

Aptima™ HBV Quant Assay

Pour diagnostic *in vitro*.

Réservé à l'exportation américaine.

| | |
|---|-----------|
| Informations générales | 2 |
| Usage prévu | 2 |
| Résumé et explication du test | 2 |
| Principes de la procédure | 3 |
| Mises en garde et précautions : | 4 |
| Stockage des réactifs et exigences de manipulation | 6 |
| Prélèvement et conservation des échantillons | 7 |
| Échantillons à bord du Panther system | 10 |
| Transport des échantillons | 10 |
| Panther system | 11 |
| Réactifs et matériels fournis | 11 |
| Matériels requis mais disponible séparément | 13 |
| Matériel optionnel | 14 |
| Procédure de Test pour le Panther system | 14 |
| Remarques concernant la procédure | 18 |
| Contrôle de la qualité | 20 |
| Calibration du test | 20 |
| Contrôles négatifs et positifs | 20 |
| Calibrateur interne/Contrôle interne | 20 |
| Interprétation des résultats | 21 |
| Limitations | 21 |
| Performances | 22 |
| Limite de détection à l'aide du 3ème étalon de référence international de l'OMS | 22 |
| Limite de détection pour tous les génotypes du VHB | 23 |
| Plage linéaire | 24 |
| Linéarité pour tous les génotypes du VHB | 25 |
| Limite inférieure de quantification utilisant 3ème étalon de référence international de l'OMS | 25 |
| Détermination de la limite inférieure de quantification pour tous les génotypes du VHB | 27 |
| Reproductibilité | 29 |
| Substances potentiellement interférentes | 31 |
| Spécificité | 32 |
| Spécificité analytique | 33 |
| Reproductibilité des échantillons cliniques | 34 |
| Dilution d'échantillons à l'aide du diluant d'échantillon | 35 |
| Corrélation de la méthode | 37 |
| Contamination de transfert | 37 |
| Bibliographie | 38 |

Informations générales

Usage prévu

Le Aptima HBV Quant Assay est un test d'amplification de l'acide nucléique *in vitro* conçu pour la quantification de l'ADN du virus de l'hépatite B (VHB) dans le plasma et le sérum humain sur le Panther™ system entièrement automatisé.

Le plasma peut être préparé dans de l'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA), une solution anticoagulante citrate dextrose (ACD) et des tubes de préparation du plasma (PPT). Le sérum peut être préparé dans des tubes de séparation du sérum (SST). Les échantillons sont testés en utilisant le Panther system entièrement automatisé pour le traitement de l'échantillon, l'amplification et la quantification. Les échantillons contenant le VHB de génotypes A, B, C, D, E, F, G et H sont validés pour la quantification dans le test.

L'utilisation du Aptima HBV Quant Assay est indiquée pour aider à la prise en charge des patients infectés par le VHB sous traitement médicamenteux antiviral contre le VHB. Le test peut être utilisé pour mesurer les niveaux d'ADN de VHB à la ligne de base et pendant le traitement pour aider à évaluer la réponse au traitement viral. Les résultats du Aptima HBV Quant Assay doivent être interprétés en prenant en compte tous les résultats cliniques et ceux obtenus en laboratoire.

Le Aptima HBV Quant Assay est pas destiné à être utilisé comme test de dépistage dans le sang ou les produits sanguins pour le VHB ou comme test de diagnostic pour confirmer la présence d'infection par le VHB.

Résumé et explication du test

Le virus de l'hépatite B (VHB), l'un des nombreux virus connus pour provoquer une hépatite, a été rendu responsable de l'infection permanente par le VHB, la cirrhose du foie, le cancer du foie, une insuffisance hépatique et, potentiellement, la mort. L'Organisation mondiale de la Santé (OMS) répertorie le VHB comme l'une des maladies infectieuses les plus répandues dans le monde. La prévalence de l'infection par le VHB et le mode de transmission varient considérablement à travers le monde. Environ un tiers de la population mondiale a des signes sérologiques d'infection passée ou présente par le VHB et l'infection chronique par le VHB est présente chez plus de 350 millions de personnes dans le monde.^{1,2,3} L'infection par le VHB conduit à une augmentation du risque de décompensation hépatique, cirrhose, carcinome hépatocellulaire (CHC) avec une mortalité de 0,5 à 1,2 millions de décès et 5-10 % des cas de transplantation du foie dans le monde entier chaque année.^{4,5} Sans traitement approprié, intervention et suivi après le diagnostic, l'incidence cumulative à 5 ans de la cirrhose varie de 8 à 20 %. Lorsque la cirrhose s'est développée, le risque annuel de carcinome hépatocellulaire (CHC) est de 2-5 %.⁶

Le VHB contient un génome à ADN partiellement à double brin d'environ 3 200 paires de bases, qui codent pour quatre cadres de lecture ouverts (ORF) se chevauchant partiellement et exprimant les protéines polymérase, de surface, précore/core, et X. La ORF de la polymérase chevauche les 3 autres ORF et code pour une protéine virale clé de réplication, la polymérase. La ORF de surface exprime trois protéines, qui sont essentielles pour la morphogenèse virale, l'entrée du virus dans les hépatocytes, et qui provoquer la réponse immunitaire de l'hôte.⁷ Il y a 8 génotypes de VHB (A-H), et ceux-ci se trouvent généralement dans des endroits géographiques distincts. Actuellement, la quantification de l'ADN du VHB est utilisée pour déterminer quels patients atteints d'une infection chronique doivent être traités, pour surveiller la réponse au traitement, et évaluer les rebonds en charge virale qui peuvent indiquer une résistance aux médicaments.⁵

Le Aptima HBV Quant Assay est un test d'amplification de l'acide nucléique *in vitro* qui utilise l'amplification médiée par la transcription (TMA) en temps réel sur le Panther system pour quantifier l'ADN du VHB, les génotypes A, B, C, D, E, F, G, et H. Le Aptima HBV Quant Assay cible deux régions hautement conservées dans les gènes de la polymérase et de surface (pour une tolérance accrue aux mutations potentielles). Le test est standardisé sur le 3ème étalon de référence international de l'OMS pour le virus de l'hépatite B (code NIBSC : 10/264).

Principes de la procédure

Le Aptima HBV Quant Assay comporte trois étapes principales, qui ont toutes lieu dans un seul tube sur le Panther system : capture de la cible, amplification de la cible par TMA, et de détection des produits d'amplification (amplicon) par sondes marquées par fluorescence (torches).

Lors de la capture de la cible, l'ADN viral est isolé à partir des échantillons. L'échantillon est traité avec un détergent afin de solubiliser l'enveloppe virale, dénaturer les protéines et libérer l'ADN génomique viral. Les oligonucléotides de capture s'hybrident à des régions hautement conservées de l'ADN du VHB, si celui-ci est présent dans l'échantillon testé. La cible ainsi hybridée est ensuite capturée par des microparticules magnétiques et séparée du reste de l'échantillon par application d'un champ magnétique. Plusieurs étapes de lavage permettent d'enlever les composants non désirés du tube réactionnel.


L'amplification de la cible est réalisée par TMA, une méthode d'amplification de l'acide nucléique médiée par la transcription et employant deux enzymes, la transcriptase inverse du virus de la leucémie murine de Moloney (MMLV) et l'ARN polymérase de T7. La transcriptase inverse permet de générer une copie de l'ADN de la séquence cible (contenant une séquence de promoteur pour l'ARN polymérase de T7). L'ARN polymérase de T7 produit plusieurs copies de l'amplicon d'ARN à partir de la matrice d'ADN. Le Aptima HBV Quant Assay utilise la méthode TMA pour amplifier deux régions du génome du VHB (le gène de la polymérase et le gène de surface). L'amplification de ces régions est obtenue à l'aide d'amorces spécifiques conçues pour amplifier le VHB de génotypes A, B, C, D, E, F, G et H. L'approche de la double région cible avec la conception des amorces ciblant les régions hautement conservées assure une quantification précise de l'ADN du VHB.

La détection se déroule en temps réel par hybridation spécifique sur l'amplicon de torches moléculaires simple brin présentes pendant l'amplification de la cible. Chaque torche moléculaire est munie d'un fluorophore et d'un suppresseur (quencher). Lorsque la torche moléculaire n'est pas hybridée à l'amplicon, le suppresseur se trouve à proximité immédiate du fluorophore et empêche l'émission de fluorescence. Lorsque la torche moléculaire s'hybride à l'amplicon, la distance entre le suppresseur et le fluorophore augmente et un signal est émis à une longueur d'onde spécifique après excitation par une source lumineuse. L'intensité du signal fluorescent augmente avec le nombre de torches moléculaires hybridées à l'amplicon. Le temps nécessaire pour que le signal fluorescent atteigne un seuil spécifique est proportionnel à la concentration initiale en VHB. Chaque réaction comprend un calibrateur interne/contrôle interne (IC) qui détecte les différences de traitement des échantillons, d'amplification et de détection. La concentration d'un échantillon est calculée par le logiciel du Panther system à l'aide des signaux obtenus pour le VHB et l'IC pour chaque réaction et en les comparant aux données de calibration.

Mises en garde et précautions :

- A. Pour diagnostic *in vitro* seulement.
- B. Afin de réduire le risque d'obtention de résultats non valides, lisez attentivement l'ensemble de la notice du test et le *Panther system Operator's Manual* (manuel de l'opérateur du Panther system) avant d'effectuer ce test.
- C. qHBV Réactif activateur de cible (TER) est corrosif.
- H302 - Nocif en cas d'ingestion.
 - H314 - Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves.

**Recommandations destinées aux laboratoires**

-  D. **PRÉCAUTION** : les contrôles de ce test contiennent du plasma humain. Ce plasma est négatif pour l'antigène de surface de l'hépatite B (HBsAg), les anticorps contre le VHC, les anticorps contre le VIH-1 et le VIH-2, et l'antigène du VIH lorsque testé selon les méthodes approuvées par la Food and Drug Administration des États-Unis. De plus, ce plasma est non réactif pour l'ADN du VHB, l'ARN du VHC et l'ARN du VIH-1 lorsque analysés sous la forme d'échantillons groupés à l'aide de tests de détection de l'acide nucléique approuvés. Tout produit dérivé du sang humain doit être considéré comme potentiellement infectieux et manipulé en appliquant les précautions universelles.^{8,9,10}
- E. Cette procédure ne doit être réalisée que par des membres du personnel dûment formés à l'utilisation du Aptima HBV Quant Assay et à la manipulation de produits potentiellement infectieux. En cas de déversement, désinfectez immédiatement en suivant les procédures appropriées de l'établissement.
- F. N'utilisez que le matériel de laboratoire jetable fourni ou recommandé.
- G. Prenez les précautions de laboratoire habituelles. Ne pipetez pas avec la bouche. Ne mangez pas, ne buvez pas et ne fumez pas dans les zones de travail signalées. Portez des gants jetables sans poudre, des lunettes de protection et des blouses de laboratoire pour manipuler les échantillons et les réactifs du kit. Lavez-vous bien les mains après avoir manipulé les échantillons et les réactifs du kit.
- H. Les plans de travail, les pipettes et les autres matériels doivent être régulièrement décontaminés avec une solution d'hypochlorite de sodium 2,5 % à 3,5 % (0,35 M à 0,5 M).
- I. Jetez tous les matériels ayant été au contact d'échantillons ou de réactifs conformément à la réglementation en vigueur au niveau local, national et international.^{8,9,10,11} Nettoyez et désinfectez soigneusement tous les plans de travail.
- J. Les contrôles contiennent de l'azoture de sodium comme conservateur. N'utilisez pas de tubes métalliques pour le transfert de réactifs. En cas d'élimination de solutions contenant de l'azoture de sodium par le système d'évacuation des eaux usées, veillez à les diluer et à les rincer abondamment à l'eau courante. Ces précautions sont recommandées pour ces précautions pour éviter toute accumulation de dépôts dans des canalisations en métal, laquelle pourrait favoriser le développement de conditions explosives.
- K. Les bonnes pratiques générales pour les laboratoires de biologie moléculaire incluent la surveillance de l'environnement. La procédure suivante est suggérée pour surveiller l'environnement d'un laboratoire :

1. Munissez-vous d'un écouvillon à embout ouaté et combinez-le au tube d'aliquote d'échantillon (SAT) Aptima.
2. Étiquetez chaque SAT de manière appropriée.
3. Remplissez chaque SAT avec 1 ml de diluant d'échantillon Aptima.
4. Pour recueillir des échantillons de surface, humidifiez légèrement un écouvillon avec de l'eau désionisée exempte de nucléases.
5. Passez l'écouvillon sur la surface qui vous intéresse en effectuant un mouvement vertical de haut en bas. Faites tourner l'écouvillon d'environ un demi-tour tout en le passant sur la surface.
6. Introduisez immédiatement l'échantillon sur écouvillon dans le tube et faites-le tourner en douceur dans le diluant, afin d'en extraire les matériels éventuellement prélevés. Pressez l'écouvillon contre le bord du tube de transport pour en extraire le maximum de liquide. Jetez l'écouvillon et fermez le tube.
7. Répétez les mêmes étapes pour les autres échantillons sur écouvillon.
8. Analysez l'écouvillon à l'aide d'un test moléculaire.

Recommandations concernant les échantillons

- L. Les échantillons peuvent être infectieux. Utilisez les Précautions universelles^{8,9,10} en effectuant ce test. Des méthodes de manipulation et d'élimination des déchets appropriées doivent être établies conformément à la réglementation en vigueur au niveau local, national et international.¹¹ Cette procédure ne doit être réalisée que par des membres du personnel dûment formés à l'utilisation du Aptima HBV Quant Assay et à la manipulation de produits potentiellement infectieux.
- M. Observez des conditions de conservation adéquates pendant le transport des échantillons pour préserver leur intégrité. La stabilité des échantillons dans des conditions de transport autres que celles recommandées n'a pas été évaluée.
- N. Évitez toute contamination croisée lors des étapes de manipulation des échantillons. Veillez tout particulièrement à éviter toute contamination par diffusion d'aérosols lors du dévissage ou de l'ouverture des échantillons. Les échantillons peuvent contenir des taux d'organismes très importants. Veillez à éviter tout contact entre les différents récipients d'échantillons et à ne pas passer au-dessus d'un récipient ouvert en jetant le matériel usagé. Changez de gants en cas de contact avec l'échantillon.

Recommandations concernant les tests

- O. N'utilisez pas le kit de réactifs, le calibrateur ou les contrôles après leur date de péremption.
- P. N'échangez pas, ne mélangez pas et ne combinez pas les réactifs de test de kits portant différents numéros de lot de référence. Les liquides de test peuvent être issus de lots de numéros différents. Les contrôles et le calibrateur peuvent être issus de lots de numéros différents.
- Q. Évitez de contaminer les réactifs par des micro-organismes ou des nucléases.
- R. Fermez et conservez tous les réactifs de test aux températures indiquées. Les performances du test peuvent être affectées par l'utilisation de réactifs de test stockés dans des conditions inappropriées. Voir *Stockage des réactifs et exigences de manipulation* et *Procédure de Test pour le Panther system* pour plus d'informations.

- S. Ne combinez pas de réactifs de test ou de liquides de test sans consignes spécifiques. Ne rajoutez pas de réactif ou de liquide dans les flacons. Le Panther system vérifie le niveau des réactifs.
- T. Évitez le contact du réactif « target enhancer » avec la peau, les yeux et les muqueuses. Lavez avec de l'eau en cas de contact avec ce réactif. Si des déversements de ce réactif se produisent, diluez avec de l'eau et suivez les procédures de site appropriées.

Stockage des réactifs et exigences de manipulation

- A. Les tableaux suivants indiquent les conditions et la stabilité de conservation pour les réactifs, les contrôles et le calibrateur.

| Réactif | Conservation non ouvert | Kit ouvert (reconstitué) | |
|--|-------------------------|--------------------------|---|
| | | Conservation | Stabilité |
| Réactif d'amplification qHBV | 2 °C à 8 °C | | |
| Solution de reconstitution de l'amplification qHBV | 2 °C à 8 °C | 2 °C à 8 °C | 30 jours ^a |
| Réactif enzymatique qHBV | 2 °C à 8 °C | | |
| Solution de reconstitution enzymatique qHBV | 2 °C à 8 °C | 2 °C à 8 °C | 30 jours ^a |
| Réactif promoteur qHBV | 2 °C à 8 °C | | |
| Solution de reconstitution du promoteur qHBV | 2 °C à 8 °C | 2 °C à 8 °C | 30 jours ^a |
| Réactif de capture de cible qHBV | 2 °C à 8 °C | 2 °C à 8 °C | 30 jours ^a |
| qHBV PCAL (calibrateur positif) | -15 °C à -35 °C | 15 °C à 30 °C | Flacon à usage unique À utiliser dans les 24 heures |
| qHBV NC CONTROL – (contrôle négatif) | -15 °C à -35 °C | 15 °C à 30 °C | Flacon à usage unique À utiliser dans les 24 heures |
| qHBV LPC CONTROL + (contrôle positif faible) | -15 °C à -35 °C | 15 °C à 30 °C | Flacon à usage unique À utiliser dans les 24 heures |
| qHBV HPC CONTROL + (contrôle positif fort) | -15 °C à -35 °C | 15 °C à 30 °C | Flacon à usage unique À utiliser dans les 24 heures |
| qHBV Réactif activateur de cible | 15 °C à 30 °C | 15 °C à 30 °C | 30 jours ^a |

^a Lorsque des réactifs sont retirés du Panther system, veillez à les remettre immédiatement à leurs températures de conservation appropriées.

- B. Jetez tous les réactifs reconstitués et le réactif de capture de cible (Target Capture Reagent, TCR) et le Réactif activateur de cible (TER) non utilisés après 30 jours ou après la date de péremption du lot de référence, la première échéance prévalant.
- C. Les réactifs stockés dans le Panther system sont stables pendant 72 heures. Vous pouvez charger les réactifs dans le Panther system jusqu'à 5 fois. Le Panther system enregistre combien de fois les réactifs ont été chargés.

- D. Après décongélation du calibrateur, la solution doit être transparente, c.-à-d. qu'elle ne doit pas être trouble ou contenir des précipités.
- ⚠ E. Le réactif promoteur et le réactif promoteur reconstitué sont photosensibles. Protégez ces réactifs de la lumière lors de leur conservation et pendant la préparation avant de les utiliser.
- F. Le réactif qHBV Target Enhancer doit être porté entre 15 °C et 30 °C avant son utilisation.

Prélèvement et conservation des échantillons

Remarque : Manipulez tout échantillon comme s'il était susceptible de contenir des agents potentiellement infectieux. Appliquez les précautions universelles.

Remarque : Veillez à éviter toute contamination croisée pendant les étapes de manipulation des échantillons. Par exemple, veillez à ne pas passer au-dessus de tubes ouverts lors de l'élimination de matériels usagés.

Des échantillons de sang total collectés dans les tubes en verre ou en plastique suivants peuvent être utilisés :

- Tubes contenant de l'EDTA ou de l'ACD anticoagulants
- Tubes de préparation du plasma (PPT)
- Tubes sérum
- Tubes de séparation du sérum (SST)

En cas d'utilisation du sérum, laissez le caillot se former avant de poursuivre.

A. Collecte des échantillons

Le sang total peut être stocké entre 2 °C et 30 °C et doit être centrifugé dans les 24 heures suivant la collecte de l'échantillon. Séparez le plasma ou le sérum du culot de globules rouges en suivant les instructions du fabricant du tube utilisé. Du plasma ou du sérum peut être testé dans le Panther system dans le tube primaire ou transféré dans le tube d'aliquote d'échantillon (SAT) Aptima secondaire. Le volume minimum de plasma ou de sérum pour des tubes de collecte primaires est de 1 200 µl et de 700 µl pour les tubes SAT, pour obtenir une prise d'essai de 500 µl.

S'ils ne sont pas analysés immédiatement, le plasma et le sérum peuvent être stockés conformément aux spécifications ci-dessous. S'il est transféré dans le tube SAT, le plasma ou le sérum peut être congelé à -20 °C. Ne dépassez pas 3 cycles de congélation/décongélation. Ne congelez pas les échantillons dans des tubes d'EDTA ou d'ACD, ou bien des tubes primaires de collecte du sérum.

B. Conditions de conservation des échantillons

1. Échantillons de plasma sur EDTA ou ACD

Le sang total peut être stocké entre 2 °C et 30 °C et doit être centrifugé dans les 24 heures suivant la collecte de l'échantillon. Le plasma peut ensuite être stocké dans une des conditions de conservation suivantes :

- jusqu'à 24 heures dans le tube de collecte primaire ou SAT entre 2 °C et 30 °C,
- jusqu'à 5 jours dans le tube de collecte primaire ou SAT entre 2 °C et 8 °C, ou
- jusqu'à 60 jours dans le tube SAT à -20 °C.

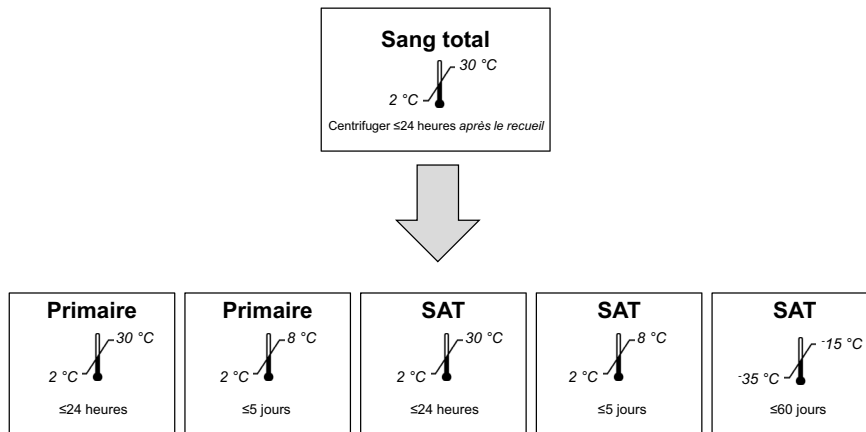


Figure 1. Conditions de conservation pour les tubes EDTA / ACD

2. Échantillons dans des tubes PPT

Le sang total peut être stocké entre 2 °C et 30 °C et doit être centrifugé dans les 24 heures suivant la collecte de l'échantillon. Le plasma peut ensuite être stocké dans une des conditions de conservation suivantes :

- jusqu'à 24 heures dans les tubes PPT ou SAT entre 2 °C et 30 °C,
- jusqu'à 5 jours dans les tubes PPT ou SAT entre 2 °C et 8 °C
- jusqu'à 60 jours dans les tubes PPT ou SAT à -20 °C.

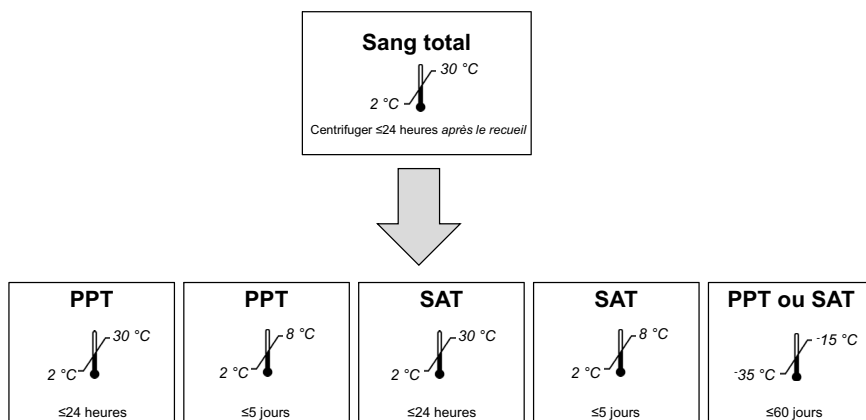


Figure 2. Conditions de stockage pour les tubes PPT

3. Échantillons dans des tubes sérum

Le sang total peut être stocké entre 2 °C et 30 °C et doit être centrifugé dans les 24 heures suivant la collecte de l'échantillon. Le sérum peut ensuite être stocké dans une des conditions de conservation suivantes :

- jusqu'à 24 heures dans les tubes sérum ou SAT entre 2 °C et 30 °C,
- jusqu'à 5 jours dans le tube sérum ou SAT entre 2 °C et 8 °C, ou
- jusqu'à 60 jours dans le tube SAT à -20 °C.

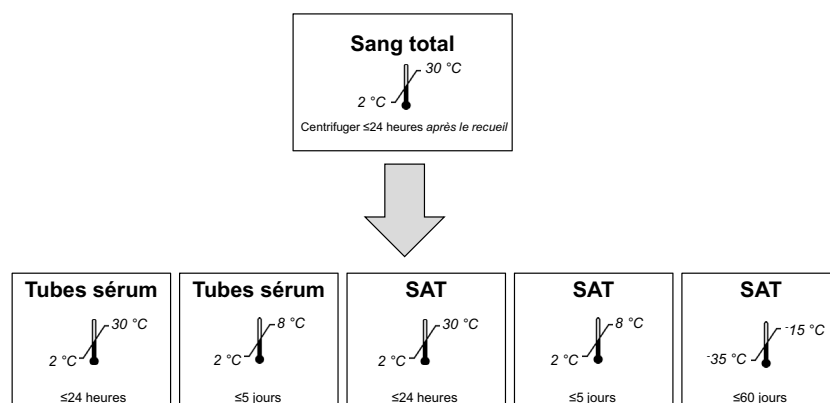


Figure 3. Conditions de stockage pour les tubes sérum

4. Échantillons dans des tubes SST

Le sang total peut être stocké entre 2 °C et 30 °C et doit être centrifugé dans les 24 heures suivant la collecte de l'échantillon. Le sérum peut ensuite être stocké dans une des conditions de conservation suivantes :

- jusqu'à 24 heures dans les tubes SST ou SAT entre 2 °C et 30 °C,
- jusqu'à 5 jours dans les tubes SST ou SAT entre 2 °C et 8 °C
- jusqu'à 60 jours dans les tubes SST ou SAT à -20 °C.

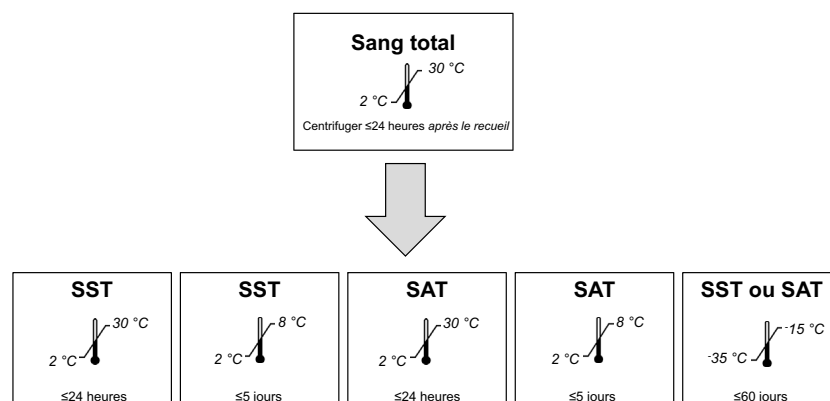


Figure 4. Conditions de stockage pour les tubes SST

C. Conservation à long terme au congélateur

Les échantillons de plasma ou de sérum peuvent être stockés entre -65 °C et -85 °C jusqu'à 60 jours dans des tubes SAT.

D. Dilution d'échantillons de plasma et de sérum

Les échantillons de plasma et de sérum peuvent être dilués dans le tube SAT avant d'être analysés sur le Panther system. Voir *Procédure de Test pour le Panther system*, paragraphe E « Manipulation des échantillons », étape 6, pour plus d'informations.

Remarque : Si un échantillon est dilué, il doit être analysé immédiatement après la dilution. Ne congélez pas un échantillon dilué.

Échantillons à bord du Panther system

Les échantillons peuvent être laissés sans bouchon dans le Panther system pendant un maximum de 8 heures. Les échantillons peuvent être enlevés du Panther system et analysés tant que la durée totale de leur séjour dans le Panther system ne dépasse pas 8 heures avant le pipetage de l'échantillon par le système.

Transport des échantillons

Maintenir les conditions de stockage des échantillons comme décrit dans *Prélèvement et conservation des échantillons*.

Remarque : *L'expédition des échantillons doit s'effectuer conformément aux réglementations locales, nationales et internationales applicables en matière de transport.*

Panther system

Les réactifs du Panther system nécessaires au Aptima HBV Quant Assay sont présentés ci-dessous. Les symboles d'identification des réactifs sont également indiqués à côté du nom du réactif.

Réactifs et matériels fournis

Remarque : Pour obtenir des informations sur les mentions de danger et de mise en garde qui pourraient être associées à ces réactifs, consultez la Safety Data Sheet Library (Bibliothèque des fiches techniques de sécurité) à l'adresse www.hologic.com/sds.

Aptima HBV Quant Assay Kit, 100 tests (N° de référence PRD-03424)
(1 carton du test, 1 kit de calibration, 1 kit de contrôles et 1 carton de Réactif activateur de cible)

Des calibrateurs et des contrôles supplémentaires peuvent être commandés séparément. Consultez les numéros de référence spécifiques ci-dessous.

Boîte de réactifs de Aptima HBV Quant Assay
(conserver entre 2 °C et 8 °C dès réception)

| Symbole | Composant | Quantité |
|-------------|--|-------------|
| A | Réactif d'amplification qHBV <i>Acides nucléiques non infectieux lyophilisés dans une solution tamponnée.</i> | 1 flacon |
| E | Réactif enzymatique qHBV <i>Transcriptase inverse et ARN polymérase lyophilisées dans une solution tamponnée HEPES.</i> | 1 flacon |
| PRO | Réactif promoteur qHBV <i>Acides nucléiques non infectieux lyophilisés dans une solution tamponnée.</i> | 1 flacon |
| AR | Solution de reconstitution de l'amplification qHBV <i>Solution aqueuse contenant du glycérol et des conservateurs.</i> | 1 x 7,2 ml |
| ER | Solution de reconstitution enzymatique qHBV <i>Solution tamponnée HEPES contenant un surfactant et du glycérol.</i> | 1 x 5,8 ml |
| PROR | Solution de reconstitution du promoteur qHBV <i>Solution aqueuse contenant du glycérol et des conservateurs.</i> | 1 x 4,5 ml |
| TCR | Réactif de capture de cible qHBV <i>Acides nucléiques dans une solution saline tamponnée contenant des acides nucléiques non infectieux en phase solide et un calibrateur interne.</i> | 1 x 72,0 ml |
| | Collets de reconstitution | 3 |
| | Fiche des codes à barre du lot de référence | 1 fiche |

Kit de calibration Aptima HBV Quant (N° de réf. PRD-03425)
(conserver entre -15 °C et -35 °C dès réception)

| Symbole | Composant | Quantité |
|---------|---|------------|
| PCAL | Calibrateur positif qHBV <i>ADN du plasmide dans une solution tamponnée</i> | 5 x 2,5 ml |
| | Étiquette à code à barres du calibrateur | — |

Kit de contrôles Aptima HBV Quant (N° de réf. PRD-03426)
(conserver entre -15 °C et -35 °C dès réception)

| Symbole | Composant | Quantité |
|---------|--|------------|
| NC | Contrôle négatif qHBV <i>Plasma humain défibriné négatif pour le VHB contenant de la gentamicine et de l'azoture de sodium à 0,2 % comme conservateurs.</i> | 5 x 0,8 ml |
| LPC | Contrôle positif faible qHBV <i>Plasma inactivé positif pour le VHB dans du plasma humain défibriné contenant de la gentamicine et de l'azoture de sodium à 0,2 % comme agent de conservation.</i> | 5 x 0,8 ml |
| HPC | Contrôle positif fort qHBV <i>Plasma inactivé positif pour le VHB dans du plasma humain défibriné contenant de la gentamicine et de l'azoture de sodium à 0,2 % comme agent de conservation.</i> | 5 x 0,8 ml |
| | Étiquette à code à barres des contrôles | — |

Boîte du Réactif activateur de cible Aptima HBV Quant
(conserver entre 15 °C et 30 °C dès réception)

| Symbole | Composant | Quantité |
|---------|--|-------------|
| TER | qHBV Réactif activateur de cible <i>Une solution concentrée d'hydroxyde de lithium</i> | 1 x 46,0 ml |

Matériels requis mais disponible séparément

Remarque : Les références du matériel disponible chez Hologic sont indiquées, sauf indication contraire.

| Matériel | N° de réf. |
|--|-------------------------|
| Panther system | — |
| Kit d'analyse Panther system pour tests en temps réel (pour tests en temps réel uniquement) | PRD-03455 (5 000 tests) |
| <i>Kit de liquides pour tests Aptima (également appelé Kit de liquides universel)</i> | 303014 (1 000 tests) |
| <i>contient : solution de lavage Aptima, tampon Aptima pour solution de désactivation et réactif huileux Aptima</i> | |
| <i>Unités multi-tube (MTU)</i> | 104772-02 |
| <i>Kit Sacs pour déchets Panther system</i> | 902731 |
| <i>Couvercle pour récipient à déchets Panther system</i> | 504405 |
| Ou kit d'analyse pour Panther system | |
| <i>(lors de la réalisation de tests TMA en temps différés parallèlement à des tests TMA en temps réel)</i> | 303096 (5 000 tests) |
| <i>contient des MTU, des sacs pour déchets, des couvercles pour récipient à déchets, un dispositif de détection automatique et des liquides pour tests</i> | |
| Embouts, 1 000 µL conductifs, à détection de liquide | 10612513 (Tecan) |
| Eau de Javel, solution d'hypochlorite de sodium à 5 % à 7 % (0,7 M à 1,0 M). | — |
| Gants sans poudre jetables | — |
| Bouchons de rechange pour réactifs | |
| <i>Flacons de reconstitution de réactif d'amplification, enzymatique et promoteur CL0041 (100 bouchons)</i> | |
| <i>Flacon de TCR</i> | CL0040 (100 bouchons) |
| <i>Flacon de TER</i> | 501604 (100 bouchons) |
| Protection de pailleuse de laboratoire à envers plastifié | — |
| Papier absorbant non pelucheux | — |
| Pipeteur | — |
| Embouts | — |
| Des tubes de collecte primaires des dimensions suivantes peuvent être utilisés : | — |
| <i>13 mm x 100 mm</i> | |
| <i>13 mm x 75 mm</i> | |
| <i>16 mm x 100 mm</i> | |
| Centrifugeuse | — |
| Vortexeur | — |

Matériel optionnel

| Matériau | N° de réf. |
|---|------------|
| Tubes d'aliquot d'échantillon Aptima (SAT) (100/paquet) | 503762 |
| Bouchon de tube de transport (100/paquet) <i>bouchons pour tubes SAT</i> | 504415 |
| Diluant d'échantillon Aptima | PRD-03003 |
| Kit diluant d'échantillon Aptima <i>contient diluant d'échantillon, 100 SAT et 100 bouchons</i> | PRD-03478 |
| Pipettes de transfert | — |
| Panels disponibles dans le commerce, par exemple : <i>Panel HBV de l'organisation Quality Control for Molecular Diagnostics (QCMD)</i> | — |
| Écouvillons à embout ouaté | — |
| Agitateur de tubes | — |

Procédure de Test pour le Panther system

Remarque : Consultez le *Panther system Operator's Manual* (manuel de l'opérateur du Panther system) pour de plus amples informations sur la procédure.

A. Préparation de la zone de travail

1. Nettoyez les plans de travail sur lesquels les réactifs seront préparés. Essuyez les plans de travail avec une solution d'hypochlorite de sodium de 2,5 % à 3,5 % (0,35 M à 0,5 M). Laissez la solution d'hypochlorite de sodium au contact des surfaces pendant au moins 1 minute, puis rincez avec de l'eau désionisée. Ne laissez pas sécher la solution d'hypochlorite de sodium. Couvrez la surface de travail avec des protections de paille de laboratoire absorbantes à envers plastifié propres.
2. Nettoyez un plan de travail distinct pour la préparation des échantillons. Utilisez la procédure décrite ci-dessus (étape A.1).
3. Nettoyez tous les pipeteurs. Utilisez la procédure de nettoyage décrite ci-dessus (étape A.1).

B. Préparation du calibrateur et des contrôles

Laissez le calibrateur et les contrôles s'équilibrer entre 15 °C et 30 °C avant de poursuivre comme suit :

1. Retirez le calibrateur et les contrôles de leur lieu de conservation (entre -15 °C et -35 °C) et placez-les entre 15 °C et 30 °C. Tout au long de la décongélation, retournez délicatement chaque tube pour le mélanger complètement. Assurez-vous que le contenu des tubes est entièrement décongelé avant de l'utiliser.

Option. Les tubes de calibrateur et des contrôles peuvent être placés dans un agitateur de tubes afin de les mélanger complètement. Assurez-vous que le contenu des tubes est entièrement décongelé avant de l'utiliser.

Remarque : Veillez à éviter toute formation excessive de mousse lors du retournement du calibrateur et des contrôles. La mousse interfère avec le détecteur de niveau du Panther system.

2. Une fois le contenu des tubes décongelé, séchez l'extérieur des tubes avec un papier absorbant jetable propre et sec.

3. Pour éviter toute contamination, n'ouvrez pas les tubes à ce moment.

C. Reconstitution des réactifs/préparation d'un nouveau kit

Remarque : La reconstitution des réactifs doit être effectuée avant d'entreprendre toute tâche sur le Panther system.

1. Pour préparer le réactif de capture de cible (Target Capture Reagent, TCR), procédez comme suit :

- a. Retirez le TCR de son lieu de conservation (2 °C à 8 °C). Vérifiez la correspondance entre le numéro de lot sur le flacon de TCR et le numéro de lot sur la fiche de codes à barres du lot de référence.
- b. Agitez immédiatement le flacon de TCR vigoureusement (10 fois). Laissez le flacon de TCR s'équilibrer entre 15 °C et 30 °C pendant au moins 45 minutes. Pendant cette période, faites tourner et retournez le flacon de TCR au moins toutes les 10 minutes.

Option. La préparation du flacon de TCR peut également s'effectuer à l'aide d'un agitateur de tubes en procédant comme suit : Retirez le TCR de son lieu de conservation (2 °C à 8 °C) et agitez-le immédiatement vigoureusement (10 fois). Placez le flacon de TCR sur un agitateur de tubes et laissez-le s'équilibrer entre 15 °C et 30 °C pendant au moins 45 minutes.

- c. Avant utilisation, vérifiez que tout précipité a été dissous et que les particules magnétiques sont en suspension.
2. Pour reconstituer les réactifs d'amplification, enzymatique et promoteur, procédez comme suit :
 - a. Retirez les réactifs lyophilisés et les solutions de reconstitution correspondantes de leur lieu de conservation (2 °C à 8 °C). Associez chaque solution de reconstitution à son réactif lyophilisé.
 - b. Assurez-vous que les couleurs des étiquettes de la solution de reconstitution et du réactif lyophilisé correspondent. Vérifiez les numéros de lot sur la fiche des codes à barres du lot de référence pour vous assurer que les réactifs appropriés sont appariés.
 - i. Ouvrez le flacon de réactif lyophilisé en enlevant la capsule métallique et le bouchon en caoutchouc.
 - ii. Insérez fermement l'extrémité à encoche du collet de reconstitution (noir) dans le flacon (Figure 5, étape 1).
 - iii. Ouvrez le flacon de solution de reconstitution correspondante et posez le bouchon sur un plan de travail propre et couvert.
 - iv. Placez le flacon de solution de reconstitution sur une surface stable (p. ex. une paille). Retournez ensuite le flacon de réactif lyophilisé au-dessus du flacon de solution de reconstitution et attachez le collet solidement au flacon de la solution de reconstitution (Figure 5, étape 2).
 - v. Retournez lentement les flacons assemblés (flacon attaché au flacon de solution) pour que la solution puisse s'écouler dans le flacon en verre (Figure 5, étape 3).
 - vi. Soulevez les flacons assemblés et faites-les tourner pendant au moins 10 secondes (Figure 5, étape 4).

- vii. Attendez au moins 30 minutes pour que le réactif lyophilisé se dissolve entièrement.
- viii. Une fois le réactif lyophilisé dissous, faites tourner les flacons assemblés pendant au moins 10 secondes, puis agitez délicatement d'avant en arrière la solution dans le flacon en verre pour le mélanger complètement.
- c. Inclinez lentement les flacons assemblés pour permettre à la totalité de la solution de s'écouler de nouveau dans le flacon de solution de reconstitution (Figure 5, étape 5).
- d. Retirez délicatement le flacon en verre et collier de reconstitution (Figure 5, étape 6).
- e. Rebouchez la bouteille. Inscrivez les initiales de l'opérateur ainsi que la date de reconstitution sur l'étiquette (Figure 5, étape 7).
- f. Retirez délicatement le flacon en verre et collier de reconstitution (Figure 5, étape 8).

Avertissement : Évitez la formation excessive de mousse lors de la reconstitution des réactifs. La mousse interfère avec le détecteur de niveau du Panther system.

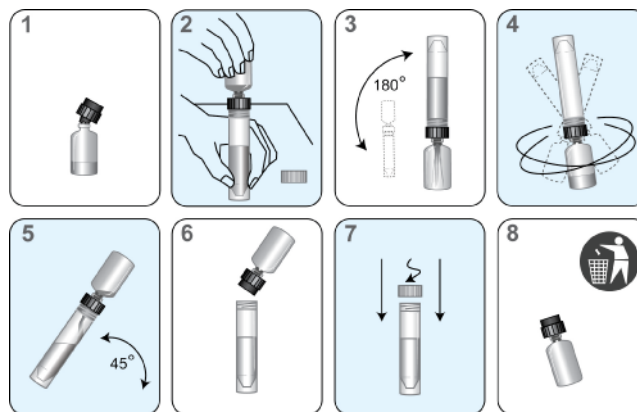


Figure 5. Procédure de reconstitution des réactifs

- 3. Retirez le Réactif activateur de cible qHBV de son lieu de conservation (15 °C à 30 °C). Inscrivez les initiales de l'opérateur ainsi que la date de reconstitution sur l'étiquette. Vérifiez la correspondance entre le numéro de lot sur le flacon de TER et le numéro de lot sur la fiche de codes à barres du lot de référence.
- D. Préparation de réactifs précédemment reconstitués
- 1. Retirez les réactifs précédemment reconstitués de leur lieu de conservation (2 °C à 8 °C). Il faut laisser les réactifs d'amplification, enzymatique et promoteur et le TCR précédemment reconstitués s'équilibrer entre 15 °C et 30 °C avant de commencer le test.
 - 2. Retirez le TER de son lieu de conservation (15 °C à 30 °C).
 - 3. Pour le TCR précédemment préparé, effectuez l'étape C.1 ci-dessus avant de le charger sur le système.
 - 4. Faites tourner et retournez les réactifs d'amplification, enzymatique et promoteur afin de les mélanger complètement avant de les charger sur le système. Évitez la formation excessive de mousse lors du retournement des réactifs.
 - 5. Ne rajoutez pas de réactif dans les flacons. Le Panther system reconnaît et rejette les flacons remplis à ras bord.

E. Manipulation des échantillons

1. Assurez-vous que les échantillons congelés sont entièrement décongelés. Mélangez les échantillons décongelés à l'aide d'un agitateur vortex pendant 3 à 5 secondes, afin de les mélanger complètement.
2. Laissez tous les échantillons s'équilibrer entre 15 °C et 30 °C avant de les traiter. Pour de plus amples informations, consultez la section *Échantillons à bord du Panther system*.
3. Vérifiez que chaque tube de collecte primaire contient au moins 1 200 µl d'échantillon. Vérifiez que chaque tube d'aliquote d'échantillon (SAT) Aptima contient au moins 700 µl d'échantillon. Si la dilution de l'échantillon est nécessaire, reportez-vous à l'étape E.6 ci-dessous pour plus d'informations.
4. Mélangez les échantillons dans des tubes SAT à l'aide d'un agitateur vortex pendant 3 à 5 secondes, afin de les mélanger complètement.
5. Juste avant de charger les échantillons dans un portoir d'échantillons, centrifugez chaque échantillon entre 1 000 et 3 000 g pendant 10 minutes. N'enlevez pas les bouchons. La présence de bulles dans le tube empêche la détection du niveau par le Panther system.

Consultez la section *Préparation du système*, étape F.2 ci-dessous pour des informations concernant le chargement du portoir et le retrait des bouchons.

6. Diluer un échantillon de plasma dans le tube SAT

Un échantillon peut être dilué dans le tube SAT avant d'être analysé sur le Panther system.

Remarque : Si un échantillon est dilué, il doit être analysé immédiatement après la dilution.

- a. Dilution d'échantillons de faible volume

Le volume des échantillons peut être augmenté afin d'atteindre le volume minimum requis (700 µl) à l'aide du diluant d'échantillon Aptima. Les échantillons comprenant au moins 240 µl peuvent être dilués en ajoutant deux volumes de diluant d'échantillon (1/3) comme suit :

- i. Déposez 240 µl d'échantillon dans un tube SAT.
- ii. Ajoutez 480 µl de diluant d'échantillon.
- iii. Fermez le tube.
- iv. Retournez délicatement 5 fois pour mélanger.

Les échantillons dilués 1:3 peuvent être analysés à l'aide de l'option 1:3 du Panther system (pour de plus amples informations, consultez le *Panther system Operator's Manual* (manuel de l'opérateur du Panther system)). Le logiciel prend automatiquement en compte le facteur de dilution et produit le résultat correspondant à l'échantillon non dilué. Ces échantillons sont signalés comme des échantillons dilués.

- b. Dilution d'échantillons à titre élevé

Si le résultat d'un échantillon excède la limite supérieure de quantification (ULoQ), il peut être dilué dans 99 volumes de diluant d'échantillon Aptima (1/100) comme suit :

- i. Déposez 30 µl d'échantillon dans un tube SAT.
- ii. Ajoutez 2 970 µl de diluant d'échantillon.

- iii. Fermez le tube.
- iv. Retournez délicatement 5 fois pour mélanger.

Les échantillons dilués 1:100 peuvent être testés en utilisant l'option 1:100 sur le Panther system (pour de plus amples informations, consultez le *Panther system Operator's Manual* (manuel de l'opérateur du Panther system)). Le logiciel prend automatiquement en compte le facteur de dilution et produit le résultat correspondant à l'échantillon non dilué. Ces échantillons sont signalés comme des échantillons dilués.

Remarque : Pour les échantillons dilués dont la concentration non diluée est supérieure à la ULoQ, les résultats seront présentés en notation scientifique.

F. Préparation du système

1. Configurez le système selon les instructions du *Panther system Operator's Manual* (manuel de l'opérateur du Panther system) et de la section *Remarques concernant la procédure*. Vérifiez que les portoirs de réactifs et les adaptateurs TCR utilisés sont de taille appropriée.
2. Chargez les échantillons dans un portoir d'échantillons. Effectuez les étapes suivantes pour chaque tube d'échantillon (échantillon et s'il y a lieu, calibrateur et contrôles) :
 - a. Desserrez le bouchon d'un des tubes sans le retirer.

Remarque : Veillez tout particulièrement à éviter les contaminations par diffusion d'aérosols. Desserrez délicatement les bouchons des échantillons.

- b. Chargez le tube d'échantillon dans le portoir d'échantillons.
- c. Répétez les étapes 2.a et 2.b pour chaque échantillon restant.
- d. Une fois les échantillons chargés dans le portoir d'échantillons, enlevez et jetez le bouchon de chaque tube d'échantillon du même portoir d'échantillons. Pour éviter toute contamination, ne passez pas les bouchons au-dessus d'autres portoirs d'échantillons ou tubes d'échantillons.
- e. S'il y a lieu, utilisez une pipette de transfert jetable neuve pour éliminer les bulles et la mousse.
- f. Une fois le dernier bouchon retiré, chargez le portoir d'échantillons dans un portoir d'échantillons.

Remarque : Si d'autres tests et types d'échantillons sont analysés en même temps, fixez le dispositif de rétention des échantillons avant de charger le portoir d'échantillons dans le compartiment des échantillons.

- g. Répétez les étapes 2.a à 2.f pour le portoir d'échantillons suivant.

Remarques concernant la procédure

A. Calibrateur et contrôles

1. Le calibrateur positif qHBV, le contrôle qHBV positif faible, le contrôle qHBV positif fort et le contrôle qHBV négatif peuvent être chargés à n'importe quelle position du portoir d'échantillons et dans n'importe quelle rangée du compartiment des échantillons du Panther system. Le pipetage des échantillons commence quand l'une des deux conditions suivantes est satisfaite :

- a. Le calibrateur et les contrôles sont en cours de traitement par le système.
 - b. Les résultats valides du calibrateur et des contrôles sont enregistrés sur le système.
2. Une fois que les tubes de calibrateur et de contrôles ont été pipetés et sont traités avec le kit de réactifs du Aptima HBV Quant Assay, alors des échantillons peuvent être testés pendant 24 heures maximum avec le kit reconstitué associé **à moins que** :
- a. Les résultats du calibrateur ou des contrôles soient non valides.
 - b. Le kit de réactifs de test associé soit retiré du système.
 - c. Le kit de réactifs de test associé ait dépassé les limites de stabilité.
3. Le calibrateur et chaque tube de contrôle ne peuvent être utilisés qu'une seule fois. Les tentatives d'utiliser le tube plus d'une fois peuvent entraîner des erreurs de traitement.

B. Poudre des gants

Comme avec tout système de réactifs, l'excès de poudre sur certains gants peut entraîner la contamination des tubes ouverts. Il est recommandé d'utiliser des gants sans poudre.

Contrôle de la qualité

Le résultat d'une analyse ou d'un échantillon peut être invalidé par un opérateur si des problèmes techniques, de l'appareil ou liés à l'opérateur sont observés et documentés lors de la réalisation du test. Dans ce cas, les échantillons doivent à nouveau être testés.

Calibration du test

Afin de produire des résultats valides, il faut procéder à la calibration du test. Un seul calibrateur positif est analysé en triplicat chaque fois qu'un kit de réactifs est chargé sur le Panther system. Une fois établie, la calibration est valide pendant 24 heures maximum. Le logiciel du Panther system avertit l'opérateur lorsqu'une calibration est nécessaire. L'opérateur scanne un coefficient de calibration qui se trouve sur la fiche des codes à barres du lot de référence fournie avec chaque kit de réactifs.

Le logiciel du Panther system vérifie automatiquement les critères d'acceptation pour le calibrateur lors de son traitement. Si moins de deux des réplicats du calibrateur sont valides, alors la série est invalidée automatiquement par le logiciel. Les échantillons d'une série invalidée doivent être analysés à nouveau avec un calibrateur et des contrôles fraîchement préparés.

Contrôles négatifs et positifs

Afin d'obtenir des résultats valides, un jeu de contrôles du test doit être analysé. Un réplicat du contrôle négatif, du contrôle positif faible et du contrôle positif fort doivent être analysés chaque fois qu'un kit de réactifs est chargé sur le Panther system. Une fois établis, les contrôles sont valides pendant 24 heures maximum. Le logiciel du Panther system avertit l'opérateur lorsque des contrôles sont nécessaires.

Le logiciel du Panther system vérifie automatiquement les critères d'acceptation pour les contrôles lors de leur traitement. Afin d'obtenir des résultats valides, le résultat du contrôle négatif doit être « Non détecté » et les résultats des contrôles positifs doivent correspondre aux paramètres prédéfinis (cible LPC nominale : $2,7 \text{ Log}_{10} \text{ UI/mL}$, cible HPC nominale : $4,6 \text{ Log}_{10} \text{ UI/mL}$). Si un résultat non valide est généré pour l'un des contrôles, alors le logiciel invalide automatiquement la série. Les échantillons d'une série invalidée doivent être analysés à nouveau avec un calibrateur et des contrôles fraîchement préparés.

Calibrateur interne/Contrôle interne

Chaque échantillon contient un calibrateur interne/contrôle interne (IC). Le logiciel du Panther system vérifie automatiquement les critères d'acceptation pour l'IC lors du traitement. Si un résultat de l'IC est non valide, alors le résultat de l'échantillon est invalidé. Chaque échantillon dont le résultat de l'IC est non valide doit être analysé à nouveau afin d'obtenir un résultat valide.

Le logiciel du Panther system est conçu pour vérifier avec précision les processus lorsque les procédures sont effectuées suivant les instructions fournies dans cette notice et le *Panther system Operator's Manual* (manuel de l'opérateur du Panther system).

Interprétation des résultats

Le Panther system détermine automatiquement la concentration en ADN du VHB dans les échantillons et les contrôles en comparant les résultats à une courbe de calibration. Les concentrations en ADN du VHB sont présentées en UI/ml et en \log_{10} UI/ml. L'interprétation des résultats est présentée en Tableau 1. Si l'option dilution est utilisée pour des échantillons dilués, le Panther system calcule automatiquement la concentration en VHB pour l'échantillon non dilué en multipliant la concentration diluée par le facteur de dilution et les échantillons sont signalés comme des échantillons dilués.

Remarque : Pour les échantillons dilués, les résultats signalés comme « Non détecté » ou « <10 détecté » peuvent être générés en diluant un échantillon avec une concentration proche, mais supérieure à la limite de détection (LoD) ou à la limite inférieure de quantification (LLoQ). Si un résultat quantitatif n'est pas obtenu, il est recommandé de collecter un nouvel échantillon et de l'analyser sans le diluer.

Tableau 1 : Interprétation du résultat

| Résultat signalés du Aptima HBV Quant Assay | | Interprétation |
|---|----------------------------------|---|
| UI/ml | Valeurs ^a \log_{10} | |
| Non détecté | Non détecté | ADN du VHB non détecté. |
| <10 détecté | <1,0 | L'ADN du VHB est détecté mais à un niveau inférieur à la LLoQ. |
| 10 à 1 000 000 000 | 1.0 à 9,0 | La concentration en ADN du VHB est dans la plage linéaire comprise entre 10 à 1 000 000 000 UI/ml. |
| >1 000 000 000 | >9,0 | La concentration de l'ADN du VHB est supérieure à la ULoQ. |
| Non valide ^b | Non valide ^b | Une erreur est survenue lors de la génération du résultat. L'échantillon doit être analysé à nouveau. |

^a Valeur arrondie à deux décimales.

^b Les résultats non valides sont affichés dans une police de couleur bleue.

Remarque : Pour les échantillons dilués dont la concentration non diluée est supérieure à la ULoQ, les résultats seront présentés en notation scientifique.

Limitations

- L'utilisation de ce test est limitée au personnel ayant été formé à la procédure. Le non-respect des instructions figurant dans cette notice de test peut donner lieu à des résultats erronés.
- L'obtention de résultats fiables repose sur la collecte, le transport, la conservation et le traitement appropriés des échantillons.
- Bien que rares, des mutations au sein des régions hautement conservées du génome viral couvertes par les amorces et/ou les sondes du Aptima HBV Quant Assay peuvent aboutir à une sous-quantification ou à une absence de détection du virus.

Performances

Limite de détection à l'aide du 3ème étalon de référence international de l'OMS

D'après le protocole EP17-A2 du CLSI, la limite de détection (LoD) du test est définie comme la concentration en ADN du VHB dont la probabilité de détection est égale ou supérieure à 95 %.¹²

La LoD a été déterminée par le test de panels du 3ème étalon de référence internationale de l'OMS pour l'ADN du virus de l'hépatite B (NIBSC 10/264) dilués dans du plasma et du sérum humain négatifs pour le VHB. Au moins 36 réplicats de chaque dilution ont été analysés avec chacun des trois lots de réactifs pour au moins 108 réplicats par dilution. Une analyse Probit a été réalisée afin d'estimer les limites de détection. Les valeurs de LoD indiquées dans le Tableau 2 sont les résultats obtenus avec le lot de réactifs doté de la limite de détection estimée la plus élevée. La LoD pour le Aptima HBV Quant Assay avec le 3ème étalon de référence internationale de l'OMS est de 5,58 UI/ml pour le plasma et 4,29 UI/ml pour le sérum.

Tableau 2 : Limite de détection à l'aide du 3ème étalon de référence internationale de l'OMS pour le VHB

| Limite de détection | Concentration (UI/ml) | |
|---------------------|-----------------------|-------|
| | Plasma | Sérum |
| 10 % | 0,16 | 0,19 |
| 20 % | 0,27 | 0,30 |
| 30 % | 0,39 | 0,42 |
| 40 % | 0,55 | 0,56 |
| 50 % | 0,75 | 0,73 |
| 60 % | 1,02 | 0,96 |
| 70 % | 1,42 | 1,29 |
| 80 % | 2,09 | 1,81 |
| 90 % | 3,58 | 2,91 |
| 95 % | 5,58 | 4,29 |

Limite de détection pour tous les génotypes du VHB

La limite de détection a été déterminée en analysant des dilutions d'échantillons cliniques positifs au VHB pour les génotypes A, B, C, D, E, F, G et H dans le sérum et le plasma humain négatif au VHB. Les concentrations ont été déterminées à l'aide d'un test d'un autre fabricant homologué CE et d'un test autorisé par Santé Canada. Au moins 24 réplicats de chaque échantillon du panel ont été analysés avec chacun des deux lots de réactifs pour au moins 48 réplicats par échantillon du panel. Une analyse Probit a été réalisée afin d'estimer les limites de détection à 50 % et 95 %. Les valeurs de LoD indiquées dans le Tableau 3 sont les résultats obtenus avec le lot de réactifs doté de la limite de détection estimée la plus élevée.

Tableau 3 : Limite de détection pour tous les génotypes du VHB dans des échantillons cliniques

| Génotype | Limite de détection prédite | Concentration (UI/ml) | |
|----------|-----------------------------|-----------------------|-------|
| | | Plasma | Sérum |
| A | 50 % | 0,48 | 0,88 |
| | 95 % | 3,05 | 3,95 |
| B | 50 % | 0,59 | 0,69 |
| | 95 % | 3,00 | 4,97 |
| C | 50 % | 0,79 | 0,93 |
| | 95 % | 5,32 | 4,78 |
| D | 50 % | 0,82 | 1,37 |
| | 95 % | 4,61 | 7,29 |
| E | 50 % | 0,93 | 1,01 |
| | 95 % | 4,80 | 4,90 |
| F | 50 % | 0,75 | 0,69 |
| | 95 % | 3,13 | 3,30 |
| G | 50 % | 0,52 | 0,62 |
| | 95 % | 2,86 | 3,05 |
| H | 50 % | 1,05 | 1,36 |
| | 95 % | 6,44 | 6,31 |

Plage linéaire

La plage linéaire a été établie en analysant des panels d'ADN du VHB dilué dans du plasma et du sérum humain négatifs pour le VHB conformément au protocole EP06-A du CLSI.¹³ La concentration des panels allait de 0,86 log UI/ml à 9,26 log UI/ml. La linéarité du Aptima HBV Quant Assay a été démontrée sur l'ensemble de la plage testée, avec une limite supérieure de quantification (ULoQ) de 9 log UI/ml, comme illustré en Figure 6.

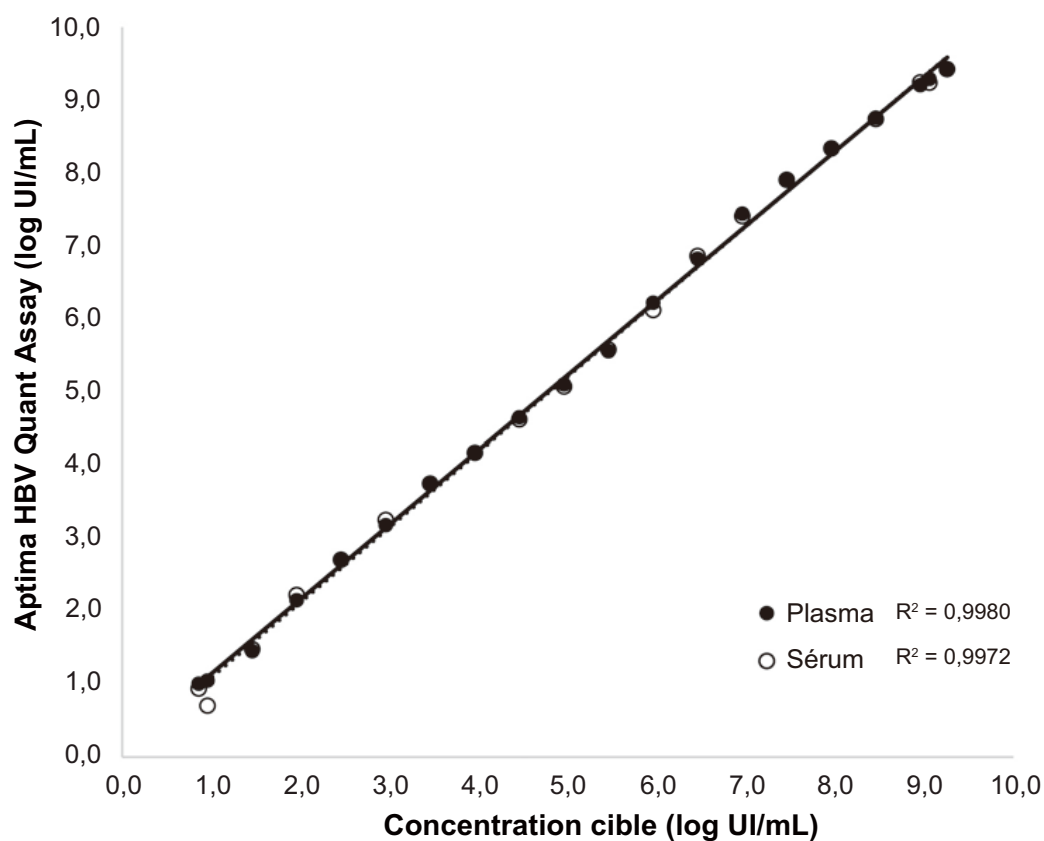


Figure 6. Linéarité dans le plasma et le sérum

Linéarité pour tous les génotypes du VHB

La linéarité de la réponse pour les génotypes A, B, C, D, E, F, G, et H a été confirmée par l'analyse de panels d'ADN du VHB dilué dans un tampon à des concentrations allant de 1,44 log UI/ml à 8,44 log UI/ml. La linéarité a été démontrée sur toute la gamme testée pour tous les génotypes testés comme présenté en Figure 7.

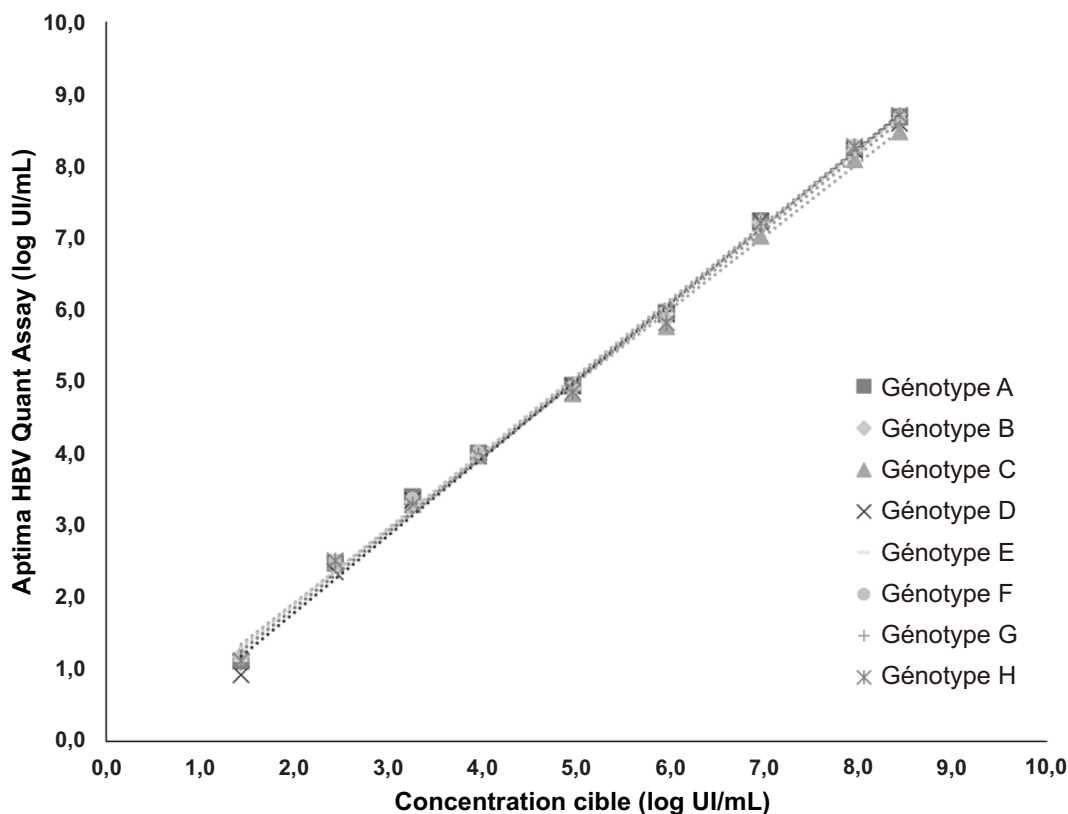


Figure 7. Linéarité pour les génotypes du VHB A à H

Limite inférieure de quantification utilisant 3ème étalon de référence international de l'OMS

D'après le protocole EP17-A2 du CLSI¹², la limite inférieure de quantification (LLoQ) est définie comme la concentration la plus faible à laquelle la quantification de l'ADN du VHB est fiable dans les limites d'une erreur totale. L'erreur totale a été estimée à l'aide de deux méthodes : Erreur analytique totale (EAT) = |biais| + 2 écarts-types, et Erreur totale (ET) = $\sqrt{2} \times 2$ écarts-types. Afin de s'assurer de l'exactitude et de la précision des mesures, l'erreur totale du Aptima HBV Quant Assay était définie à 1 log UI/ml (c.-à-d. qu'à la LLoQ, la différence entre 2 mesures de plus de 1 log UI/ml est statistiquement significative).

La LLoD a été déterminée par le test de panels du 3ème étalon de référence international de l'OMS pour l'ARN du virus de l'hépatite B (NIBSC 10/264) dilués dans du plasma et du sérum humain négatifs pour le VHB. Au moins 45 réplicats de chaque dilution ont été analysés avec chacun des trois lots de réactifs pour au moins 135 réplicats par dilution. Les résultats pour les trois lots de réactifs sont présentés dans le Tableau 4 pour le plasma et dans le Tableau 5 pour le sérum. Les résultats de la plus faible concentration observée qui atteint l'objectif de précision (TE \leq 1 log UI/ml et TAE \leq 1 log UI/ml) avec 100 % de détection sont grisés dans les deux tableaux et résumés dans le Tableau 6.

La LLoQ calculée selon le 3ème étalon de référence internationale de l'OMS pour le Virus de l'hépatite B est 4,80 UI/ml pour le plasma et 6,34 UI/ml pour le sérum, qui reposent sur la plus haute concentration calculée parmi les trois lots de réactifs. Pour le plasma, comme la LLoQ calculée est inférieure à la LoD calculée de 5,58 UI/ml, la LLoQ pour le plasma est 5,58 UI/ml pour le 3ème étalon de référence internationale de l'OMS conformément à l'EP 17-A2.

Tableau 4 : La détermination de la LLoQ utilisant le 3ème étalon de référence international de l'OMS pour le virus de l'hépatite B dilué dans du Plasma

| Lot de réactifs | Concentration cible | | Aptima HBV Quant | ET | Bias | ET calculée | EAT calculée |
|-----------------|---------------------|-------------|------------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| | (UI/ml) | (log UI/ml) | (log UI/ml) | (log UI/ml) | (log UI/ml) | (log UI/ml) | (log UI/ml) |
| 1 | 7 | 0,85 | 0,63 | 0,27 | 0,22 | 0,75 | 0,75 |
| | 8 | 0,90 | 0,68 | 0,28 | 0,22 | 0,78 | 0,77 |
| | 9 | 0,95 | 0,79 | 0,25 | 0,17 | 0,70 | 0,66 |
| 2 | 7 | 0,85 | 0,48 | 0,20 | 0,37 | 0,57 | 0,77 |
| | 8 | 0,90 | 0,47 | 0,18 | 0,44 | 0,51 | 0,79 |
| | 9 | 0,95 | 0,61 | 0,19 | 0,34 | 0,54 | 0,73 |
| 3 | 7 | 0,85 | 0,53 | 0,21 | 0,32 | 0,59 | 0,74 |
| | 8 | 0,90 | 0,52 | 0,21 | 0,38 | 0,61 | 0,81 |
| | 9 | 0,95 | 0,70 | 0,23 | 0,25 | 0,65 | 0,71 |

ET = écart-type

Tableau 5 : La détermination de la LLoQ utilisant le 3ème étalon de référence international de l'OMS pour le virus de l'hépatite B dilué dans du Sérum

| Lot de réactifs | Concentration cible | | Aptima HBV Quant | ET | Bias | ET calculée | EAT calculée |
|-----------------|---------------------|-------------|------------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| | (UI/ml) | (log UI/ml) | (log UI/ml) | (log UI/ml) | (log UI/ml) | (log UI/ml) | (log UI/ml) |
| 1 | 7 | 0,85 | 0,77 | 0,38 | 0,08 | 1,06 | 0,83 |
| | 8 | 0,90 | 0,80 | 0,31 | 0,10 | 0,88 | 0,72 |
| | 9 | 0,95 | 0,91 | 0,27 | 0,05 | 0,77 | 0,59 |
| 2 | 7 | 0,85 | 0,57 | 0,20 | 0,28 | 0,57 | 0,68 |
| | 8 | 0,90 | 0,70 | 0,22 | 0,20 | 0,63 | 0,64 |
| | 9 | 0,95 | 0,69 | 0,23 | 0,27 | 0,66 | 0,73 |
| 3 | 7 | 0,85 | 0,65 | 0,24 | 0,20 | 0,67 | 0,67 |
| | 8 | 0,90 | 0,65 | 0,24 | 0,25 | 0,68 | 0,73 |
| | 9 | 0,95 | 0,67 | 0,22 | 0,28 | 0,63 | 0,73 |

ET = écart-type

Tableau 6 : Résumé des LLoQ calculée en utilisant le 3ème étalon de référence international de l'OMS pour le VHB

| Lot de réactifs | LLoQ plasma | | LLoQ sérum | |
|-----------------|-------------|---------|-------------|---------|
| | (log UI/ml) | (UI/ml) | (log UI/ml) | (UI/ml) |
| 1 | 0,68 | 4,80 | 0,80 | 6,34 |
| 2 | 0,61 | 4,09 | 0,57 | 3,72 |
| 3 | 0,52 | 3,34 | 0,65 | 4,51 |

ET = écart-type

Détermination de la limite inférieure de quantification pour tous les génotypes du VHB

La LLoQ a été déterminée en analysant des dilutions d'échantillons cliniques positifs au VHB pour les génotypes A, B, C, D, E, F, G et H dans le sérum et le plasma humain négatif au VHB. Au moins 36 réplicats de chaque échantillon du panel ont été analysés avec chacun des deux lots de réactifs pour au moins 72 réplicats par échantillon du panel. Les résultats provenant du lot de réactifs avec la concentration la plus élevée qui atteint l'objectif de précision ($TE \leq 1 \log \text{ UI/ml}$ et $TAE \leq 1 \log \text{ UI/ml}$) avec 100 % de détection figurent dans le Tableau 7 pour le plasma et dans le Tableau 8 pour le sérum. Les résultats de la plus faible concentration observée qui atteint l'objectif de précision avec 100 % de détection sont grisés dans les deux tableaux et résumés dans le Tableau 9. Les LLoQ calculée pour les génotypes A, B, C, D, E, F, G et H dans le sérum et le plasma sont résumées dans Tableau 9. Cela a permis d'établir la LLoQ générale pour le test à 10 UI/ml.

Tableau 7 : Détermination de la LLoQ pour tous les génotypes dans le Plasma

| Génotype | Concentration cible | | Aptima HBV Quant | ET | Bias | ET calculée | EAT calculée |
|----------|---------------------|-------------|------------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| | (UI/ml) | (log UI/ml) | (log UI/ml) | (log UI/ml) | (log UI/ml) | (log UI/ml) | (log UI/ml) |
| A | 7 | 0,85 | 0,86 | 0,71 | 0,02 | 2,01 | 1,44 |
| | 8 | 0,90 | 0,76 | 0,34 | 0,14 | 0,96 | 0,82 |
| | 9 | 0,95 | 0,95 | 0,27 | 0,01 | 0,76 | 0,55 |
| B | 7 | 0,85 | 0,85 | 0,36 | 0,01 | 1,01 | 0,72 |
| | 8 | 0,90 | 0,93 | 0,24 | 0,03 | 0,67 | 0,51 |
| | 9 | 0,95 | 0,94 | 0,23 | 0,01 | 0,64 | 0,46 |
| C | 7 | 0,85 | 0,62 | 0,22 | 0,23 | 0,62 | 0,67 |
| | 8 | 0,90 | 0,65 | 0,25 | 0,25 | 0,70 | 0,75 |
| | 9 | 0,95 | 0,70 | 0,21 | 0,26 | 0,59 | 0,67 |
| D | 8 | 0,90 | 0,47 | 0,19 | 0,43 | 0,53 | 0,81 |
| | 9 | 0,95 | 0,58 | 0,17 | 0,38 | 0,48 | 0,72 |
| | 10 | 1,00 | 0,64 | 0,24 | 0,36 | 0,69 | 0,85 |
| E | 7 | 0,85 | 0,59 | 0,19 | 0,25 | 0,53 | 0,63 |
| | 8 | 0,90 | 0,59 | 0,23 | 0,31 | 0,66 | 0,78 |
| | 9 | 0,95 | 0,68 | 0,28 | 0,27 | 0,80 | 0,83 |
| F | 7 | 0,85 | 0,92 | 0,26 | 0,07 | 0,74 | 0,59 |
| | 8 | 0,90 | 1,09 | 0,29 | 0,18 | 0,83 | 0,77 |
| | 9 | 0,95 | 1,04 | 0,31 | 0,09 | 0,89 | 0,72 |
| G | 7 | 0,85 | 0,81 | 0,27 | 0,04 | 0,75 | 0,57 |
| | 8 | 0,90 | 0,91 | 0,26 | 0,01 | 0,72 | 0,52 |
| | 9 | 0,95 | 0,83 | 0,26 | 0,12 | 0,74 | 0,64 |
| H | 7 | 0,85 | 0,65 | 0,25 | 0,19 | 0,71 | 0,69 |
| | 8 | 0,90 | 0,67 | 0,24 | 0,23 | 0,68 | 0,71 |
| | 9 | 0,95 | 0,62 | 0,21 | 0,33 | 0,59 | 0,75 |

ET = écart-type

Tableau 8 : Détermination de la LLoQ pour tous les géotypes dans le Sérum

| Géotype | Concentration cible | | Aptima HBV Quant | ET | Bias | ET calculée | EAT calculée |
|---------|---------------------|-------------|---------------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| | (UI/ml) | (log UI/ml) | (log UI/ml) | (log UI/ml) | (log UI/ml) | (log UI/ml) | (log UI/ml) |
| A | 7 | 0,85 | 0,67 | 0,28 | 0,18 | 0,79 | 0,74 |
| | 8 | 0,90 | 0,80 | 0,34 | 0,10 | 0,96 | 0,78 |
| | 9 | 0,95 | 0,83 | 0,26 | 0,12 | 0,74 | 0,65 |
| B | 7 | 0,85 | 0,56 | 0,19 | 0,29 | 0,54 | 0,67 |
| | 8 | 0,90 | 0,71 | 0,22 | 0,20 | 0,62 | 0,63 |
| | 9 | 0,95 | 0,59 | 0,21 | 0,36 | 0,59 | 0,78 |
| C | 7 | 0,85 | 0,64 | 0,27 | 0,20 | 0,77 | 0,75 |
| | 8 | 0,90 | 0,75 | 0,25 | 0,15 | 0,70 | 0,64 |
| | 9 | 0,95 | 0,79 | 0,21 | 0,16 | 0,58 | 0,57 |
| D | 8 | 0,90 | 0,42 | 0,14 | 0,48 | 0,40 | 0,76 |
| | 9 | 0,95 | 0,47 | 0,18 | 0,49 | 0,51 | 0,84 |
| | 10 | 1,00 | 0,60 | 0,23 | 0,40 | 0,64 | 0,85 |
| E | 7 | 0,85 | 0,56 | 0,24 | 0,29 | 0,69 | 0,78 |
| | 8 | 0,90 | 0,63 | 0,18 | 0,27 | 0,50 | 0,63 |
| | 9 | 0,95 | 0,67 | 0,25 | 0,28 | 0,70 | 0,78 |
| F | 7 | 0,85 | 0,88 | 0,21 | 0,03 | 0,60 | 0,46 |
| | 8 | 0,90 | 0,90 | 0,29 | 0,01 | 0,81 | 0,58 |
| | 9 | 0,95 | 0,98 | 0,24 | 0,02 | 0,67 | 0,49 |
| G | 7 | 0,85 | 0,82 | 0,24 | 0,03 | 0,67 | 0,50 |
| | 8 | 0,90 | 0,90 | 0,25 | 0,01 | 0,70 | 0,50 |
| | 9 | 0,95 | 1,01 | 0,23 | 0,05 | 0,64 | 0,51 |
| H | 8 | 0,90 | 0,69 | 0,29 | 0,21 | 0,81 | 0,78 |
| | 9 | 0,95 | 0,77 | 0,26 | 0,19 | 0,74 | 0,71 |
| | 10 | 1,00 | 0,78 | 0,28 | 0,22 | 0,80 | 0,79 |

ET = écart-type

Tableau 9 : Résumé de la LLoQ pour les différents géotypes dans le plasma et le sérum

| Géotype | LLoQ plasma | | LLoQ sérum | |
|---------|-------------|---------|-------------|---------|
| | (log UI/ml) | (UI/ml) | (log UI/ml) | (UI/ml) |
| A | 0,95 | 8,90 | 0,83 | 6,79 |
| B | 0,93 | 8,60 | 0,56 | 3,59 |
| C | 0,62 | 4,14 | 0,64 | 4,38 |
| D | 0,64 | 4,32 | 0,60 | 4,01 |
| E | 0,59 | 3,91 | 0,56 | 3,60 |
| F | 0,92 | 8,25 | 0,88 | 7,56 |
| G | 0,81 | 6,42 | 0,82 | 6,55 |
| H | 0,62 | 4,20 | 0,78 | 6,01 |

Reproductibilité

Pour évaluer la reproductibilité, un panel de 28 membres a été créé par dilution des échantillons cliniques positifs au VHB (génotype A et C) ou par inoculation d'ADN du VHB (génotype A et C) dans un sérum et un plasma négatifs au VHB. Le panel a été analysé par trois opérateurs à l'aide de trois lots de réactifs sur trois Panther system sur 20 ou plus tests par jours.

Tableau 10 et Tableau 11 montre la reproductibilité des résultats du test (log UI/ml) entre les instruments, entre opérateurs, entre les lots, entre les courses, dans les courses et globalement. La variabilité totale était principalement due à la variabilité intra-course (p. ex., erreur aléatoire).

Tableau 10 : Reproductibilité du Aptima HBV Quant Assay pour le génotype A

| Matrice | N | Concentration moyenne (log UI/ml) | Entre opérateurs | | Entre appareils | | Entre lots | | Inter-séries | | Intra-série | | Total | |
|---------|-----|-----------------------------------|------------------|--------|-----------------|--------|------------|--------|--------------|--------|-------------|--------|-------|--------|
| | | | ET | CV (%) | ET | CV (%) | ET | CV (%) | ET | CV (%) | ET | CV (%) | ET | CV (%) |
| Plasma | 161 | 1,24 | 0,02 | 1,96 | 0,02 | 1,75 | 0,10 | 7,88 | 0,02 | 1,50 | 0,21 | 16,80 | 0,23 | 18,80 |
| Plasma | 162 | 1,97 | 0,01 | 0,75 | 0,01 | 0,71 | 0,08 | 3,84 | 0,02 | 0,76 | 0,14 | 7,36 | 0,17 | 8,40 |
| Plasma | 162 | 3,23 | 0,01 | 0,29 | 0,01 | 0,24 | 0,04 | 1,39 | 0,01 | 0,22 | 0,08 | 2,47 | 0,09 | 2,87 |
| Plasma | 162 | 4,14 | 0,03 | 0,76 | 0,01 | 0,28 | 0,04 | 0,90 | 0,01 | 0,15 | 0,06 | 1,38 | 0,08 | 1,84 |
| Plasma | 162 | 5,75 | 0,02 | 0,39 | 0,01 | 0,20 | 0,06 | 0,97 | 0,01 | 0,13 | 0,09 | 1,51 | 0,11 | 1,85 |
| Plasma | 162 | 6,98 | 0,05 | 0,79 | 0,03 | 0,48 | 0,06 | 0,91 | 0,01 | 0,11 | 0,09 | 1,35 | 0,13 | 1,87 |
| Plasma | 162 | 7,69 | 0,03 | 0,38 | 0,02 | 0,23 | 0,01 | 0,15 | 0,01 | 0,12 | 0,10 | 1,30 | 0,11 | 1,39 |
| Sérum | 160 | 1,17 | 0,02 | 1,93 | 0,02 | 1,71 | 0,06 | 5,54 | 0,02 | 1,64 | 0,20 | 17,07 | 0,21 | 18,21 |
| Sérum | 162 | 1,82 | 0,02 | 1,15 | 0,01 | 0,79 | 0,10 | 5,43 | 0,01 | 0,72 | 0,15 | 8,13 | 0,18 | 9,90 |
| Sérum | 162 | 3,16 | 0,01 | 0,26 | 0,02 | 0,62 | 0,09 | 2,78 | 0,02 | 0,59 | 0,11 | 3,38 | 0,14 | 4,47 |
| Sérum | 162 | 4,06 | 0,01 | 0,19 | 0,01 | 0,22 | 0,04 | 0,99 | 0,01 | 0,15 | 0,07 | 1,68 | 0,08 | 1,98 |
| Sérum | 162 | 5,60 | 0,02 | 0,36 | 0,01 | 0,24 | 0,06 | 1,15 | 0,01 | 0,22 | 0,13 | 2,40 | 0,15 | 2,70 |
| Sérum | 162 | 6,30 | 0,03 | 0,49 | 0,03 | 0,42 | 0,01 | 0,17 | 0,01 | 0,16 | 0,11 | 1,77 | 0,12 | 1,90 |
| Sérum | 162 | 7,48 | 0,05 | 0,62 | 0,03 | 0,36 | 0,02 | 0,25 | 0,02 | 0,23 | 0,08 | 1,09 | 0,10 | 1,35 |

CV = coefficient de variation, ET = écart-type

Remarque : La variabilité de certains facteurs peut être numériquement négative, ce qui peut survenir si la variabilité due à ces facteurs est très minime. Lorsque cela se produit, les valeurs ET et CV indiquées sont égales à 0.

Tableau 11 : Reproductibilité du Aptima HBV Quant Assay pour le géotype C

| Matrice | N | Concentration moyenne (log UI/ml) | Entre opérateurs | | Entre appareils | | Entre lots | | Inter-séries | | Intra-série | | Total | |
|---------|-----|-----------------------------------|------------------|--------|-----------------|--------|------------|--------|--------------|--------|-------------|--------|-------|--------|
| | | | ET | CV (%) | ET | CV (%) | ET | CV (%) | ET | CV (%) | ET | CV (%) | ET | CV (%) |
| Plasma | 161 | 1,28 | 0,02 | 1,73 | 0,02 | 1,40 | 0,07 | 5,39 | 0,02 | 1,28 | 0,18 | 14,32 | 0,20 | 15,52 |
| Plasma | 162 | 1,98 | 0,02 | 0,79 | 0,01 | 0,68 | 0,08 | 4,02 | 0,01 | 0,61 | 0,14 | 6,91 | 0,16 | 8,08 |
| Plasma | 162 | 3,23 | 0,01 | 0,31 | 0,01 | 0,39 | 0,05 | 1,49 | 0,01 | 0,18 | 0,06 | 1,97 | 0,08 | 2,52 |
| Plasma | 162 | 4,13 | 0,01 | 0,18 | 0,01 | 0,29 | 0,04 | 0,90 | 0,01 | 0,15 | 0,07 | 1,69 | 0,08 | 1,95 |
| Plasma | 162 | 5,78 | 0,01 | 0,14 | 0,02 | 0,41 | 0,06 | 1,04 | 0,01 | 0,16 | 0,10 | 1,70 | 0,12 | 2,05 |
| Plasma | 162 | 6,83 | 0,01 | 0,20 | 0,03 | 0,42 | 0,03 | 0,42 | 0,01 | 0,08 | 0,06 | 0,93 | 0,08 | 1,13 |
| Plasma | 162 | 7,75 | 0,03 | 0,33 | 0,02 | 0,19 | 0,02 | 0,24 | 0,01 | 0,08 | 0,07 | 0,94 | 0,08 | 1,04 |
| Sérum | 160 | 1,20 | 0,02 | 1,54 | 0,02 | 1,55 | 0,05 | 4,24 | 0,02 | 1,78 | 0,18 | 14,74 | 0,19 | 15,59 |
| Sérum | 162 | 1,90 | 0,02 | 1,20 | 0,02 | 0,87 | 0,05 | 2,73 | 0,01 | 0,72 | 0,15 | 8,10 | 0,17 | 8,71 |
| Sérum | 162 | 3,19 | 0,03 | 0,93 | 0,03 | 0,92 | 0,05 | 1,68 | 0,00 | 0,05 | 0,07 | 2,34 | 0,10 | 3,16 |
| Sérum | 162 | 4,04 | 0,01 | 0,14 | 0,01 | 0,31 | 0,04 | 0,94 | 0,00 | 0,12 | 0,05 | 1,30 | 0,07 | 1,64 |
| Sérum | 162 | 5,69 | 0,01 | 0,16 | 0,02 | 0,36 | 0,05 | 0,88 | 0,01 | 0,13 | 0,09 | 1,50 | 0,10 | 1,78 |
| Sérum | 162 | 6,32 | 0,04 | 0,64 | 0,03 | 0,45 | 0,04 | 0,66 | 0,01 | 0,14 | 0,10 | 1,57 | 0,12 | 1,87 |
| Sérum | 162 | 7,23 | 0,04 | 0,55 | 0,02 | 0,25 | 0,05 | 0,68 | 0,01 | 0,13 | 0,10 | 1,42 | 0,12 | 1,69 |

CV = coefficient de variation, ET = écart-type

Remarque : La variabilité de certains facteurs peut être numériquement négative, ce qui peut survenir si la variabilité due à ces facteurs est très minime. Lorsque cela se produit, les valeurs ET et CV indiquées sont égales à 0.

Substances potentiellement interférentes

La susceptibilité du Aptima HBV Quant Assay aux interférences générées par des taux élevés de substances endogènes ou de médicaments fréquemment prescrits chez les personnes infectées par le VHB a été évaluée. Des échantillons de plasma négatifs pour le VHB et des échantillons auxquels le VHB avait été ajouté à une concentration de 4,3 log UI/ml d'ADN de VHB ont été analysés.

Aucune interférence des performances du test n'a été observée en présence d'albumine (90 mg/ml), d'hémoglobine (5 mg/ml), de triglycérides (30 mg/ml) ou de bilirubine non conjuguée (0,2 mg/ml).

Des échantillons cliniques de plasma prélevés chez des patients présentant des taux élevés des substances définies ou chez des patients souffrant des maladies citées dans le Tableau 12 ont été analysés avec le Aptima HBV Quant Assay. Aucune interférence des performances du test n'a été observée.

Tableau 12 : Types d'échantillons cliniques analysés

| Types d'échantillons cliniques | |
|--------------------------------|---------------------------------------|
| 1 | Anticorps antinucléaire (AAN) |
| 2 | Facteur rhumatoïde (FR) |
| 3 | Cirrhose alcoolique (CA) |
| 4 | Hépatite alcoolique |
| 5 | Hépatite non alcoolique |
| 6 | Hépatite auto-immune |
| 7 | Alanine aminotransférase (ALT) élevée |
| 8 | Carcinome hépatocellulaire (CHC) |
| 9 | Sclérose en plaques (SEP) |
| 10 | Lupus érythémateux disséminé (LED) |
| 11 | Hyperglobulinémie |
| 12 | Polyarthrite rhumatoïde (PR) |
| 13 | Anticorps anti-Jo-1 (JO-1) |
| 14 | Myélome multiple (MM) |
| 15 | Hémolysé (hémoglobine élevée) |
| 16 | Ictérique (bilirubine élevée) |
| 17 | Lipémique (lipides élevés) |
| 18 | Protéines élevées |
| 19 | Anticorps anti-VHB (vaccinés) |
| 20 | Anticorps anti-VHC |
| 21 | Anticorps anti-VIH-1 et VIH-2 |

Aucune interférence des performances du test n'a été observée en présence des substances exogènes présentées dans le Tableau 13 à des concentrations d'au moins trois fois la C_{max} (plasma humain).

Tableau 13 : Substances exogènes

| Groupe de substances exogènes | Substances exogènes testées |
|-------------------------------|---|
| 1 | Saquinavir, ritonavir, amprénavir, indinavir, lopinavir, mésylate de nelfinavir |
| 2 | Clarithromycine, chlorhydrate de valganciclovir, éfavirenz, névirapine |
| 3 | Chlorhydrate de paroxétine, enfuvirtide, zidovudine, didanosine, sulfate d'abacavir |
| 4 | Ribavirine, entécavir, adéfovir dipivoxil, fumarate de ténofovir disoproxil, lamivudine, ganciclovir, acyclovir |
| 5 | Stavudine, ciprofloxacine, fluoxétine, azithromycine, valacyclovir, sertraline, zalcitabine |
| 6 | Interféron alpha-2a, interféron alpha-2b, interféron alpha-2b pégylé |

Spécificité

La spécificité a été déterminée à l'aide de 292 échantillons frais et 747 échantillons congelés négatifs pour le VHB. Au total, 521 échantillons de plasma et 518 échantillons de sérum ont été analysés. La spécificité a été calculée comme le pourcentage d'échantillons négatifs pour le VHB avec des résultats « Non détecté ». L'ADN du VHB n'a pas été détecté dans des 1 038 échantillons. La spécificité était de 99,9 % (1038/1039, IC à 95 % : 99,5-100 %).

Tableau 14 : Spécificité dans le sérum et le plasma des échantillons cliniques

| | Plasma frais | Plasma congelé | Plasma total | Sérum frais | Sérum congelé | Sérum total | Combinés |
|--------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Réplicats valide (n) | 145 | 376 | 521 | 147 | 371 | 518 | 1 039 |
| Non détecté | 145 | 376 | 521 | 147 | 370 | 517 | 1 038 |
| Spécificité (IC à 95 %) | 100 % (97,4-100) | 100 % (99,0-100) | 100 % (99,3-100) | 100 % (97,5-100) | 99,7 % (98,5-100) | 99,8 % (98,9-100) | 99,9 % (99,5-100) |

IC = intervalle de confiance

Spécificité analytique

Les réactions croisées potentielles avec les agents pathogènes énumérés dans le plasma humain Tableau 15 ont été évaluées en la présence ou l'absence d'ADN du VHB à 4,3 log UI/ml. Aucune réactivité croisée ou l'interférence n'a été observée dans le plasma contaminé par les bactéries ou dans des échantillons provenant de sujets infectés par autres pathogènes à diffusion hématogène, ou ceux qui avaient reçu des vaccins contre le VHB ou la grippe.

Tableau 15 : Agents pathogènes testés pour la spécificité analytique

| Micro-organisme/pathogène | Source | Micro-organisme/ pathogène | Source |
|--|---------------------------|--|---------------------------|
| Virus de l'hépatite C | Échantillon clinique. | Herpès virus humain type 8 | Milieu de culture liquide |
| Virus de l'hépatite A | Échantillon clinique. | Virus de l'encéphalite japonaise | Liquide d'ascite |
| Vacciné contre le VHB | Échantillon clinique. | Virus de l'encéphalite de la Murray valley | Lysat cellulaire |
| VIH-1 et -2 | Échantillon clinique. | Virus de l'encéphalite de Saint-Louis | Milieu de culture liquide |
| Virus de leucémie humaine à cellules T type 1 et 2 | Échantillon clinique. | Virus-vaccin | Lysat cellulaire |
| Parvovirus B19 | Échantillon clinique. | Virus de la fièvre jaune | Milieu de culture liquide |
| Cytomégalovirus | Échantillon clinique. | <i>Candida albicans</i> | Culture |
| Virus de la dengue type 1-4 | Échantillon clinique. | <i>Chlamydia trachomatis</i> | Culture |
| Virus Epstein-Barr | Échantillon clinique. | <i>Corynebacterium diphtheriae</i> | Culture |
| Vaccinés contre la grippe | Échantillon clinique. | <i>Mycobacterium gordonae</i> | Culture |
| Papillomavirus humain | Échantillon clinique. | <i>Mycobacterium smegmatis</i> | Culture |
| Virus herpès simplex 1 et 2 | Échantillon clinique. | <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | Culture |
| Virus de la rubéole | Échantillon clinique. | <i>Propionibacterium acnes</i> | Culture |
| Virus varicelle-zona | Échantillon clinique. | <i>Staphylococcus aureus</i> | Culture |
| Virus du Nil occidental | Échantillon clinique. | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Culture |
| BK polyomavirus humains | Lysat cellulaire | <i>Streptococcus pneumoniae</i> | Culture |
| Herpès virus humain 6B | Milieu de culture liquide | <i>Trichomonas vaginalis</i> | Culture |

Reproductibilité des échantillons cliniques

La reproductibilité a été évaluée par l'analyse de trois réplicats d'échantillons cliniques de plasma et de sérum naturellement infectés par le VHB. La concentration moyenne et l'écart-type pour les échantillons de plasma et de sérum sont respectivement présentés dans les Tableaux 16 et 17.

Tableau 16 : Répétabilité des échantillons de Plasma clinique

| Échantillon de plasma | Concentration moyenne (log UI/ml) | ET |
|-----------------------|-----------------------------------|------|
| 1 | 2,08 | 0,09 |
| 2 | 2,98 | 0,01 |
| 3 | 2,45 | 0,09 |
| 4 | 2,32 | 0,06 |
| 5 | 2,58 | 0,08 |
| 6 | 3,60 | 0,06 |
| 7 | 3,45 | 0,04 |
| 8 | 3,95 | 0,04 |
| 9 | 3,81 | 0,05 |
| 10 | 4,26 | 0,03 |
| 11 | 5,65 | 0,07 |
| 12 | 6,32 | 0,06 |
| 13 | 6,79 | 0,06 |
| 14 | 7,40 | 0,05 |
| 15 | 8,17 | 0,02 |

ET = écart-type

Tableau 17 : Répétabilité des échantillons de Sérum clinique

| Échantillon de sérum | Concentration moyenne (log UI/ml) | ET |
|----------------------|-----------------------------------|------|
| 1 | 1,93 | 0,17 |
| 2 | 2,29 | 0,09 |
| 3 | 2,78 | 0,05 |
| 4 | 1,98 | 0,06 |
| 5 | 2,53 | 0,07 |
| 6 | 3,53 | 0,06 |
| 7 | 3,38 | 0,03 |
| 8 | 3,77 | 0,02 |
| 9 | 3,45 | 0,17 |
| 10 | 4,26 | 0,04 |
| 11 | 6,31 | 0,02 |
| 12 | 5,45 | 0,04 |
| 13 | 5,74 | 0,08 |
| 14 | 7,44 | 0,04 |
| 15 | 8,47 | 0,03 |

ET = écart-type

Dilution d'échantillons à l'aide du diluant d'échantillon

Pour évaluer la récupération de l'ADN du VHB dans les échantillons dilués avec du diluant d'échantillon Aptima, des échantillons de plasma et de sérum couvrant l'ensemble de la plage linéaire ont été dilués au 1/3 avec du diluant d'échantillon Aptima. De plus, des échantillons cliniques à titre élevé naturellement infectés et des échantillons auxquels avait été ajouté de l'ADN de VHB de concentrations supérieures à la ULoQ ont été dilués au 1/100 avec le diluant d'échantillon Aptima. Chaque échantillon a été testé non dilué et dilué (1/3 ou 1/100) en triplicat. Les différences entre la concentration moyenne rapportée (facteur de dilution appliqué au résultat de l'échantillon dilué) et la concentration non diluée moyenne sont indiquées dans le Tableau 18 pour le plasma et dans le Tableau 19 pour le sérum. Les concentrations des échantillons se retrouvaient avec précisions dans les échantillons dilués.

Tableau 18 : Dilution de l'échantillon avec le diluant d'échantillon Aptima dans le Plasma

| Dilution | Concentration non diluée moyenne (log UI/ml) | Concentration moyenne rapportée ^a (log UI/ml) | Différence (log UI/ml) |
|----------|--|--|------------------------|
| 1:3 | 2,08 | 1,71 | -0,37 |
| | 2,98 | 3,02 | 0,04 |
| | 2,45 | 2,30 | -0,15 |
| | 2,32 | 2,06 | -0,26 |
| | 2,58 | 2,46 | -0,12 |
| | 3,60 | 3,62 | 0,02 |
| | 3,45 | 3,36 | -0,09 |
| | 3,95 | 3,91 | -0,04 |
| | 3,81 | 3,72 | -0,09 |
| | 4,26 | 4,24 | -0,02 |
| | 5,65 | 5,50 | -0,15 |
| | 6,32 | 6,08 | -0,24 |
| | 6,79 | 6,40 | -0,39 |
| | 7,40 | 7,06 | -0,34 |
| 1:100 | 8,17 | 8,05 | -0,12 |
| | 8,17 | 7,82 | -0,35 |
| | >9,00 ^b (10,20 ^c) | 10,40 | 0,20 |

^a La concentration rapportée est la valeur calculée après application du facteur de dilution.

^b Échantillons inoculés

^c Valeur de la concentration cible, qui est la ULoQ ci-dessus.

Tableau 19 : Dilution de l'échantillon avec le diluant d'échantillon Aptima dans le Sérum

| Dilution | Concentration non diluée moyenne (log UI/ml) | Concentration moyenne rapportée ^a (log UI/ml) | Différence (log UI/ml) |
|----------|--|--|------------------------|
| 1:3 | 1,93 | 1,50 | -0,43 |
| | 2,29 | 2,00 | -0,29 |
| | 2,78 | 2,45 | -0,33 |
| | 1,98 | 1,50 | -0,48 |
| | 2,53 | 2,23 | -0,30 |
| | 3,53 | 3,59 | 0,06 |
| | 3,38 | 3,21 | -0,17 |
| | 3,77 | 3,68 | -0,09 |
| | 3,45 | 3,35 | -0,10 |
| | 4,26 | 4,16 | -0,10 |
| | 6,31 | 5,98 | -0,33 |
| | 5,45 | 5,24 | -0,21 |
| | 5,74 | 5,62 | -0,12 |
| | 7,44 | 7,19 | -0,25 |
| | 8,47 | 8,31 | -0,16 |
| 1:100 | 8,47 | 8,19 | -0,28 |
| | >9,00 ^b (10,20 ^c) | 10,43 | 0,23 |

^a La concentration rapportée est la valeur calculée après application du facteur de dilution.

^b Échantillons inoculés

^c Valeur de la concentration cible, qui est au-dessus de la ULoQ.

Corrélation de la méthode

La performance du Aptima HBV Quant Assay a été évaluée contre un test comparatif portant un marquage CE et contre un test comparatif autorisé par Santé Canada, en testant des échantillons cliniques non dilués de patients infectés par le VHB. Un total de 614 échantillons cliniques dans la gamme linéaire commune pour les deux tests ont été utilisés pour la régression linéaire, comme indiqué dans Figure 8.

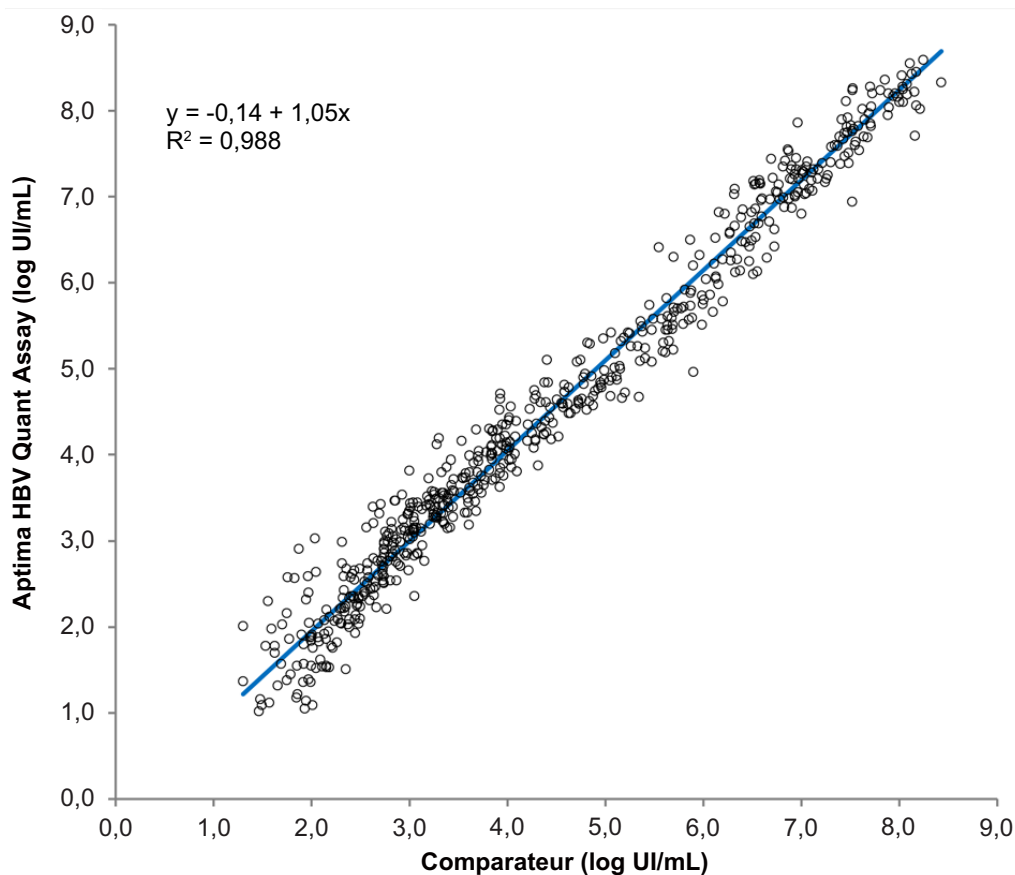


Figure 8. Corrélation entre le Aptima HBV Quant Assay et le test comparatif

Contamination de transfert

Afin d'établir que le Panther system réduit au maximum le risque de résultats faussement positifs par contamination de transfert, une étude a été menée sur trois Panther system avec des panels enrichis en ARN. La contamination par transfert a été évaluée en utilisant des échantillons de plasma à titre élevé auxquels avait été ajouté de l'ADN de VHB (8 log UI/ml) intercalés entre des échantillons négatifs pour le VHB selon un motif en damier. Les tests ont porté sur plus de quinze analyses. Le taux de contamination de transfert global était de 0,0 % (0/705).

Bibliographie

1. **Lok AS, McMahon BJ.** AASLD Practice Guideline Update. Chronic Hepatitis B: Update 2009. *Hepatology*. 2009; 50(3):661-662;1-36.
2. **Aspinall EJ, Hawkins G, Fraser A, Hutchinson SJ, Goldberg D.** Hepatitis B prevention, diagnosis, treatment and care: a review. *Occupational Medicine* 2011; 61(8):531-540.
3. **Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health.** Early Identification and Linkage to Care of Persons with Chronic Hepatitis B Virus Infection - Three U.S. Sites, 2012-2014. May 9, 2014, 63(18):399-401.
4. **Liaw YF, Chu CM.** Hepatitis B virus infection. *Lancet*. 2009;373(9663):582-92.
5. **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.
6. **International Agency for Research on Cancer.** Hepatitis B Virus. *IARC Monographs* 2012; 100B: 93-133.
7. **Price, J.** An Update on Hepatitis B, D, and E Viruses. *Topics in Antiviral Medicine* 2014; 21(5): 157-163.
8. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2005. Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods; Approved Guideline. CLSI Document MM13-A. Wayne, PA.
9. **29 CFR Part 1910.1030.** Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens; current version.
10. **Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health.** Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL); current version.
11. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2002. Clinical Laboratory Waste Management. CLSI Document GP5-A2. Villanova, PA.
12. **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.
13. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2003. Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline. CLSI document EP06-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.



Hologic, Inc.
10210 Genetic Center Drive
San Diego, CA 92121 États-Unis

Service client : +1 844 Hologic (+1 844 465 6442)
customersupport@hologic.com

Service technique : +1 888 484 4747
molecularsupport@hologic.com

Pour obtenir des coordonnées supplémentaires, visitez le site www.hologic.com.



Emergo Europe
Prinsessegracht 20
2514 AP The Hague
The Netherlands

Hologic, Aptima et Panther sont des marques commerciales et/ou des marques déposées de Hologic, Inc. et/ou de ses filiales, aux États-Unis et/ou dans d'autres pays. Toutes les autres marques commerciales qui peuvent apparaître dans cette notice sont des marques commerciales de leurs détenteurs respectifs.

Ce produit peut faire l'objet d'un ou plusieurs brevets américains décrits à l'adresse www.hologic.com/patents.

© 2016-2017 Hologic, Inc. Tous droits réservés.
AW-13182-901 Rev. 003
2017-05