	PRD-03426
Panther Laufkit für Echtzeitassays (nur für Echtzeitassays)	PRD-03455 (5000 Tests)
Aptima® Assayflüssigkeitskit (auch als Universal-Flüssigkeitskit bezeichnet) <i>enthält Aptima® Waschlösung, Aptima® Puffer für Deaktivierungsflüssigkeit und Aptima® Ölreagenz</i>	303014 (1000 Tests)
<i>Multi-Röhrchen-Einheiten (MTU)</i>	104772-02
<i>Panther™ Entsorgungsbeutel-Kit</i>	902731
<i>Panther™ Abfallabdeckung</i>	504405
Oder Panther™ System-Laufkit <i>(Wenn Echtzeit- und Nicht-Echtzeit-TMA-Assays parallel laufen)</i> <i>enthält MTUs, Entsorgungsbeutel, Abfallabdeckungen, Auto Detect und Assayflüssigkeiten</i>	303096 (5000 Tests)

Material	Kat.- Nr.
Spitzen, 1000 µl, leitfähig, zur Flüssigkeitsstandmessung	901121 (10612513 Tecan) 903031 (10612513 Tecan)
<i>Nicht alle Produkte sind in allen Regionen verfügbar. Wenden Sie sich an Ihren Vertreter, um regionsspezifische Informationen zu erhalten.</i>	MME-04134 (30180117 Tecan) MME-04128
Bleichmittel, 5 % bis 8,25 % (0,7 M bis 1,16 M) Natriumhypochloritlösung	—
Ungepuderte Einweghandschuhe	—
Nicht-durchstechbare Ersatzdeckel	103036A
Ersatzdeckel für Reagenzien	
<i>Rekonstitutionsflaschen für Amplifikations-, Enzym- und Promoter-Reagenz</i>	CL0041 (100 Deckel)
<i>TCR-Flasche</i>	CL0040 (100 Deckel)
<i>TER-Flasche</i>	501604 (100 Deckel)
Labortischunterlagen mit Kunststoffrückseite	—
Fusselfreie Tücher	—
Pipette	—
Spitzen	—
Optionen für primäre Entnahmeröhrchen:	
<i>13 mm x 100 mm</i>	—
<i>13 mm x 75 mm</i>	—
<i>16 mm x 100 mm</i>	—
Zentrifuge	—
Vortexmischer	—

## Optionale Materialien

Material	Kat.- Nr.
Optionen für sekundäre Röhrchen:	
<i>12 mm x 75 mm</i>	—
<i>13 mm x 100 mm</i>	—
<i>16 mm x 100 mm</i>	—
<i>Aptima® Probenaliquotröhren (SATs, Specimen Aliquot Tubes) (100 Stück)</i>	FAB-18184
Deckel für Transportröhren (100 St.)	504415
<i>Deckel für SAT</i>	
Aptima® Probenverdünner	PRD-03003
Aptima® Probenverdünner-Kit	PRD-03478
<i>enthält Probenverdünner, 100 SATs und 100 Deckel</i>	
Transferpipetten	—
Wattestäbchen	—
Wippschüttler für Röhrchen	PRD-03488

## Testverfahren mit dem Panther System

**Hinweis:** Nähere Verfahrensinformationen finden Sie im Panther/Panther Fusion System Operator's Manual (Bedienungsanleitung für das Panther/Panther Fusion System).

### A. Vorbereitung des Arbeitsbereichs

1. Die Arbeitsflächen reinigen, auf denen die Reagenzien vorbereitet werden. Die Arbeitsflächen mit einer 2,5-%igen bis 3,5-%igen (0,35 M bis 0,5 M) Natriumhypochloritlösung abwischen. Die Natriumhypochloritlösung mindestens 1 Minute auf den Flächen einwirken lassen und diese Flächen anschließend mit entionisiertem Wasser abspülen. Die Natriumhypochloritlösung darf nicht antrocknen. Die Labortischoberflächen mit sauberen, saugfähigen Labortischunterlagen mit Kunststoffrückseite abdecken.
2. Eine separate Arbeitsfläche, auf der die Proben vorbereitet werden, reinigen. Dabei wie oben beschrieben (Schritt A.1) vorgehen.
3. Alle Pipetten reinigen. Bei der Reinigung wie oben beschrieben (Schritt A.1) vorgehen.

### B. Vorbereitung von Kalibrator und Kontrollen

Lassen Sie den Kalibrator und die Kontrollen vor der Verarbeitung eine Temperatur von 15 °C bis 30 °C annehmen, indem Sie folgenderweise vorgehen:

1. Nehmen Sie den Kalibrator und die Kontrollen aus der Lagerung (-15 °C bis -35 °C) und bringen Sie sie auf eine Temperatur von 15 °C bis 30 °C. Drehen Sie jedes Röhrchen während des gesamten Auftauprozesses behutsam um, um den Inhalt gründlich zu mischen. Darauf achten, dass der Röhrcheninhalt vor dem Gebrauch vollständig aufgetaut ist.

**Option.** Die Röhrchen mit dem Kalibrator und den Kontrollen können auf einem geeigneten Wippschüttler platziert werden, um ihren Inhalt gründlich zu mischen. Darauf achten, dass der Röhrcheninhalt vor dem Gebrauch vollständig aufgetaut ist.

**Hinweis:** Beim Invertieren des Kalibrators und der Kontrollen ist starke Schaumbildung zu vermeiden. Schaum beeinträchtigt die Füllstandsmessung im Panther System.

2. Wenn der Röhrcheninhalt aufgetaut ist, trocknen Sie das Röhrchen außen mit einem sauberen, trockenen Einwegtuch ab.
3. Zur Verhinderung einer Kontamination sollten Sie die Röhrchen zu diesem Zeitpunkt nicht öffnen.

### C. Reagenzrekonstitution/Vorbereitung eines neuen Kits

**Hinweis:** Die Reagenzrekonstitution sollte vor dem Arbeiten mit dem Panther System durchgeführt werden.

1. Zum Vorbereiten des TCR wie folgt vorgehen:

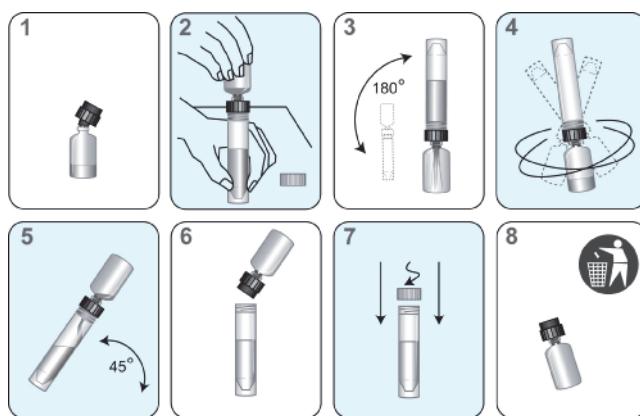
- a. Nehmen Sie das TCR aus der Lagerung (2 °C bis 8 °C). Überprüfen Sie die Chargennummer auf der TCR-Flasche, um sicherzustellen, dass sie mit der Chargennummer auf dem Hauptchargen-Barcodeblatt übereinstimmt.
- b. Schütteln Sie die TCR-Flasche sofort kräftig 10 Mal. Lassen Sie die TCR-Flasche mindestens 45 Minuten bei 15 °C bis 30 °C erwärmen. Während dieser Zeit sollten Sie das TCR-Fläschchen mindestens alle 10 Minuten schwenken und invertieren.

**Option.** Das TCR-Fläschchen kann auf einem geeigneten Wippschüttler folgenderweise vorbereitet werden: Nehmen Sie das TCR aus der Lagerung (2 °C bis 8 °C) und schütteln Sie es sofort kräftig 10 Mal. Platzieren Sie die TCR-Flasche auf einem geeigneten Wippschüttler und lassen Sie sie mindestens 45 Minuten bei 15 °C bis 30 °C erwärmen.

- c. Vergewissern Sie sich vor dem Gebrauch, dass alle Präzipitate gelöst und die Magnetpartikel suspendiert sind.

2. Zum Rekonstituieren von Amplifikations-, Enzym- und Promotorreagenzien gehen Sie folgenderweise vor:
  - a. Nehmen Sie die gefriergetrockneten Reagenzien und die entsprechenden Rekonstitutionslösungen aus der Lagerung (2 °C bis 8 °C). Paaren Sie jede Rekonstitutionslösung mit ihrem gefriergetrockneten Reagenz.
  - b. Vergewissern Sie sich, dass das Etikett der Rekonstitutionslösung und das des gefriergetrockneten Reagenzes dieselbe Farbe aufweisen. Die Chargennummern auf dem Hauptchargen-Barcodeblatt kontrollieren, um sicherzustellen, dass die richtigen Reagenzien miteinander gepaart werden.
    - i. Zum Öffnen des Fläschchens mit dem gefriergetrockneten Reagenz die Metallversiegelung und den Gummistopfen entfernen.
    - ii. Führen Sie das gekerbte Ende des Rekonstitutionsverbindungsstücks (schwarz) fest in das Fläschchen ein (Abbildung 5, Schritt 1).
    - iii. Öffnen Sie die Flasche mit der entsprechenden Rekonstitutionslösung und legen Sie den Verschluss auf eine saubere, abgedeckte Arbeitsfläche.
    - iv. Die Flasche mit der Rekonstitutionslösung auf eine stabile Fläche stellen (z. B. den Labortisch). Drehen Sie dann das Fläschchen mit dem gefriergetrockneten Reagenz über dem Fläschchen mit der Rekonstitutionslösung um und befestigen Sie das Verbindungsstück an dem Fläschchen mit Rekonstitutionslösung (Abbildung 5, Schritt 2).
    - v. Drehen Sie die zusammengefügten Flaschen (Fläschchen verbunden mit Lösungsmittelfläschchen) langsam um, damit die Lösung in das Glasfläschchen fließen kann (Abbildung 5, Schritt 3).
    - vi. Schwenken Sie die zusammengefügten Flaschen mindestens 10 Sekunden lang (Abbildung 5, Schritt 4).
    - vii. Warten Sie mindestens 30 Minuten, damit das gefriergetrocknete Reagenz in Lösung gehen kann.
    - viii. Nachdem das gefriergetrocknete Reagenz in Lösung gegangen ist, die zusammengefügten Flaschen mindestens 10 Sekunden lang schwenken und anschließend die Lösung gründlich mischen, indem das Glasfläschchen leicht nach vorne und hinten gekippt wird.
  - c. Drehen Sie die zusammengefügten Flaschen dann wieder langsam um, damit die Lösung wieder komplett zurück in die Flasche mit der Rekonstitutionslösung fließen kann (Abbildung 5, Schritt 5).
  - d. Entfernen Sie vorsichtig das Rekonstitutionsverbindungsstück und Glasfläschchen (Abbildung 5, Schritt 6).
  - e. Die Flasche wieder verschließen. Schreiben Sie die Initialen des Anwenders und das Rekonstitutionsdatum auf das Etikett (Abbildung 5, Schritt 7).
  - f. Entsorgen Sie das Rekonstitutionsverbindungsstück und das Glasfläschchen (Abbildung 5, Schritt 8).

**Warnung:** Bei der Rekonstitution von Reagenzien übermäßige Schaumbildung vermeiden. Schaum beeinträchtigt die Füllstandsmessung im Panther System.



**Abb. 5. Rekonstitution von Reagenzien**

3. Nehmen Sie das qHBV-Target Enhancer Reagent aus der Lagerung (15 °C bis 30 °C). Tragen Sie die Initialen des Anwenders und das Öffnungsdatum auf dem Etikett ein. Überprüfen Sie die Chargennummer auf der TER-Flasche, um sicherzustellen, dass sie mit der Chargennummer auf dem Hauptchargen-Barcodeblatt übereinstimmt.

#### D. Reagenzienvorbereitung für bereits angesetzte Reagenzien

1. Nehmen Sie die bereits angesetzten Reagenzien aus der Lagerung (2 °C bis 8 °C). Bereits angesetzte Amplification, Enzyme und Promoter Reagents sowie TCR-Reagenzien müssen vor Beginn des Assays auf eine Temperatur von 15 °C bis 30 °C gebracht werden.
2. Nehmen Sie das TER aus der Lagerung (15 °C bis 30 °C).
3. Bei bereits vorbereiteten TCR vor dem Laden auf das System den Schritt C.1 oben durchführen.
4. Vor dem Laden auf das System müssen Amplifikations-, Enzym- und Promotorreagenzien zum gründlichen Mischen geschwenkt und umgedreht werden. Beim Invertieren von Reagenzien übermäßige Schaumbildung vermeiden.

**Option:** Die bereits vorbereiteten Reagenzien können unter Einhaltung der folgenden Anweisungen auf einem Wippschüttler für Reagenzien vorbereitet werden: Reagenzien aus der Kühlung nehmen (2 °C bis 8 °C). Die Reagenzien auf einem Wippschüttler für Reagenzien platzieren und bei 15 °C bis 30 °C 30 Minuten lang aufwärmen.

5. Reagenzflaschen nicht nachfüllen. Das Panther System erkennt Flaschen, die nachgefüllt wurden, und nimmt sie nicht an.

#### E. Probenhandhabung

1. Stellen Sie sicher, dass verarbeitete Proben in primären Röhrchen oder unverdünnte Plasmaproben in sekundären Röhrchen gemäß *Probenentnahme* ordnungsgemäß gelagert wurden.
2. Vergewissern Sie sich, dass gefrorene Patientenproben ganz aufgetaut sind. Mischen Sie die aufgetauten Patientenproben gründlich 3 bis 5 Sekunden auf dem Vortexer.
3. Bringen Sie die Patientenproben vor der Verarbeitung auf eine Temperatur von 15 °C bis 30 °C. Siehe *Proben im Panther System* für zusätzliche Informationen zu im System gelagerten Proben.

4. Es ist sicherzustellen, dass alle primären Entnahmeröhrchen bis zu 1200 µl Probe oder alle SAT mindestens 700 µl Probe enthalten. In der unter *Probenentnahme* aufgeführten Tabelle sind die Anforderungen an das Totvolumen für jeden Typ Primär- und Sekundärröhrchen zu finden. Falls eine Verdünnung der Patientenprobe erforderlich ist, siehe Schritt. 5 unten für zusätzliche Informationen.
5. Verdünnen Sie eine Plasma- oder Serumprobe 1:3 in einem SAT oder 1:100 in einem sekundären Röhrchen.

Für den Test auf dem Panther System kann eine Patientenprobe in einem sekundären Röhrchen verdünnt werden.

**Hinweis:** Wenn eine Patientenprobe verdünnt wird, muss sie sofort nach der Verdünnung analysiert werden.

- a. Verdünnung von Proben, die in kleinen Volumen vorliegen

Das Probenvolumen kann mit dem Aptima Probenverdünner auf das erforderliche Mindestvolumen (700 µl) erhöht werden. Patientenproben mit mindestens 240 µl können wie folgt mit zwei Teilen Probenverdünner (1:3) verdünnt werden:

- i. Geben Sie 240 µl Patientenprobe in das SAT.
- ii. 480 µl Aptima Probenverdünner hinzugeben.
- iii. Verschließen Sie das Röhrchen.

iv. Zum Mischen des Inhalts das Röhrchen vorsichtig fünfmal invertieren.

Patientenproben, die 1:3 verdünnt worden sind, können mit der 1:3-Option auf dem Panther System getestet werden (weitere Informationen finden Sie in *Panther/Panther Fusion System Operator's Manual* [Bedienungsanleitung für das Panther/Panther Fusion System]). Die Software gibt automatisch das Ergebnis für die unverdünnte Probe ab, indem sie den Verdünnungsfaktor anwendet. Solche Patientenproben werden als verdünnte Patientenproben gekennzeichnet.

- b. Verdünnung von Hochtiter-Proben

Liegt das Ergebnis einer Patientenprobe über dem oberen Quantifizierungsgrenzwert (ULoQ), kann sie mit 99 Teilen des Aptima Probenverdünners (1:100) folgenderweise verdünnt werden:

- i. 30 µl Probe in das SAT oder ein sekundäres Röhrchen geben.
- ii. Geben Sie 2970 µl Aptima Probenverdünner hinzu.
- iii. Verschließen Sie das Röhrchen.

iv. Zum Mischen des Inhalts das Röhrchen vorsichtig fünfmal invertieren.

Patientenproben, die 1:100 verdünnt worden sind, können mit der 1:100-Option auf dem Panther System getestet werden (weitere Informationen finden Sie in *Panther/Panther Fusion System Operator's Manual* [Bedienungsanleitung für das Panther/Panther Fusion System]). Die Software gibt automatisch das Ergebnis für die unverdünnte Probe ab, indem sie den Verdünnungsfaktor anwendet. Solche Patientenproben werden als verdünnte Patientenproben gekennzeichnet.

**Hinweis:** Bei verdünnten Proben, deren Konzentration im unverdünnten Zustand über der oberen Quantifizierungsgrenze liegt, werden die Ergebnisse in wissenschaftlicher Notation angegeben.

6. Zentrifugieren Sie jede Patientenprobe unmittelbar vor dem Laden in einen Probenständer 10 Minuten bei 1000 bis 3000g. Die Deckel nicht abnehmen. Luftblasen im Röhrchen können die Füllstandsmessung des Panther Systems stören. Informationen zum Laden des Ständers und zum Abnehmen der Deckel siehe *Vorbereitung des Systems*, Schritt F.2, nachstehend.

## F. Vorbereitung des Systems

1. Richten Sie das System entsprechend den Anweisungen in der *Panther/Panther Fusion System Operator's Manual* (Bedienungsanleitung für das Panther/Panther Fusion System) und den *Verfahrenshinweise* ein. Achten Sie darauf, dass Reagenzienständer und TCR-Adapter geeigneter Größe verwendet werden.
2. Die Proben in den Probenständer laden. Führen Sie für jedes Probenröhrchen (Patientenproben und ggf. Kalibrator und Kontrollen) die folgenden Schritte durch:
  - a. Den Deckel eines Probenröhrchens lösen, aber noch nicht abnehmen.

**Hinweis:** Besonders darauf achten, eine Kontamination durch Aerosolausbreitung zu vermeiden. Die Deckel der Proben vorsichtig lösen.

- b. Das Probenröhrchen in den Probenständer laden.
  - c. Die Schritte 2.a und 2.b für jede verbleibende Probe wiederholen.
  - d. Wenn die Proben in den Probenständer geladen sind, nehmen Sie die Deckel von jedem Probenröhrchen eines Probenständers ab und entsorgen Sie sie. Zur Vermeidung von Kontamination die Deckel nicht über einen Probenständer oder über Probenröhrchen führen.
  - e. Verwenden Sie ggf. eine neue Einwegtransferpipette, um etwaige Luft- oder Schaumbläschen zu entfernen.
  - f. Wenn der letzte Deckel entfernt wurde, laden Sie den Probenständer in ein Probenfach.

**Hinweis:** Bei gleichzeitiger Analyse anderer Assays und Probentypen setzen Sie den Probenhalter ein, bevor Sie den Probenständer in ein Probenfach laden.

- g. Die Schritte 2.a bis 2.f für den nächsten Probenständer wiederholen.

## Verfahrenshinweise

### A. Kalibrator und Kontrollen

1. Der qHBV-Positivkalibrator, die Röhrchen mit der schwach positiven, der stark positiven und der negativen qHBV-Kontrolle können in jede Position im Probenständer und in jede Probenfach-Bahn auf dem Panther System geladen werden. Die Pipettierung der Proben beginnt, wenn eine der beiden folgenden Bedingungen erfüllt ist:
  - a. Der Kalibrator und die Kontrollen werden derzeit vom System verarbeitet.
  - b. Gültige Ergebnisse für die Kalibratoren und Kontrollen werden auf dem System registriert.
2. Sobald der Kalibrator und die Röhrchen mit den Kontrollen pipettiert worden sind und mit dem Aptima HBV Quant Assayreagenzien-Kit verarbeitet werden, können bis zu 24 Stunden lang Patientenproben mit dem zugehörigen rekonstituierten Kit getestet werden, **es sei denn:**
  - a. Die Kalibrator- oder Kontrollenergebnisse sind ungültig.
  - b. Das zugehörige Assay-Reagenzien-Kit aus dem System genommen wird.
  - c. Die Haltbarkeit des zugehörigen Assayreagenzienkits überschritten ist.
3. Das Kalibrator- und alle Kontrollenröhrchen können einmal verwendet werden. Wenn versucht wird, mehr als einmal aus dem Röhrchen zu pipettieren, kann es zu Verarbeitungsfehlern kommen.

### B. Handschuhpuder

Wie in jedem Reagenzsystem kann übermäßiger Puder auf manchen Handschuhen eine Kontamination geöffneter Röhrchen verursachen. Es werden ungepuderte Handschuhe empfohlen.

## Qualitätskontrolle

Ein Lauf- oder Patientenprobenergebnis kann von einem Anwender für ungültig erklärt werden, wenn während der Durchführung des Assays technische, anwender- oder gerätebezogene Probleme aufgetreten sind und dokumentiert wurden. In diesem Fall müssen die Proben erneut getestet werden.

### Assay-Kalibrierung

Zur Erzeugung gültiger Ergebnisse muss eine Assay-Kalibrierung durchgeführt werden sein. Ein einzelner Positivkalibrator wird jedes Mal, wenn ein Reagenzien-Kit auf das Panther System geladen wird, dreimal analysiert. Sobald festgelegt, ist die Kalibrierung bis zu 24 Stunden gültig. Der Anwender wird von der Software auf dem Panther System darauf aufmerksam gemacht, wenn eine Kalibrierung erforderlich ist. Der Anwender scannt einen Kalibrierungskoeffizienten, der auf dem jedem Reagenzien-Kit beiliegenden Master-Lot-Barcodeblatt angegeben ist.

Während der Verarbeitung werden die Annahmekriterien für den Kalibrator von der Software auf dem Panther System automatisch verifiziert. Wenn weniger als zwei Kalibratorreplikate gültig sind, erklärt die Software den Lauf automatisch für ungültig. Proben eines für ungültig erklärt Laufs sind mit einem frisch vorbereiteten Kalibrator und frisch vorbereiteten Kontrollen erneut zu testen.

### Negativ- und Positivkontrollen

Zur Erzeugung gültiger Ergebnisse muss ein Satz von Assay-Kontrollen getestet werden. Ein Replikat der Negativkontrolle, der schwach positiven Kontrolle und der stark positiven Kontrollen muss jedes Mal, wenn ein Reagenzien-Kit auf das Panther System geladen wird, getestet werden. Sobald festgelegt, sind die Kontrollen bis zu 24 Stunden gültig. Der Anwender wird von der Software auf dem Panther System darauf aufmerksam gemacht, wenn Kontrollen erforderlich sind.

Während der Verarbeitung werden Kriterien für die Annahme der Kontrollen von der Software auf dem Panther System automatisch verifiziert. Zur Erzeugung gültiger Ergebnisse muss die Negativkontrolle ein Ergebnis „Nicht nachgewiesen“ liefern und die Ergebnisse der Positivkontrollen müssen innerhalb vordefinierter Parameter liegen (LPC-Nominalziel:  $2,7 \log_{10}$  IE/ml, HPC-Nominalziel:  $4,6 \log_{10}$  IE/ml). Wenn das Ergebnis für eine der Kontrollen ungültig ist, erklärt die Software den Lauf automatisch für ungültig. Proben eines für ungültig erklärt Laufs sind mit einem frisch vorbereiteten Kalibrator und frisch vorbereiteten Kontrollen erneut zu testen.

### Interner Kalibrator/Interne Kontrolle

Jede Probe enthält einen internen Kalibrator/eine interne Kontrolle (IC). Während der Verarbeitung werden IC-Annahmekriterien von der Software auf dem Panther System automatisch verifiziert. Wenn ein IC-Ergebnis ungültig ist, wird das Probenergebnis für ungültig erklärt. Jede Probe mit ungültigem IC-Ergebnis muss erneut getestet werden, um ein gültiges Ergebnis zu erhalten.

Die Panther System Software verifiziert alle Prozesse genau, wenn gemäß den Anweisungen in dieser Packungsbeilage und in der *Panther/Panther Fusion System Operator's Manual* (Bedienungsanleitung für das Panther/Panther Fusion System) verfahren wird.

## Interpretation der Ergebnisse

Das Panther System bestimmt die Konzentration der HBV-DNA in Patientenproben und Kontrolle automatisch, indem es die Ergebnisse mit einer Kalibrationskurve vergleicht. Die HBV DNA-Konzentrationen sind in IE/ml und  $\log_{10}$  IE/ml angegeben.

Die Ergebnisauswertung wird in Tabelle 1 bereitgestellt. Wenn die Verdünnungsoption verwendet wird, berechnet das Panther System automatisch die HBV-DNA-Konzentration für die unverdünnte Patientenprobe, indem die verdünnte Konzentration mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert wird. Verdünnte Proben werden in den Ergebnissen entsprechend gekennzeichnet.

**Hinweis:** Bei verdünnten Patientenproben können Ergebnisse wie „Nicht nachgewiesen“ oder „<10 nachgewiesen“ erhalten werden, indem eine Patientenprobe mit einer Konzentration über, aber nahe der LoD (Limit of Detection, Nachweisgrenze) bzw. der LLoQ (Lower Limit of Quantitation, untere Qualifizierungsgrenze) verdünnt wird. Es wird empfohlen, eine andere unverdünnte Patientenprobe zu entnehmen und zu testen, wenn kein quantitatives Ergebnis erhalten wird.

Tabelle 1: Ergebnisinterpretation

Messergebnis des Aptima HBV Quant Assays		Auswertung
IE/ml	$\log_{10}$ IE/ml <sup>a</sup>	
Nicht nachgewiesen	Nicht nachgewiesen	HBV-DNA nicht nachgewiesen
< 10 nachgewiesen	< 1,00	Es wird HBV-DNA nachgewiesen, aber in einer Menge unterhalb der unteren Quantifizierungsgrenze (LLoQ).
10 bis 1.000.000.000	1,00 bis 9,00	Die HBV-DNA-Konzentration liegt im linearen Bereich von 10 bis 1.000.000.000 IE/ml.
> 1.000.000.000	> 9,00	Die HBV-DNA-Konzentration liegt über der oberen Quantifizierungsgrenze (ULoQ).
Ungültig <sup>b</sup>	Ungültig <sup>b</sup>	Bei der Erzeugung des Ergebnisses wird ein Fehler angezeigt. Die Patientenprobe sollte noch einmal getestet werden.

<sup>a</sup> Wert ist auf zwei Dezimalstellen gekürzt.

<sup>b</sup> Ungültige Ergebnisse sind in blauer Schrift angezeigt.

Bei verdünnten Proben, deren Konzentration im unverdünnten Zustand über der oberen Quantifizierungsgrenze liegt, werden die Ergebnisse in wissenschaftlicher Notation angegeben.

Die Annahmekriterien für jede der Aptima HBV Quant Assaykontrollen sind unten in Tabelle 2 aufgeführt.

**Hinweis:** Der unten aufgeführte Wiederherstellungsbereich verschiebt sich je nach dem zugewiesenen Wert der jeweiligen Charge. Siehe die zugewiesene Konzentration auf dem Barcode-Blatt der Kontrolle, das jeder Kontrollen-Verpackung beigelegt ist.

Tabelle 2: Annahmekriterien für den Wiederherstellungsbereich für Aptima HBV Quant Assaykontrollen

Komponente	Bereich für gültige Läufe
Negativkontrolle	n. z.
Niedrige Positivkontrolle	+/- 0,55 $\log_{10}$ IE/ml
Hohe Positivkontrolle	+/- 0,5 $\log_{10}$ IE/ml

## **Einschränkungen**

- A. Dieser Assay darf nur von geschulten Mitarbeitern durchgeführt werden, die im Verfahren unterwiesen wurden. Eine Nichtbefolgung der Anweisungen in dieser Packungsbeilage kann fehlerhafte Ergebnisse zur Folge haben.
- B. Zuverlässige Ergebnisse hängen von der korrekten Entnahme, dem Transport, der Lagerung und der Verarbeitung der Patientenproben ab.

## Analytische Leistung

### Nachweisgrenze mit dem 3. Internationalen WHO-Standard

Die Nachweisgrenze (Limit of Detection, LoD) des Assays ist definiert als die HBV-DNA-Konzentration, die gemäß CLSI EP17-A2 mit einer Wahrscheinlichkeit von mindestens 95% festgestellt wird.<sup>11</sup>

Die LoD wurde durch Testung von Panels des 3. internationalen WHO-Standards für Hepatitis-B-Viren-DNA (NIBSC 10/264, Genotyp A), verdünnt in HBV-negativem EDTA-Humanplasma und -serum, bestimmt. Es wurden mindestens 36 Replikate jeder Verdünnung mit jeder der drei Reagenzchargen getestet, was mindestens 108 Replikate pro Verdünnung ergab. Zur Aufstellung der vorhergesagten 95%igen Nachweisgrenzen wurde eine Probit-Analyse durchgeführt. Bei den LoD-Werten handelt es sich um die Ergebnisse der Reagenzchargen mit der höchsten vorhergesagten Nachweisgrenze. Die LoD für den Aptima HBV Quant Assay bei Verwendung des 3. internationalen WHO-Standards beträgt 4,8 IE/ml für Plasma und 5,9 IE/ml für Serum.

### Nachweisgrenze bei HBV-Genotypen

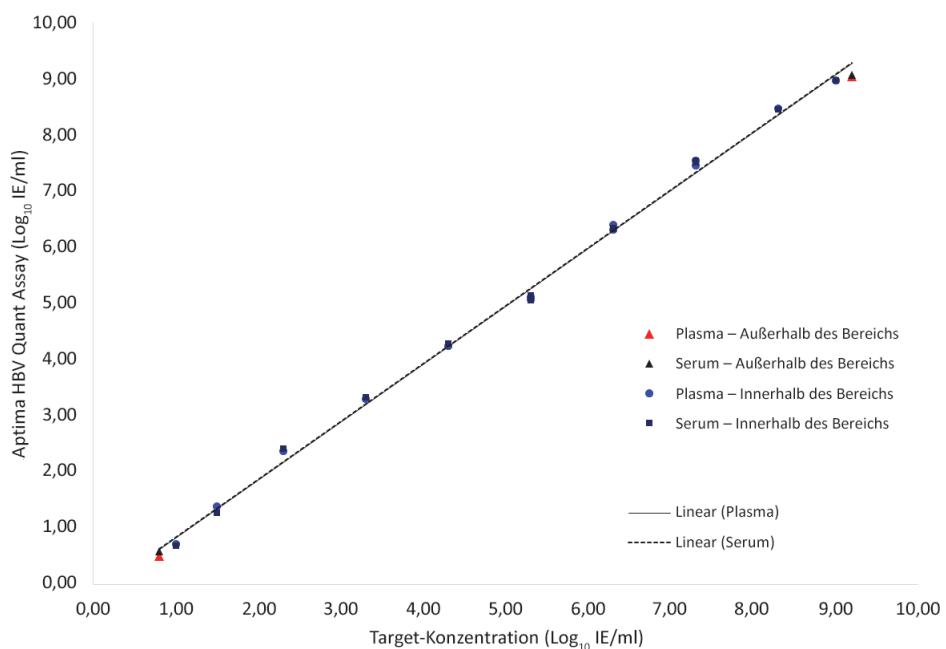
Zur Ermittlung der LoD wurden HBV-positive klinische Patientenproben der Genotypen A, B, C, D, E, F, G und H mit HBV-negativem Humanplasma und -serum verdünnt und dann getestet. Konzentrationen wurden durch einen zugelassenen Assay bestimmt. Es wurden mindestens 24 Replikate jeder Panelprobe mit jeder der beiden Reagenzchargen getestet, was mindestens 48 Replikate pro Panelprobe ergab. Zur Aufstellung der vorhergesagten 95%igen Nachweisgrenzen wurde eine Probit-Analyse durchgeführt. Bei den in Tabelle 3 dargestellten LoD-Werten handelt es sich um die Ergebnisse der Reagenzchargen mit der höchsten vorhergesagten Nachweisgrenze.

*Tabelle 3: Nachweisgrenze (95% Vorhergesagte Nachweisgrenze) bei HBV-Genotypen bei Verwendung klinischer Patientenproben*

Genotyp	Konzentration (IE/ml)	
	Plasma	Serum
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

## Linearer Bereich

Der lineare Bereich wurde durch Testung von Panels mit in HBV-negativem Humanplasma und -serum verdünntem HBV-Virus Genotyp A ( $0,78 \log_{10}$  IE/ml bis  $7,30 \log_{10}$  IE/ml) und Plasmid-DNA ( $5,30 \log_{10}$  IE/ml bis  $9,18 \log_{10}$  IE/ml) gemäß CLSI EP06-A bestimmt.<sup>12</sup> Wie in Abbildung 6 dargestellt, erwies sich der Aptima HBV Quant Assay im gesamten Testbereich als linear, mit einer oberen Quantifizierungsgrenze (Upper Limit of Quantitation, ULoQ) von  $9 \log_{10}$  IE/ml.



**Abb. 6. Linearität in Plasma und Serum**

## Linearität bei HBV-Genotypen

Die Linearität der HBV-Genotypen wurde durch Testung einzelner klinisch positiver Proben für die Genotypen A, E, F, G und H sowie der 1. WHO-Referenzpanels des PEI (PEI 5086/08) für die Genotypen B, C und D ermittelt. Das Virus wurde für den unteren Bereich des Assays verwendet ( $4 \log_{10}$  IE/ml und darunter für die Genotypen A-G,  $3 \log_{10}$  IE/ml und darunter für Genotyp H). Für den oberen Bereich wurde Plasmid-DNA mit einer Überlappung von  $2 \log_{10}$  verwendet. Verdünnungen in negativem Humanplasma wurden für alle Genotypen getestet. Über den gesamten Testbereich wurde Linearität für alle getesteten Genotypen aufgezeigt, wie in Abbildung 7 dargestellt.

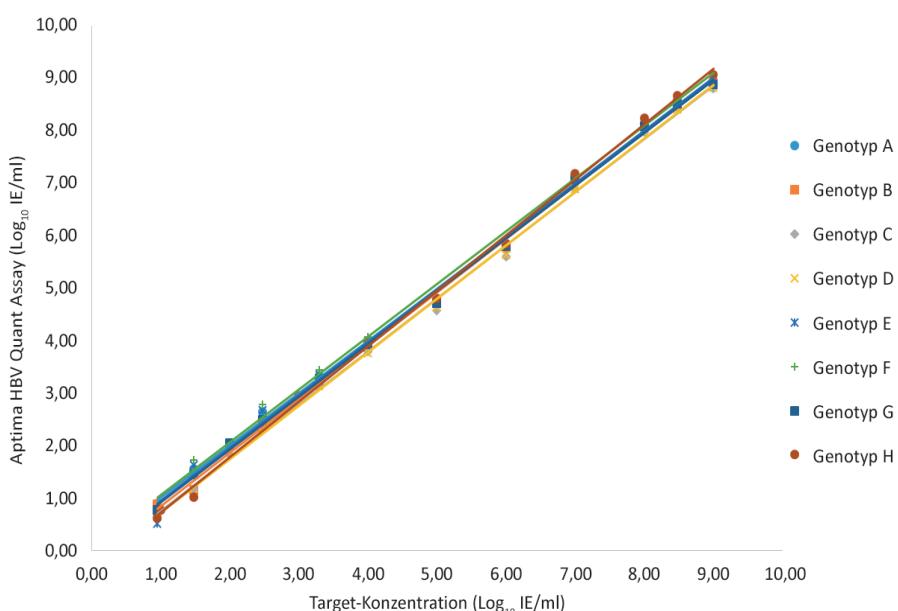


Abb. 7. Linearer Bereich und Linearität (Plasma)

## Untere Quantifizierungsgrenze mit dem 3. Internationalen WHO-Standard

Die untere Quantifizierungsgrenze ist definiert als die niedrigste Konzentration, bei der HBV-DNA innerhalb eines Gesamtfehlers (Total Error, TE) zuverlässig gemäß CLSI EP17-A2 quantifiziert werden kann.<sup>11</sup> Der Gesamtfehler wurde mit den folgenden zwei Methoden ermittelt:

Total Analytical Error (TAE - Gesamtanalysefehler) =  $|Bias| + 2 SD$ , und Total Error (TE - Gesamtfehler) =  $SQRT(2) \times 2 SD$ .

Zur Gewährleistung der Genauigkeit und Präzision der Messungen wurde für den Gesamtfehler des Aptima HBV Quant Assays  $1 \log_{10}$  IE/ml festgelegt (d. h. an der LLOQ ist der Unterschied zwischen zwei Messungen von mehr als  $1 \log_{10}$  IE/ml statistisch signifikant).

Die LLoQ wurde durch Testung von Panels des 3. Internationalen WHO-Standards für Hepatitis-B-Virus-DNA (NIBSC 10/264, Genotyp A), verdünnt in HBV-negativem Humanplasma und -serum, bestimmt. Es wurden 45 Replikate jeder Verdünnung mit jeder der drei Reagenzchargen getestet, was mindestens 135 Replikate pro Verdünnung ergab. Die Ergebnisse für die drei Reagenzchargen sind in Tabelle 4 für Plasma und in Tabelle 5 für Serum dargestellt. Die Ergebnisse für die niedrigste beobachtete Konzentration, welche das Genauigkeitsziel ( $TE \leq 1 \log_{10}$  IE/ml und  $TE \leq 1 \log_{10}$  IE/ml) mit einem Nachweis von  $>95\%$  und größer oder gleich der LoD erfüllt hat, sind in beiden Tabellen schattiert und in Tabelle 6 zusammengefasst.

Der errechnete LLoQ-Wert für den 3. Internationalen WHO-Standard für Hepatitis-B-Virus liegt für Plasma bei 6 IE/ml (0,79  $\log_{10}$  IE/ml) und für Serum bei 8 IE/ml (0,88  $\log_{10}$  IE/ml); Grundlage hierfür ist die höchste errechnete Konzentration innerhalb der drei Reagenzienchargen gemäß CLSI EP17-A2. Die LLoQ wurde für alle Genotypen bestimmt (siehe *Untere Qualifizierungsgrenze bei HBV-Genotypen*). Aus den Genotyp-Daten ergibt sich für den Assay eine untere Quantifizierungsgrenze von 10 IE/ml.

*Tabelle 4: Untere Quantifizierungsgrenze LLoQ mit dem 3. Internationalen WHO-Standard für HBV in Plasmaverdünnung*

Reagenzcharge	Aptima HBV Quant (IE/ml)	Aptima HBV Quant ( $\log_{10}$ IE/ml)	SAT ( $\log_{10}$ IE/ml)	Abweichung ( $\log_{10}$ IE/ml)	Berechneter TE ( $\log_{10}$ IE/ml)	Berechneter TAE ( $\log_{10}$ IE/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 = Standardabweichung.

Panelproben, die das Genauigkeitsziel (TE  $\leq 1$  und TAE  $\leq 1$ ), > LoD und > 95 % Detektion für die Reagenzchargen 1, 2 und 3 erfüllen, sind schattiert.

*Tabelle 5: Untere Quantifizierungsgrenze LLoQ mit dem 3. Internationalen WHO-Standard für HBV in Serumverdünnung*

Reagenzcharge	Aptima HBV Quant (IE/ml)	Aptima HBV Quant ( $\log_{10}$ IE/ml)	SAT ( $\log_{10}$ IE/ml)	Abweichung ( $\log_{10}$ IE/ml)	Berechneter TE ( $\log_{10}$ IE/ml)	Berechneter TAE ( $\log_{10}$ IE/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 = Standardabweichung.

Panelproben, die das Genauigkeitsziel (TE  $\leq 1$  und TAE  $\leq 1$ ), > LoD und > 95 % Detektion für die Reagenzchargen 1, 2 und 3 erfüllen, sind schattiert.

*Tabelle 6: Zusammenfassung der errechneten LLoQ mit dem 3. Internationalen WHO-Standard für HBV*

Reagenzcharge	LLoQ Plasma		LLoQ Serum	
	IE/ml	$\log_{10}$ IE/ml	IE/ml	$\log_{10}$ IE/ml
1	5	0,70	4	0,65
2	5	0,69	5	0,72
3	6	0,79	8	0,88

## Untere Qualifizierungsgrenze bei HBV-Genotypen

Zur Ermittlung der LLoQ wurden HBV-positive klinische Patientenproben der Genotypen A, B, C, D, E, F, G und H mit HBV-negativem Humanplasma und -serum verdünnt und dann getestet. Die Zuweisung der Konzentration von klinischen Patientenproben wurde über einen Vergleichsassay bestimmt. Es wurden insgesamt 36 Replikate jeder Panelprobe mit jeder der beiden Reagenzchargen getestet, was mindestens 72 Replikate pro Panelprobe ergab. Die Ergebnisse für die niedrigste beobachtete Konzentration, welche das Genauigkeitsziel ( $TE \leq 1 \log_{10} \text{IE/ml}$  und  $TAE \leq 1 \log_{10} \text{IE/ml}$ ) mit einem Nachweis von  $>95\%$  für jede Reagenzcharge erfüllte, sind in Tabelle 7 für Plasma und Tabelle 8 für Serum dargestellt. Die höchste beobachtete Konzentration bei den Reagenzchargen für jeden Genotyp ist in Tabelle 9 zusammengefasst. Genotype D in Serum wies mit 9 IE/ml ( $0,96 \log_{10} \text{IE/ml}$ ) den höchsten LLoQ auf. Dies stützte die Gesamt-LLoQ für den Assay von 10 IE/ml.

Tabelle 7: Bestimmung der LLoQ bei HBV-Genotypen in Plasma

HBV-Genotyp	Reagenz-charge	Aptima HBV Quant <sup>a</sup> (IE/ml)	Aptima HBV Quant <sup>a</sup> ( $\log_{10}$ IE/ml)	SAT ( $\log_{10}$ IE/ml)	Abweichung ( $\log_{10}$ IE/ml)	Berechneter TE ( $\log_{10}$ IE/ml)	Berechneter TAE ( $\log_{10}$ IE/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 = Standardabweichung.

<sup>a</sup> Es wurden Läufe mit zusätzlichen Werten ausgeführt, aber die Daten sind in der Tabelle nicht angegeben.

Tabelle 8: Bestimmung der LLoQ bei HBV-Genotypen in Serum

HBV-Genotyp	Reagenz-charge	Aptima	Aptima	SAT	Abweichung	Berechneter TE	Berechneter TAE
		HBV Quant <sup>a</sup> (IE/ml)	HBV Quant <sup>a</sup> ( $\log_{10}$ IE/ml)			( $\log_{10}$ IE/ml)	( $\log_{10}$ IE/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 = Standardabweichung.

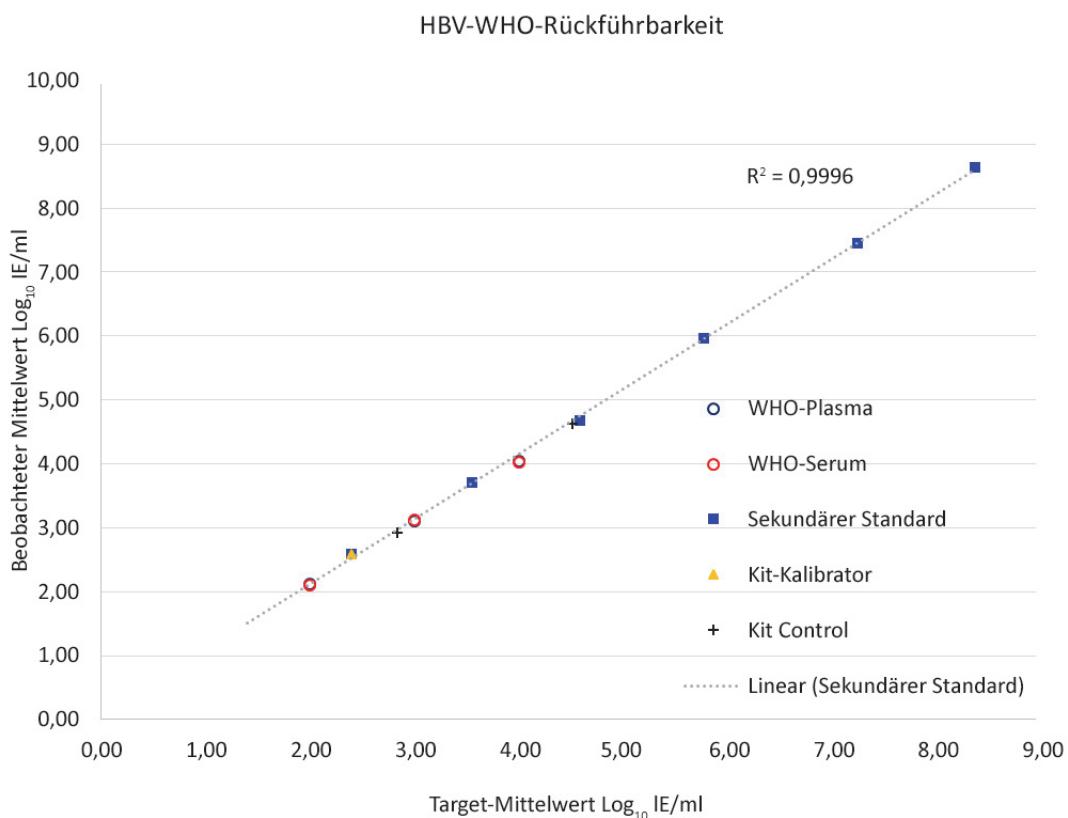
<sup>a</sup> Es wurden Läufe mit zusätzlichen Werten ausgeführt, aber die Daten sind in der Tabelle nicht angegeben.

Tabelle 9: Zusammenfassung der LLoQ bei Genotypen in Plasma und Serum

Genotyp	LLoQ Plasma		LLoQ Serum	
	IE/ml	$\log_{10}$ IE/ml	IE/ml	$\log_{10}$ IE/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

## Rückführbarkeit auf den 3. Internationalen WHO-Standard

Für die Etablierung der Rückführbarkeit auf den WHO-Standard wurde während der gesamten Produktentwicklung und Produktfertigung eine Reihe sekundärer Standards mit bekannten Konzentrationen verwendet. Die für den HBV-WHO-Standard getesteten Konzentrationen lagen zwischen 2,0 und 4,0  $\log_{10}$  IE/ml, die Konzentrationen der sekundären Standards variierten von 2,4 bis 8,4  $\log_{10}$  IE/ml. Die Aptima HBV Quant Assaykontrollen und Kalibratoren wurden ebenfalls mit den sekundären Standards und dem WHO-Standard getestet. Alle Panel zeigten ähnliche Ergebnisse und waren linear im gesamten linearen Bereich des Assays verteilt, wie in Abbildung 8 dargestellt.



**Abb. 8. Rückführbarkeit zwischen den Target-Konzentrationen des 3. HBV-WHO-Standards und der beobachteten Konzentration vom Aptima HBV Quant Assay**

## Präzision

Das Aptima HBV Quant Präzisionspanel wurde erstellt, indem HBV-Virus vom Genotyp A und HBV-Plasmid-DNA in HBV-negatives klinisches Plasma und HBV-negatives klinisches Serum verdünnt wurde (die vier höchsten Panelproben in jeder Matrix waren Plasmid-DNA). 11 Panelproben in jeder Matrix umfassten den Bereich des Assays (Target-Konzentrationen von 1,30  $\log_{10}$  IE/ml bis 8,90  $\log_{10}$  IE/ml) und wurden von einem Anwender in drei Replikaten pro Lauf unter Verwendung von drei Reagenzchargen auf einem Panther System über drei Tage mit zwei Läufen pro Tag getestet.

In Tabelle 10 ist die Präzision der Assay-Ergebnisse (in  $\log_{10}$  IE/ml) zwischen Tagen, Chargen, Läufen sowie innerhalb von Läufen und insgesamt dargestellt. Die Gesamtvariabilität wurde hauptsächlich durch die Messung innerhalb der Läufe bestimmt (d. h. durch Zufallsfehler).

Tabelle 10: Präzision des Aptima HBV Quant Assays

Matrix	Probe	N	Mittlere Konzentration	Mittlere Konzentration	Vergleich Chargen	Vergleich Chargen	Vergleich Tage	Vergleich Tage	Vergleich Läufe	Vergleich Läufe	Vergleich innerhalb eines Laufs	Vergleich innerhalb eines Laufs	Gesamt	Gesamt
			(IE/ml)	( $\log_{10}$ IE/ml)	SA	log-normaler VK (%)	SA	log-normaler VK (%)	SA	log-normaler VK (%)	SA	log-normaler VK (%)	SA	log-normaler VK (%)
Plasma	Virus	34 <sup>a</sup>	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
	Plasmid-DNA	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
	Virus	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
	Plasmid-DNA	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
	Virus	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
	Plasmid-DNA	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
		54	612.200.000	8,78	0,03	7,6	0,01	1,9	0,01	1,5	0,04	9,0	0,05	12,0
Serum	Virus	29 <sup>a</sup>	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
	Plasmid-DNA	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
	Virus	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
	Plasmid-DNA	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
	Virus	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
	Plasmid-DNA	53 <sup>b</sup>	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 = Standardabweichung.

<sup>a</sup> Nachgewiesene Replikate mit quantifizierbarem Ergebnis, insgesamt nachgewiesene Replikate = 54.<sup>b</sup> Bei einem Replikat war das Ergebnis ungültig. $\log\text{-normaler VK}(\%) = \sqrt{10^{(SD^2 * \ln(10))} - 1} * 100$

## Mögliche interferierende Substanzen

Es wurde die Anfälligkeit des Aptima HBV Quant Assays gegenüber Interferenzen durch erhöhte Konzentrationen endogener Stoffe oder von Wirkstoffen, die HBV-Infizierten häufig verordnet werden, evaluiert. Es wurden HBV-negative Plasmaproben und Proben getestet, die mit HBV bis zu Konzentration von etwa 30 IE/ml (1,48 log<sub>10</sub> IE/ml) und 20.000 IE/ml (4,30 log<sub>10</sub> IE/ml) versetzt waren.

Bei Vorhandensein von Albumin (90 mg/ml), Hämoglobin (5 mg/ml), Triglyceriden (30 mg/ml) oder unkonjugiertem Bilirubin (0,2 mg/ml) wurde keine Beeinträchtigung der Assay-Leistung festgestellt.

Klinische Plasmaproben von Patienten mit erhöhten Konzentrationen definierter Stoffe oder von Patienten mit den in Tabelle 11 gelisteten Krankheiten wurden mit dem Aptima HBV Quant Assay getestet. Dabei wurden zehn Proben für jeden Stoff verwendet. Es wurde keine Interferenz der Assay-Leistung beobachtet.

*Tabelle 11: Getestete Typen klinischer Patientenproben*

Typen klinischer Patientenproben	
<b>1</b>	Antinukleäre Antikörper (ANA)
<b>2</b>	Rheumafaktor (RF)
<b>3</b>	Alkoholbedingte Zirrhose (AC)
<b>4</b>	Alkoholbedingte Hepatitis
<b>5</b>	Hepatitis ohne Alkoholgenese
<b>6</b>	Autoimmune Hepatitis
<b>7</b>	Erhöhte Alaninaminotransferase (ALT)
<b>8</b>	Hepatozelluläres Karzinom (HCC)
<b>9</b>	Multiple Sklerose (MS)
<b>10</b>	Systemischer Lupus erythematoses (SLE)
<b>11</b>	Hyperglobulinämie
<b>12</b>	Rheumatoide Arthritis (RA)
<b>13</b>	Anti-Jo1-Antikörper (JO-1)
<b>14</b>	Multiples Myelom (MM)
<b>15</b>	Hämolsiert (erhöhtes Hämoglobin)
<b>16</b>	Ikterisch (erhöhtes Bilirubin)
<b>17</b>	Lipämisich (erhöhte Lipide)
<b>18</b>	Erhöhtes Protein

Bei Vorhandensein der in Tabelle 12 gelisteten exogenen Stoffe in Konzentrationen vom mindestens Dreifachen der  $C_{max}$  (Humanplasma) wurde Beeinträchtigung der Assay-Leistung festgestellt.

*Tabelle 12: Exogene Stoffe*

Pool von exogenen Stoffen	Getestete exogene Stoffe
1	Saquinavir, Ritonavir, Amprenavir, Indinavir, Lopinavir, Nelfinavirmesylat
2	Clarithromycin, Valganciclovir (als HCl), Efavirenz, Nevirapin
3	Paroxetin-HCl, Enfuvirtid, Zidovudin, Didanosin, Abacavir (als Sulfat)
4	Ribavirin, Entecavir, Adefovirdipivoxil, Tenofovirdisoproxil (als Fumarat), Lamivudin, Ganciclovir, Aciclovir
5	Stavudin, Ciprofloxacin, Fluoxetin, Azithromycin, Valaciclovir, Sertraline, Zalcitabin
6	Interferon alpha-2a, Interferon alpha-2b, pegyierte Interferon alpha-2b

## Analytische Spezifität

Die potenzielle Kreuzreaktivität auf die in Tabelle 13 gelisteten Pathogene wurde in HBV-negativem Humanplasma bei Vorhandensein oder Abwesenheit von HBV-DNA mit 30 IE/ml ( $1,5 \log_{10}$  IE/ml) und 20.000 ( $4,3 \log_{10}$  IE/ml) beurteilt. Es wurde keine Kreuzreaktivität festgestellt. Bei Gegenwart der Erreger wurde keine Interferenz festgestellt.

Tabelle 13: Zur Ermittlung der Analysespezifität getestete Erreger

Mikroorganismus/Keim	Konzentration		Mikroorganismus/Keim	Konzentration	
Adenovirus 5	100.000	TCID50/ml <sup>a</sup>	<i>Candida albicans</i>	1.000.000	KBE/ml <sup>e</sup>
Humanes BK-Polyomavirus	1000	TCID50/ml	<i>Chlamydia trachomatis</i>	1.000.000	IFU/ml <sup>f</sup>
Cytomegalovirus	100.000	TCID50/ml	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	1.000.000	KBE/ml
Dengue-Virus 1	10.000	TCID50/ml	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1.000.000	KBE/ml
Dengue-Virus 2	10.000	TCID50/ml	<i>Propionibacterium acnes</i>	1.000.000	KBE/ml
Dengue-Virus 3	10.000	TCID50/ml	<i>Staphylococcus aureus</i>	1.000.000	KBE/ml
Dengue-Virus 4	100.000	TCID50/ml	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1.000.000	KBE/ml
Epstein-Barr-Virus	100.000	Kopien/ml	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1.000.000	KBE/ml
Influenza H1N1	100.000	TCID50/ml	<i>Trichomonas vaginalis</i>	1.000.000	KBE/ml
Hepatitis-A-Virus	100.000	TCID50/ml	<sup>a</sup> TCID50/ml = Gewebekultur-Infektionsdosis - Einheiten pro ml		
Hepatitis-C-Virus	100.000	IE/ml <sup>b</sup>	<sup>b</sup> IE/ml = Internationale Einheiten pro ml		
Hepatitis-G-Virus	100.000	Kopien/ml	<sup>c</sup> vp/ml = Viruspartikel pro ml		
Humanes Herpesvirus 6B	100.000	Kopien/ml	<sup>d</sup> LD50/ml = lethale Dosis pro ml		
Humanes Herpesvirus 8	100.000	Kopien/ml	<sup>e</sup> KBE/ml = Kolonie-bildende Einheiten pro ml		
HIV-1	100.000	IE/ml	<sup>f</sup> IFU/ml = Einschlusskörper-bildende Einheiten pro ml		
HIV-2	10.000	TCID50/ml			
Humanes Papillomvirus	100.000	Kopien/ml			
Herpes-simplex-Virus Typ 1 (HSV-1)	100.000	TCID50/ml			
Herpes-simplex-Virus 2 (HSV-2)	100.000	TCID50/ml			
Humanes T-Zell-lymphotropes Virus 1 (HTLV-1)	100.000	vp/ml <sup>c</sup>			
Humanes T-Zell-lymphotropes Virus 2 (HTLV-2)	100.000	vp/ml			
Japanische-Enzephalitis-Virus	nicht zutr.	nicht zutr.			
Murray-Valley-Enzephalitis-Virus	2000	LD50/ml <sup>d</sup>			
Parvovirus B19	100.000	IE/ml			
Rötelnvirus	10.000	TCID50/ml			
St. Louis-Enzephalitis-Virus	100.000	TCID50/ml			
Vacciniaivirus	1000	TCID50/ml			
West-Nil-Virus	100.000	TCID50/ml			
Gelbfiebervirus	100.000	TCID50/ml			

## Matrix-Äquivalenz

E wurden 118 Proben-Sets aus zusammengehörenden Blutentnahmeröhrchen (Serumröhrchen, ACD, K2 EDTA, K3 EDTA, PPT, SST) hinsichtlich der Matrix-Äquivalenz beurteilt. Von diesen waren 44 Sets natürlich infiziert HBV-positiv und 74 Sets waren HBV-negativ und mit dem HBV-Virus versetzt. Die Korrelation für jede Art von Blutentnahmeröhrchen, wie mit dem Serumentnahmeröhrchen als Komparator gemessen, ist in Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 14: Studie zur Matrix-Äquivalenz

Blutentnahme Röhrchen	Deming-Regression	95 % KI der Steigung		95 % KI des Achsenabschnitts		R <sup>2</sup>	Mittelwertdifferenz (Log <sub>10</sub> )
		Untere Grenze	Obere Grenze	Untere Grenze	Obere Grenze		
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

KI = Konfidenzintervall.

## Probenverdünnung mit Aptima Probenverdünnner (1:3)

Für die Beurteilung der Nachweisgenauigkeit von HBV-DNA in mit dem Aptima Probenverdünnner verdünnten Proben wurden Proben, die den linearen Bereich umfassten, im Verhältnis 1:3 mit Aptima Probenverdünnner verdünnt (z. B. 240 µl der Probe in Kombination mit 480 µl Aptima Probenverdünnner). Jede Probe wurde unverdünnt und verdünnt (1:3) in dreifacher Ausführung getestet. Die Tests wurden unter Verwendung von einer Charge Assayreagenzien auf zwei Panther Systemen mit zwei Chargen des Aptima Probenverdünners durchgeführt. Die Differenz zwischen der angegebenen Durchschnittskonzentration in nativer Matrix (auf das Ergebnis für die verdünnte Probe angewandter Verdünnungsfaktor) und der Durchschnittskonzentration in Aptima Probenverdünnner werden in Tabelle 15 für Plasma und in Tabelle 16 für Serum aufgeführt. Die Probenkonzentrationen wurden in den verdünnten Proben genau wiederhergestellt.

Tabelle 15: Verdünnung der Plasmaproben im Verhältnis 1:3 – Zusammenfassung des Matrix-Vergleichs

Plasma-Matrix Mittlere angegebene Konzentration ( $\log_{10}$ IE/ml) n = 9	Verdünner Mittlere angegebene Konzentration ( $\log_{10}$ IE/ml) n = 18	Differenz Verdünner aus Plasma-Matrix ( $\log_{10}$ IE/ml)
1,20 <sup>a</sup>	1,11 <sup>b</sup>	-0,09
1,56 <sup>a</sup>	1,36 <sup>b</sup>	-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

<sup>a</sup> n = 21.<sup>b</sup> n = 42.

Tabelle 16: Verdünnung der Serumproben im Verhältnis 1:3 – Zusammenfassung des Matrix-Vergleichs

Serum-Matrix Mittlere angegebene Konzentration ( $\log_{10}$ IE/ml) n = 9	Verdünner Mittlere angegebene Konzentration ( $\log_{10}$ IE/ml) n = 18	Differenz Verdünner aus Serum-Matrix ( $\log_{10}$ IE/ml)
1,21 <sup>a</sup>	1,11 <sup>b</sup>	-0,10
1,54 <sup>a</sup>	1,36 <sup>b</sup>	-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

<sup>a</sup> n = 21.<sup>b</sup> n = 42.

## Probenverdünnung mit Aptima Probenverdünnung (1:100)

Für die Beurteilung der Nachweisgenauigkeit von HBV-DNA in mit dem Aptima Probenverdünnung, Plasma oder Serum verdünnten Proben wurden acht einzelne Plasmaproben und acht einzelne Serumproben, die mit dem HBV-Virus versetzt waren und auf 6 bis 8  $\log_{10}$  IE/ml abzielten, zusammen mit acht einzelnen Plasmaproben und acht einzelnen Serumproben, die mit HBV-Plasmid-DNA versetzt waren und auf 9,16  $\log_{10}$  IE/ml abzielten, in 5 Replikaten getestet. Direkt vor dem Test wurde eine Verdünnung im Verhältnis 1:100 mit einem Probenteil und 99 Aptima Probenverdünnerteilen durchgeführt. Die Tests wurden unter Verwendung von einer Charge Assayreagenzien auf zwei Panther Systemen mit zwei Chargen des Aptima Probenverdünners durchgeführt. Die Differenz zwischen der angegebenen Durchschnittskonzentration in nativer Matrix (auf das Ergebnis für die verdünnte Probe angewandter Verdünnungsfaktor) und der Durchschnittskonzentration in

Aptima Probenverdünnung wurde für jede festgelegte Probe berechnet, wie in Tabelle 17 für Plasma und in Tabelle 18 für Serum aufgeführt.

*Tabelle 17: Verdünnung der Plasmaproben im Verhältnis 1:100 – Zusammenfassung des Matrix-Vergleichs*

Plasma-Matrix Mittlere angegebene Konzentration ( $\log_{10}$ IE/ml) n = 5	Verdünnung Mittlere angegebene Konzentration ( $\log_{10}$ IE/ml) n = 10	Differenz Verdünnung aus Plasma-Matrix ( $\log_{10}$ IE/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 <sup>a</sup>	9,05 <sup>a</sup>	-0,19
9,21 <sup>a</sup>	9,05 <sup>a</sup>	-0,16
9,25 <sup>a</sup>	9,03 <sup>a</sup>	-0,22
9,27 <sup>a</sup>	9,04 <sup>a</sup>	-0,23
9,13 <sup>a</sup>	8,82 <sup>a</sup>	-0,31
9,12 <sup>a</sup>	8,81 <sup>a</sup>	-0,31
9,09 <sup>a</sup>	8,84 <sup>a</sup>	-0,25
9,05 <sup>a</sup>	8,84 <sup>a</sup>	-0,21

<sup>a</sup> Mit Plasmid-DNA versetzt.

*Tabelle 18: Verdünnung der Serumproben im Verhältnis 1:100 – Zusammenfassung des Matrix-Vergleichs*

Serum-Matrix Mittlere angegebene Konzentration ( $\log_{10}$ IE/ml) n = 5	Verdünnung Mittlere angegebene Konzentration ( $\log_{10}$ IE/ml) n = 10	Differenz Verdünnung aus Serum-Matrix ( $\log_{10}$ IE/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 <sup>a</sup>	9,08 <sup>a</sup>	-0,19
9,24 <sup>a</sup>	9,06 <sup>a</sup>	-0,18
9,29 <sup>a</sup>	9,08 <sup>a</sup>	-0,21
9,31 <sup>a</sup>	9,11 <sup>a</sup>	-0,20
9,14 <sup>a</sup>	8,91 <sup>a</sup>	-0,23
9,18 <sup>a</sup>	8,92 <sup>a</sup>	-0,26
9,19 <sup>a</sup>	8,90 <sup>a</sup>	-0,29
9,08 <sup>a</sup>	8,84 <sup>a</sup>	-0,24

<sup>a</sup> Mit Plasmid-DNA versetzt.

## Bestätigung der LLoQ in mit Aptima Probenverdünnner verdünnten Proben

Die LLoQ des Aptima HBV Quant Assays wurde anhand klinischer Proben des HBV-Genotyps bestätigt, die mit Aptima Probenverdünnner verdünnt waren. Die Proben wurden in HBV-negativem Humanplasma und Serum bei 21, 30 und 45 IE/ml vorbereitet. Jedes Panel wurde direkt vor dem Test im Verhältnis 1:3 mit Aptima Probenverdünnner verdünnt, um Endkonzentrationen von ungefähr 7, 10 und 15 IE/ml zu erhalten. Insgesamt wurden an drei Tagen 36 Replikate jeder Panelprobe mit einer Reagenziencharge getestet. Es wurde eine LLoQ von  $\leq 10$  IE/ml für mit Aptima Probenverdünnner verdünntem HBV-Plasma und -Serum bestätigt, wie in Tabelle 19 dargestellt.

Tabelle 19: Bestätigung der LLoQ – Proben in Aptima Probenverdünnner

Matrix	% Nachgewiesen	Aptima HBV Quant (IE/ml)	Aptima HBV Quant ( $\log_{10}$ IE/ml)	SAT ( $\log_{10}$ IE/ml)	Abweichung ( $\log_{10}$ IE/ml)	Berechneter TE ( $\log_{10}$ IE/ml)	Berechneter TAE ( $\log_{10}$ IE/ml)
Plasma	100 %	3	0,50	0,19	0,10	0,54	0,48
Serum	100 %	2	0,38	0,12	0,46	0,33	0,70

## Präzision verdünnter Proben

Das Aptima HBV Quant Präzisionspanel wurde erstellt, indem HBV-positives Plasma und HBV-Plasmid-DNA in HBV-negatives klinisches Plasma und Serum verdünnt wurde. Positive Proben wurden mit Aptima Probenverdünnner verdünnt. Diese wurden in fünf Replikaten von einem Anwender an drei Testtagen unter Anwendung von drei Chargen des Aptima Probenverdünners auf einem Panther System mit zwei Läufen pro Tag getestet.

Tabelle 20 zeigt die Präzision der Assay-Ergebnisse (in SD  $\log_{10}$  IE/ml) für drei Chargen des Aptima Probenverdünners. Die Gesamtvariabilität lag bei  $\leq 0,15$  SD bei allen Panelproben und Verdünnungschargen.

Tabelle 20: Präzision der mit Aptima Probenverdünnner verdünnten Panels

Matrix	Target-Konzentration ( $\log_{10}$ IE/ml)	Verdünnung	Charge 1 Probenverdünnner (n=10)		Charge 2 Probenverdünnner (n=10)		Charge 3 Probenverdünnner (n=10)		Kombinierte Chargen (n=30)	
			Durchschnitt $\log_{10}$ IE/ml	SAT	Durchschnitt $\log_{10}$ IE/ml	SAT	Durchschnitt $\log_{10}$ IE/ml	SAT	Durchschnitt $\log_{10}$ IE/ml	SAT
Plasma	3,30	Unverdünnt	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	Unverdünnt	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
Serum	9,18	Unverdünnt	9,13	0,05	9,10	0,03	9,26 <sup>a</sup>	0,15	9,16 <sup>a</sup>	0,11
		1:100	9,18	0,03	9,14	0,04	9,33	0,10	9,21	0,10
	3,30	Unverdünnt	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	Unverdünnt	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	Unverdünnt	9,08	0,03	9,14	0,05	9,31 <sup>b</sup>	0,12	9,17 <sup>b</sup>	0,12
		1:100	9,18	0,02	9,14	0,03	9,33	0,09	9,22	0,10

SAT = Standardabweichung.

<sup>a</sup> 1 Replikat ausgeschlossen (oberhalb des berechenbaren Bereichs).

<sup>b</sup> 2 Replikate ausgeschlossen (oberhalb des berechenbaren Bereichs).

## Verschleppung

Um zu begründen, dass das Panther System das Risiko falsch-positiver Ergebnisse infolge einer verschleppungsbedingten Kontamination minimiert, wurde eine Studie durchgeführt, bei der versetzte Panels auf drei Panther Systemen getestet wurden. Die Beurteilung der Verschleppung erfolgte anhand von hochtitrigen, mit HBV-DNA versetzten Proben ( $8 \log_{10}$  IE/ml), die im Schachbrettmuster zwischen HBV-negativen Proben verteilt waren. Zur Testung wurden fünfzehn Läufe durchgeführt. Die Gesamtverschleppungsrate betrug 0,14 % (1/705).

## Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit wurde an drei externen Standorten in den USA auf dem Panther System beurteilt. Zwei Anwender führten den Test an jedem Standort durch. Jeder Anwender führte drei Tage lang zwei Läufe pro Tag unter Verwendung von drei Reagenzchargen im Testverlauf durch. Für jeden Lauf gab es drei Replikate jeder Panelprobe. Insgesamt wurden 108 Replikate jeder Panelprobe getestet.

Die Reproduzierbarkeit wurde unter Verwendung von Panelproben getestet, die mit HBV-negativem Plasma vorbereitet wurden. Die positiven Panelproben waren positiv für die HBV-Genotypen A oder C. Die HBV-DNA-Konzentrationen erstreckten sich über den linearen Bereich des Assays.

Tabelle 21 zeigt die Reproduzierbarkeit und Präzision der Assay-Ergebnisse für jede positive Panelprobe zwischen Standorten, zwischen Anwendern/Tagen, zwischen Chargen, zwischen Läufen, innerhalb von Läufen und insgesamt.

Der Variationskoeffizient wurde mithilfe der folgenden Gleichung berechnet, bei der  $\sigma^2$  die Probenvarianz der Daten nach der  $\log_{10}$ -Transformation ist.

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

Die Übereinstimmungswerte lagen für alle HBV-positiven Panelproben bei 100 %.

*Tabelle 21: Reproduzierbarkeit der HBV-DNA-Werte des Aptima HBV Quant Assays in positiven Panelproben auf dem Panther System*

GT	N	Beobachteter Mittelwert		Prozentualer Beitrag zur Gesamtabweichung SAT (%VK)					Gesamtab- weichungs-SAT (%VK)
		IE/ml	Log <sub>10</sub> IE/ml	Zwischen Standorten	Zwischen Anwendern/Tagen <sup>a</sup>	Zwischen Chargen	Zwischen Läufen	Innerhalb eines Laufes	
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)

%VK = log-normaler Variationskoeffizient, GT = Genotyp, SAT = Standardabweichung

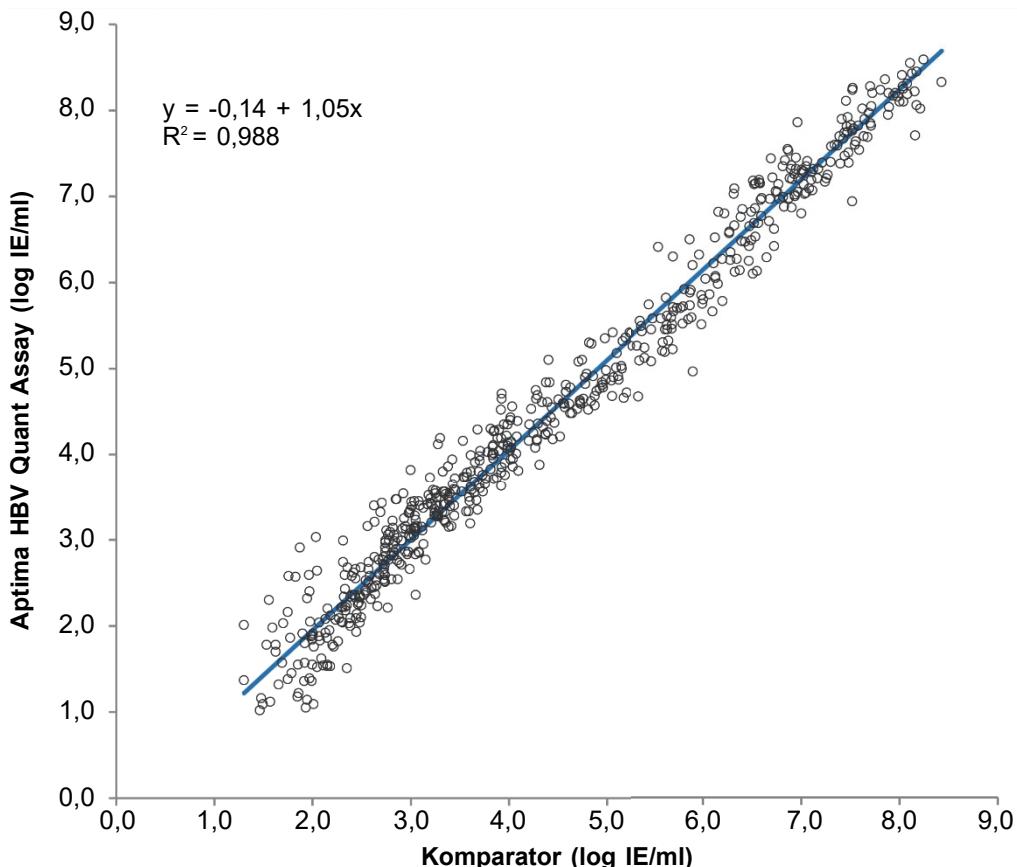
**Hinweis:** Die Variabilität einiger Faktoren kann numerisch negativ sein. Dies kann auftreten, wenn die Variabilität aufgrund solcher Faktoren sehr gering ist. In diesen Fällen gelten SD und VK gleich 0.

<sup>a</sup> „Zwischen Anwendern“ kann mit „Zwischen Tagen“ verwechselt werden; daher sind die Schätzwerte für „Zwischen Anwendern“ und „Zwischen Tagen“ unter „Zwischen Anwendern/Tagen“ kombiniert.

## Klinische Leistungsdaten

### Methodenkorrelation

Die Leistung des Aptima HBV Quant Assays wurde mit dem eines Vergleichsassays mit CE-Kennzeichnung und eines von Health Canada lizenzierten Vergleichsassays verglichen, indem unverdünnte klinische Proben von Patienten mit HBV-Infektion getestet wurden. Für die in Abbildung 9 dargestellte lineare Regression wurden insgesamt 614 klinische Proben innerhalb des Linearbereichs gemessen, der beiden Assays gemeinsam war.



**Abb. 9. Korrelation zwischen dem Aptima HBV Quant Assay und einem Vergleichsassay**

### Klinischer Nutzen

Die Studie wurde entworfen, um die Fähigkeit des Aptima HBV Quant Assays zur Prognose virologischer, biochemischer und serologischer Endpunkte für den klinischen Nutzen 48 Wochen nach Start der Therapie zu beurteilen. Proben wurden prospektiv von Probanden mit chronischer HBV-Infektion entnommen, die mit einer Monotherapie mit Entecavir oder Tenofovir als Teil ihrer Standardbehandlung begannen.

Von den 331 aufgenommenen Probanden waren 86 Probanden aufgrund von Ausscheiden, Abbruch, vorzeitigem Unterbrechen der Behandlung, fehlenden Ergebnissen in Woche 48 oder fehlenden oder niedrigen HBV-DNA-Viruslasten bei Baseline nicht beurteilbar. Die verbleibenden 245 Probanden waren hinsichtlich mindestens einem der Endpunkte für den klinischen Nutzen beurteilbar. Hierzu zählten 126 HBeAg(+) und 119 HBeAG(-) Probanden. In Tabelle 22 sind die demografischen Merkmale und klinischen Merkmale zur Baseline der beurteilbaren Probanden dargestellt. Die demografische Verteilung der Probanden in dieser Studie war konsistent mit der Verteilung der Patienten mit chronischem HBV in den USA.<sup>13</sup> Daten von HBeAg(+) und HBeAg(-)Probanden wurden gesondert analysiert.

*Tabelle 22: Klinische Merkmale der beurteilbaren Probanden hinsichtlich Demografie und bei Baseline*

Merkmale		Gesamt
Gesamt, N	N	245
Entecavir	n (%)	94 (38,4)
Tenofovir	n (%)	151 (61,6)
Geschlecht, n (%)		
	Männlich	154 (62,9)
	Weiblich	91 (37,1)
Alter (Jahre)	Mittelwert ± SD	43,5 ± 13,63
	Median	44,0
	Bereich	18 – 83
Alterskategorie (Jahre), n (%)	18 – 29	40 (16,3)
	30 – 49, n (%)	120 (49,0)
	50 – 70, n (%)	80 (32,7)
	>70, n (%)	5 (2,0)
Ethnie, n (%)	Hispanisch oder lateinamerikanisch	7 (2,9)
	Nicht hispanisch oder lateinamerikanisch	236 (96,3)
	Unbekannt/Verweigert	2 (0,8)
Ethnische Herkunft <sup>a</sup> , n (%)	Weiß	89 (36,3)
	Schwarz oder afroamerikanisch	16 (6,5)
	Asiatisch	132 (53,9)
	Amerikanische Ureinwohner/Indigene Völker Alaskas	0 (0,0)
	Hawaiianische Ureinwohner/ Pazifische Insulaner	6 (2,4)
	Sonstige	1 (0,4)
	Unbekannt/Verweigert	1 (0,4)
Genotyp, n (%)	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)
	Unbekannt	65 (26,5)
Status der HBV-Behandlung, n (%)	Behandelt	27 (11,0)
	Unbehandelt	218 (89,0)
Frühere medikamentöse Behandlung, n (%)	Tenofovir	5 (18,5)
	Entecavir	4 (14,8)
	Adefovir	2 (7,4)
	Lamivudin	1 (3,7)
	Telbivudin	0 (0,0)
	Interferon	10 (37,0)
	Sonstige <sup>b</sup>	5 (18,5)
Ergebnis früherer Behandlungen, n (%)	Fehlschlag	1 (3,7)
	Erfolgreich	0 (0,0)
	Aus anderen Gründen abgesetzt	26 (96,3)

Tabelle 22: Klinische Merkmale der beurteilbaren Probanden hinsichtlich Demografie und bei Baseline (Fortsetzung)

Merkmale		Gesamt
HBsAg-Serostatus, n (%)	Positiv/reakтив	210 (85,7)
	Nicht erfolgt	35 (14,3)
Zirrhotischer Zustand, n (%)	Zirrhotisch	26 (10,6)
	Nicht zirrhotisch	201 (82,0)
HBV-Viruslast ( $\log_{10}$ IE/ml)	Nicht erfolgt	18 (7,3)
	Mittelwert $\pm$ SD	6,3 $\pm$ 1,93
	Median	6,4
ALT (U/L)	Bereich	3 – 9
	Mittelwert $\pm$ SD	102,4 $\pm$ 175,97
	Zahl oberhalb ULN <sup>c</sup>	177 (85,9)

<sup>a</sup> Probanden können mehrere ethnische Herkünfte angeben.

<sup>b</sup> Verschiedene Kombinationen der aufgeführten spezifischen Medikamente.

<sup>c</sup> Die Obergrenze des Normalbereichs (Upper Limit of Normal Range, ULN) für Alaninaminotransferas (ALT) betrug 30 U/l für Männer und 19 U/l für Frauen.

## Prognose für das Ansprechen auf die antivirale Therapie

Der klinische Nutzen des Aptima HBV Quant Assays wurde für mit Tenofovir und Entecavir behandelte Personen beurteilt. Es sind keine Informationen zum klinischen Nutzen des Assays verfügbar, wenn andere antivirale HBV-Therapien angewendet werden.

### Definitionen:

#### Ergebnisse eines frühen virologischen Ansprechens

Virologisches Ansprechen in Woche 12 und Woche 24 = HBV-DNA  $<10$  IE/ml (<LLoQ) wie anhand des Aptima HBV Quant Assays auf dem Panther System beurteilt

Alternatives virologisches Ansprechen in Woche 12 = HBV-DNA  $\geq 2 \log_{10}$  Abnahme seit Baseline

Alternatives virologisches Ansprechen in Woche 24 = HBV-DNA  $<2000$  IE/ml (für HBeAg+) oder  $<50$  IE/ml (für HBeAg-)

#### Endpunkte des klinischen Nutzens

Virologisches Ansprechen in Woche 48 = HBV-DNA  $<10$  IE/ml (LLoQ) wie anhand eines zugelassenen quantitativen HBV-Assays beurteilt

Alternatives virologisches Ansprechen in Woche 48 = HBV-DNA  $<50$  IE/ml wie anhand eines zugelassenen quantitativen HBV-Assays beurteilt

Biochemisches Ansprechen = Normalisierung von ALT-Testergebnissen in Woche 48 (ALT  $<30$  U/l für Männer und  $<19$  U/l für Frauen)

Serologisches Ansprechen = HBeAg-Verlust (HBeAg-negative Ergebnisse) in Woche 48

#### Messungen von Zusammenhang und prädiktivem Wert

Positiv prädiktiver Wert (Positive Predictive Value, PPV) = echt positiv / (echt positiv und falsch positiv) oder die Wahrscheinlichkeit eines Ansprechens in Woche 48 (für den Endpunkt des klinischen Nutzens, der beurteilt wird) bei Probanden mit virologischem Ansprechen zu dem frühen Zeitpunkt

Negativ prädiktiver Wert (Negative Predictive Value, NPV) = echt negativ / (falsch negativ und echt negativ) oder die Wahrscheinlichkeit eines fehlenden Ansprechens in Woche 48 (für den Endpunkt des klinischen Nutzens, der beurteilt wird) bei Probanden mit fehlendem virologischem Ansprechen zu dem frühen Zeitpunkt

Quotenverhältnis (Odds Ratio, OR) = (echt positiv × echt negativ) / (falsch positiv × falsch negativ)

### Prognose des virologischen Ansprechens in Woche 48, definiert als HBV-DNA <10 IE/ml

In dieser Studie war die primäre Definition des virologischen Ansprechens HBV-DNA <10 IE/ml. Diese Definition wurde für das frühe virologische Ansprechen in Woche 12 und 24 sowie für das virologische Ansprechen in Woche 48 verwendet. Es wurde der Zusammenhang zwischen dem frühen virologischen Ansprechen in Woche 12 und 24 und den Endpunkten des klinischen Nutzens des virologischen Ansprechens in Woche 48 (virologisches Ansprechen, biochemisches Ansprechen, serologische Ansprechen) beurteilt.

### Prognose des virologischen Ansprechens in Woche 48

Die Zusammenhänge zwischen dem virologischen Ansprechen in Woche 48 und dem virologischen Ansprechen in Woche 12 und Woche 24 sind in Tabelle 23 zusammengefasst.

Das frühe virologische Ansprechen in Woche 12 und 24, als Vorhersage für das virologische Ansprechen in Woche 48, variierte nach Woche und Behandlung.

*Tabelle 23: PPV, NPV und Quotenverhältnis für das virologische Ansprechen, vorhergesagt durch ein frühes virologisches Ansprechen während der Behandlung: Virologisches Ansprechen in Woche 48, definiert als <10 IE/ml*

HBeAg-Status	Woche des frühen virologischen Ansprechens	Behandlung	PPV (%)		NPV (%)		ODER Voraussichtlich (95 % KI) <sup>a,b</sup>
			Voraussichtlich (95 % KI)	n/N	Voraussichtlich (95 % KI)	n/N	
HBeAg(+)	12	Entecavir	0,0 (0,0, 93,2)	0/1	82,5 (80,0, 88,4)	33/40	1,49 (<0,01, 30,95)
		Tenofovir	100 (27,3, 100)	2/2	74,4 (72,6, 78,7)	61/82	14,30 (1,11, >999,99)
		All (Alle)	66,7 (15,4, 98,2)	2/3	77,0 (75,7, 79,9)	94/122	6,71 (0,62, 147,55)
	24	Entecavir	50 (6,4, 93,2)	2/4	88,2 (83,5, 95,4)	30/34	7,50 (0,74, 79,76)
		Tenofovir	75 (52,7, 92,3)	12/16	84,1 (78,5, 90,0)	58/69	15,81 (4,62, 65,54)
		All (Alle)	70,0 (50,3, 88,1)	14/20	85,4 (81,3, 90,1)	88/103	13,69 (4,74, 44,16)
	12	Entecavir	94,1 (87,1, 99,0)	32/34	22,2 (7,6, 36,0)	4/18	4,57 (0,80, 35,85)
		Tenofovir	83,3 (70,5, 93,2)	25/30	46,9 (35,0, 58,9)	15/32;	4,41 (1,42, 15,71)
		All (Alle)	89,1 (82,1, 94,7)	57/64	38,0 (29,0, 47,1)	19/50	4,99 (1,96, 14,00)
HBeAg(-)	24	Entecavir	93,0 (88,0, 98,1)	40/43	37,5 (6,4, 67,2)	3/8	8,00 (1,21, 55,54)
		Tenofovir	82,6 (74,3, 90,4)	38/46	75 (54,1, 92,0)	12/16	14,25 (3,92, 62,71)
		All (Alle)	87,6 (82,7, 92,6)	78/89	62,5 (44,8, 78,0)	15/24	11,82 (4,30, 34,94)

KI = 95 % Profil-Wahrscheinlichkeit des Konfidenzintervalls.

<sup>a</sup> Die Schattierung gibt die statistische Signifikanz der Quotenverhältnisse an.

<sup>b</sup> Für die Berechnung der Quotenverhältnisse und ihrer Vertrauensintervalle wurde immer dann, wenn mindestens eine Zelle null war, 0,5 zu allen Zellen hinzugefügt.

### Prognose des biochemischen Ansprechens in Woche 48

Die Zusammenhänge zwischen dem biochemischen Ansprechen in Woche 48 und dem virologischen Ansprechen in Woche 12 und Woche 24 sind in Tabelle 24 zusammengefasst.

Der Wert des frühen virologischen Ansprechens in Woche 12 und 24, als Vorhersagewert für das biochemische Ansprechen in Woche 48, variierte nach Woche und Behandlung.

*Tabelle 24: PPV, NPV und Quotenverhältnis für das biochemische Ansprechen, vorhergesagt durch ein frühes virologisches Ansprechen während der Behandlung: Virologisches Ansprechen in Woche 48, definiert als <10 IE/ml*

HBeAg-Status	Woche des frühen virologischen Ansprechens	Behandlung	PPV (%)		NPV (%)		ODER Voraussichtlich (95 % KI) <sup>a</sup>
			Voraussichtlich (95 % KI)	n/N	Voraussichtlich (95 % KI)	n/N	
HBeAg(+)	12	Entecavir	NC (NC)	0/0	67,9 (63,4-76,1)	19/28	2,05 (0,01-393,52)
		Tenofovir	100 (27,6, 100)	2/2	58,5 (55,1, 63,9)	31/53	7,00 (0,54, 983,90)
		All (Alle)	100 (27,3, 100)	2/2	61,7 (59,7, 65,5)	50/81	8,02 (0,63, >999,99)
	24	Entecavir	66,7 (16,4-98,2)	2/3	68,2 (60,1-80,0)	15/22	4,29 (0,35-101,82)
		Tenofovir	58,3 (33,2, 81,0)	7/12	61,4 (54,3, 69,7)	27/44	2,22 (0,61, 8,61)
		All (Alle)	60 (36,6, 80,9)	9/15	63,6 (58,2, 70,0)	42/66	2,62 (0,84, 8,70)
HBeAg(-)	12	Entecavir	43,8 (25,1, 61,2)	7/16	50 (25,1, 74,9)	6/12	0,78 (0,17, 3,53)
		Tenofovir	52,9 (35,1, 72,2)	9/17	76,2 (61,2, 89,8)	16/21	3,60 (0,93, 15,39)
		All (Alle)	48,5 (36,0, 60,9)	16/33	66,7 (54,5, 78,6)	22/33	1,88 (0,70, 5,20)
	24	Entecavir	45,8 (36,0, 56,0)	11/24	75 (25,2, 98,7)	3/4	2,54 (0,28, 55,45)
		Tenofovir	42,9 (32,8, 53,1)	12/28	80,0 (53,0, 97,1)	8/10	3,00 (0,61, 22,34)
		All (Alle)	44,2 (37,8, 50,8)	23/52	78,6 (55,1, 95,0)	11/14	2,91 (0,80, 13,98)

KI = 95 % Profil-Wahrscheinlichkeit des Konfidenzintervalls, NC = nicht berechenbar (not calculable)

<sup>a</sup> Für die Berechnung der Quotenverhältnisse und ihrer Vertrauensintervalle wurde immer dann, wenn mindestens eine Zelle null war, 0,5 zu allen Zellen hinzugefügt.

### Prognose des serologischen Ansprechens in Woche 48

Die Zusammenhänge zwischen dem serologischen Ansprechen in Woche 48 und dem virologischen Ansprechen in Woche 12 und Woche 24 sind in Tabelle 25 zusammengefasst.

Der Wert des frühen virologischen Ansprechens in Woche 12 und 24, als Vorhersagewert für das serologische Ansprechen in Woche 48, variierte nach Woche und Behandlung.

*Tabelle 25: PPV, NPV und Quotenverhältnis für das serologische Ansprechen, vorhergesagt durch ein frühes virologisches Ansprechen während der Behandlung: Virologisches Ansprechen in Woche 48, definiert als <10 IE/ml*

HBeAg-Status	Woche des frühen virologischen Ansprechens	Behandlung	PPV (%)		NPV (%)		ODER Voraussichtlich (95 % KI) <sup>a</sup>
			Voraussichtlich (95 % KI)	n/N	Voraussichtlich (95 % KI)	n/N	
HBeAg(+)	12	Entecavir	100 (6,5, 100)	1/1	86,8 (84,2, 93,9)	33/38	18,27 (0,86, >999,99)
		Tenofovir	0,0 (0,0, 72,0)	0/2	82,9 (81,7, 86,0)	68/82	0,95 (<0,01, 12,45)
		All (Alle)	33,3 (1,8, 84,3)	1/3	84,2 (83,1, 86,8)	101/120	2,66 (0,12, 29,11)
	24	Entecavir	50 (6,4, 93,2)	2/4	88,2 (83,5, 95,4)	30/34	7,50 (0,74, 79,76)
		Tenofovir	18,8 (3,1, 39,1)	3/16	84,1 (80,6, 89,1)	58/69	1,22 (0,25, 4,59)
		All (Alle)	25,0 (8,5, 43,6)	5/20	85,4 (82,5, 89,4)	88/103	1,96 (0,57, 5,94)

KI = 95 % Profil-Wahrscheinlichkeit des Konfidenzintervalls.

<sup>a</sup> Für die Berechnung der Quotenverhältnisse und ihrer Vertrauensintervalle wurde immer dann, wenn mindestens eine Zelle null war, 0,5 zu allen Zellen hinzugefügt.

### Prognose des virologischen Ansprechens in Woche 48, definiert als HBV-DNA <50 IE/ml (alternative Definition)

Alternative Definitionen des frühen virologischen Ansprechens (Woche 12 und 24) und des virologischen Ansprechens in Woche 48 wurden ebenfalls beurteilt (siehe die oben aufgeführten alternativen Definitionen des Ansprechens).

Zusammenhänge zwischen den Endpunkten des klinischen Nutzens und dem virologischen Ansprechen in Woche 12 und Woche 24 unter Verwendung dieser alternativen Definitionen des virologischen Ansprechens sind in Tabelle 26 (virologisches Ansprechen), Tabelle 27 (biochemisches Ansprechen) und Tabelle 28 (serologisches Ansprechen) zusammengefasst.

**Tabelle 26: PPV, NPV und Quotenverhältnis für das virologische Ansprechen, vorhergesagt durch ein frühes virologisches Ansprechen während der Behandlung: Virologisches Ansprechen in Woche 48, definiert als <50 IE/ml**

HBeAg-Status	Woche des frühen virologischen Ansprechens	Behandlung	PPV (%)		NPV (%)		ODER Voraussichtlich (95 % KI) <sup>a,b</sup>
			Voraussichtlich (95 % KI)	n/N	Voraussichtlich (95 % KI)	n/N	
HBeAg(+)	12	Entecavir	34,2 (26,9, 39,2)	13/38	66,7 (16,1, 98,2)	2/3	1,04 (0,09, 23,60)
		Tenofovir	55,1 (51,9, 59,4)	43/78	83,3 (43,5, 99,2)	5/6	6,14 (0,93, 120,54)
		All (Alle)	48,3 (45,6, 51,3)	56/116	77,8 (45,3, 97,1)	7/9	3,27 (0,75, 22,54)
	24	Entecavir	65 (51,3, 81,2)	13/20	100 (86,3, 100)	18/18	66,59 (7,20, >999,99)
		Tenofovir	72,4 (64,7, 80,6)	42/58	88,9 (74,6, 97,2)	24/27	21,00 (6,28, 97,36)
		All (Alle)	70,5 (63,5, 77,9)	55/78	93,3 (84,0, 98,3)	42/45	33,47 (10,81, 148,13)
HBeAg(-)	12	Entecavir	100 (NC)	52/52	NC (NC)	0/0	NC
		Tenofovir	93,0 (89,1, 97,5)	53/57	60 (21,3, 93,3)	3/5	19,87 (2,62, 191,49)
		All (Alle)	96,3 (94,4, 98,7)	105/109	60 (21,1, 93,3)	3/5	39,37 (5,24, 376,77)
	24	Entecavir	100 (NC)	47/47	0,0 (NC)	0/4	NC
		Tenofovir	93,9 (88,6, 98,3)	46/49	30,8 (6,7, 52,4)	4/13	6,81 (1,30, 39,97)
		All (Alle)	96,9 (93,8, 99,2)	93/96	23,5 (7,0, 39,8)	4/17	9,54 (1,91, 53,22)

KI = 95 % Profil-Wahrscheinlichkeit des Konfidenzintervalls, NC = nicht berechenbar (not calculable)

<sup>a</sup> Die Schattierung gibt die statistische Signifikanz der Quotenverhältnisse an.

<sup>b</sup> Für die Berechnung der Quotenverhältnisse und ihrer Vertrauensintervalle wurde immer dann, wenn mindestens eine Zelle null war, 0,5 zu allen Zellen hinzugefügt, es sei denn, es gab ein Ansprechen in Woche 48 oder kein Ansprechen in Woche 48. In diesem Fall wurde das Quotenverhältnis als NC angegeben.

**Tabelle 27: PPV, NPV und Quotenverhältnis für das biochemische Ansprechen, vorhergesagt durch ein frühes virologisches Ansprechen während der Behandlung: Virologisches Ansprechen in Woche 48, definiert als <50 IE/ml**

HBeAg-Status	Woche des frühen virologischen Ansprechens	Behandlung	PPV		NPV		ODER Voraussichtlich (95 % KI) <sup>a,b</sup>
			Voraussichtlich (95 % KI)	n/N	Voraussichtlich (95 % KI)	n/N	
HBeAg(+)	12	Entecavir	33,3 (25,1-39,0)	9/27	100 (6,7-100)	1/1	1,54 (0,07-233,77)
		Tenofovir	44,2 (39,6, 48,6)	23/52	66,7 (15,7, 98,2)	2/3	1,59 (0,14, 35,36)
		All (Alle)	40,5 (37,1, 43,7)	32/79	75 (23,9, 98,7)	3/4	2,04 (0,25, 42,30)
	24	Entecavir	50 (31,2-69,5)	7/14	81,8 (58,9-97,1)	9/11	4,50 (0,79-37,15)
		Tenofovir	52,5 (44,0, 61,8)	21/40	81,3 (60,1-96,7)	13/16	4,79 (1,30, 23,28)
		All (Alle)	51,9 (44,1, 60,2)	28/54	81,5 (66,4, 93,1)	22/27	4,74 (1,66, 15,82)
	12	Entecavir	46,4 (39,5, 52,6)	13/28	NC (NC)	0/0	0,87 (<0,01, 166,17)
		Tenofovir	40 (33,6, 46,3)	14/35	100 (41,4, 100)	3/3	4,72 (0,41, 653,11)
		All (Alle)	42,9 (39,6, 46,7)	27/63	100 (41,2, 100)	3/3	5,27 (0,48, 720,38)
HBeAg(-)	24	Entecavir	44,0 (34,4, 52,7)	11/25	66,7 (16,3-98,2)	2/3	1,57 (0,13, 36,42)
		Tenofovir	41,4 (31,3, 51,1)	12/29	77,8 (48,6, 97,1)	7/9	2,47 (0,49, 18,57)
		All (Alle)	42,6 (36,4, 48,9)	23/54	75 (48,8, 93,7)	9/12	2,23 (0,59, 10,87)

KI = 95 % Profil-Wahrscheinlichkeit des Konfidenzintervalls.

<sup>a</sup> Die Schattierung gib die statistische Signifikanz der Quotenverhältnisse an.

<sup>b</sup> Für die Berechnung der Quotenverhältnisse und ihrer Vertrauensintervalle wurde immer dann, wenn mindestens eine Zelle null war, 0,5 zu allen Zellen hinzugefügt.

**Tabelle 28: PPV, NPV und Quotenverhältnis für das serologische Ansprechen, vorhergesagt durch ein frühes virologisches Ansprechen während der Behandlung: Virologisches Ansprechen in Woche 48, definiert als <50 IE/ml**

HBeAg-Status	Woche des frühen virologischen Ansprechens	Behandlung	PPV		NPV		ODER Voraussichtlich (95 % KI) <sup>a,b</sup>
			Voraussichtlich (95 % KI)	n/N	Voraussichtlich (95 % KI)	n/N	
HBeAg(+)	12	Entecavir	16,7 (10,4, 19,6)	6/36	100 (44,1, 100)	3/3	1,49 (0,12, 209,89)
		Tenofovir	16,7 (12,9, 18,6)	13/78	83,3 (44,2, 99,2)	5/6	1,00 (0,14, 19,98)
		All (Alle)	16,7 (13,9, 18,1)	19/114	88,9 (58,8, 99,5)	8/9	1,60 (0,27, 30,56)
	24	Entecavir	30 (16,5, 41,6)	6/20	100 (86,3, 100)	18/18	16,59 (1,72, >999,99)
		Tenofovir	22,4 (16,9, 26,8)	13/58	96,3 (84,7, 99,9)	26/27	7,51 (1,37, 140,31)
		All (Alle)	24,4 (20,0, 28,4)	19/78	97,8 (90,4, 99,9)	44/45	14,17 (2,77, 259,25)

KI = 95 % Profil-Wahrscheinlichkeit des Konfidenzintervalls.

<sup>a</sup> Die Schattierung gib die statistische Signifikanz der Quotenverhältnisse an.

<sup>b</sup> Für die Berechnung der Quotenverhältnisse und ihrer Vertrauensintervalle wurde immer dann, wenn mindestens eine Zelle null war, 0,5 zu allen Zellen hinzugefügt.

**Fazit**

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass der Aptima HBV Quant Assay HBV-DNA-Werte bei Baseline und während der Behandlung quantifizieren kann, um die Beurteilung des virologischen Ansprechens auf die Behandlung zu unterstützen. Diese Studie hat gezeigt, dass ein frühes virologisches Ansprechen in Woche 12 und 24, als Vorhersagewerte für das virologische Ansprechen in Woche 48, nach Woche und Behandlung variierten.

Der Aptima HBV Quant Assay kann als Hilfe bei der Behandlung von Patienten mit chronischer HBV-Infektion helfen, die einer HBV-Therapie mit antiviralen Medikamenten unterzogen werden.

## Bibliographie

1. **Weltgesundheitsorganisation.** Global progress report on HIV, viral hepatitis and sexually transmitted infections, 2021. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240027077>. Abgerufen im September 2022.
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; aktuell gültige Fassung.
9. **Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health.** Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL); aktuell gültige Fassung.
10. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2002. Clinical Laboratory Waste Management. CLSI Document 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 Document 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>.

## Kontaktinformationen und Änderungsprotokoll



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



CE 2797



**Hologic BV**  
Da Vinci laan 5  
1930 Zaventem  
Belgien

**Australischer Sponsor**  
Hologic (Australien und  
Neuseeland) Pty Ltd.  
Macquarie Park NSW 2113

Die E-Mail-Adresse und Telefonnummer des länderspezifischen technischen Supports und des Kundendienstes finden Sie auf [www.hologic.com/support](http://www.hologic.com/support).

Schwerwiegende Vorkommnisse im Zusammenhang mit dem Produkt in der Europäischen Union sollten dem Hersteller und der zuständigen Behörde des Mitgliedstaats, in dem der Anwender und/oder der Patient niedergelassen ist, gemeldet werden.

Hologic, Aptima, Panther, Panther Fusion und die zugehörigen Logos sind Marken und/oder eingetragene Marken von Hologic, Inc. und/oder seinen Tochterunternehmen in den USA und/oder anderen Ländern. Alle anderen Marken, die möglicherweise in dieser Packungsbeilage erwähnt werden, gehören dem jeweiligen Eigentümer.

Alle anderen Marken, die möglicherweise in dieser Packungsbeilage erwähnt werden, gehören dem jeweiligen Eigentümer.

Dieses Produkt ist ggf. von mindestens einem US-Patent geschützt (siehe [www.hologic.com/patents](http://www.hologic.com/patents)).

© 2017-2025 Hologic, Inc. Alle Rechte vorbehalten.

AW-28215-801 Rev. 003

2025-10

Änderungsprotokoll	Datum	Beschreibung
AW-28215-801 Rev. 001	Juli 2025	<ul style="list-style-type: none"> <li>Erstveröffentlichung der neuen Aptima HBV Assay IFU AW-28215 Rev. 001 zur Einhaltung gesetzlicher Bestimmungen für IVDR erstellt, ersetzt AW-13182.</li> </ul>
AW-28215-801 Rev. 002	August 2025	<ul style="list-style-type: none"> <li>Trademark-Aktualisierungen zur Erfüllung von BSI-Anforderungen.</li> </ul>
AW-28215-801 Rev. 003	Oktober 2025	<ul style="list-style-type: none"> <li>Optionale Verwendung des Wippschüttlers für Reagenzien hinzugefügt</li> <li>SDB aktualisiert</li> </ul>