

Aptima™ HCV Quant Dx Assay

In-vitro-Diagnostikum.

Nur zum US-Export.

Allgemeine Informationen	2
Verwendungszweck	2
Zusammenfassung und Testerklärung	2
Testprinzip	3
Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen	4
Lagerungs- und Handhabungsbedingungen für Reagenzien	7
Probenentnahme und -lagerung	8
Im Panther System gelagerte Proben	11
Transport von Patientenproben	11
Panther System	12
Im Lieferumfang enthaltene Reagenzien und Materialien	12
Erforderliche, jedoch nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien	14
Optionale Materialien	15
Testverfahren mit dem Panther System	15
Verfahrenshinweise	20
Qualitätskontrolle	21
Assay-Kalibrierung	21
Negativ- und Positivkontrollen	21
Interner Kalibrator/Interne Kontrolle	21
Interpretation der Ergebnisse	22
Einschränkungen	23
Leistungsdaten	24
Nachweisgrenze (LoD) mit dem 2. internationalen WHO-Standard	24
Nachweisgrenze bei HCV-Genotypen	25
Linearer Bereich	26
Linearität bei HCV-Genotypen	27
Untere Quantifizierungsgrenze mit dem 2. internationalen WHO-Standard	27
Bestimmung der unteren Quantifizierungsgrenze bei HCV-Genotypen	29
Präzision	31
Substanzen mit möglicher beeinträchtigender Wirkung	31
Spezifität	33
Analytische Spezifität	34
Klinische Proben mit anderen Viren als HCV	35
Wiederholbarkeit bei klinischen Patientenproben	35
Probenverdünnung mit Probenverdünner	36
Methodenkorrelation	38
Diagnostische Übereinstimmung	38
Verschleppung	39
Serokonversionspanel	39
Bibliographie	40

Allgemeine Informationen

Verwendungszweck

Der Aptima HCV Quant Dx Assay ist ein sogenannter transkriptionsvermittelter Amplifikations-Test (Transcription-Mediated Amplification, TMA) in Echtzeit (Real-time). Dieser Test wird sowohl zum Nachweis als auch zur Quantifizierung der Hepatitis C Virus (HCV)-RNA in frischem und gefrorenem Humanserum und Plasma von HCV-infizierten Personen angewendet.

Das Plasma kann in Ethylendiamintetraacetat (EDTA), gerinnungshemmender Acid-Citrate-Dextrose-Lösung (ACD-Stabilisator) und Plasmavorbereitungsröhrchen (PPT) vorbereitet werden. Das Serum kann in Serumröhrchen und Serum-Separator-Röhrchen (SST) vorbereitet werden. Die Testung der Proben findet automatisiert auf dem Panther System statt und umfasst die Aufarbeitung der Proben, Amplifikation, Detektion und Quantifizierung. Proben, welche die HCV-Genotypen 1 bis 6 enthalten, sind für den Nachweis und die Quantifizierung im Assay validiert.

Der Aptima HCV Quant Dx Assay ist zur Unterstützung der diagnose Von hcv-infektionen bestimmt. Der Assay kann zur Bestätigung einer aktiven HCV-Infektion bei Patienten mit positivem HCV-Antikörperbefund eingesetzt werden. Die Detektion von HCV-RNA bedeutet, dass sich das Virus repliziert und ist daher der Nachweis für eine aktive Infektion.

Der Aptima HCV Quant Dx Assay ist zur Unterstützung beim Management von HCV-infizierten Patienten, die sich einer antiviralen medikamentösen HCV-Therapie unterziehen, bestimmt. Der Assay misst HCV-RNA-Level bei Beginn (Baseline), während der Behandlung und nach der Behandlung, um das anhaltende virologische Ansprechen (sustained virological response, SVR) zu ermitteln. Die Ergebnisse des Aptima HCV Quant Dx Assays sind im Kontext aller relevanten klinischen und laborbezogenen Erkenntnisse zu interpretieren.

Der Aptima HCV Quant Dx Assay ist nicht für die Verwendung als Screening-Test auf das Vorhandensein von HCV im Blut oder Blutprodukten bestimmt.

Zusammenfassung und Testerklärung

HCV ist ein durch Blut übertragener Krankheitserreger und stellt mit bis zu 170 Mio. Infizierten Menschen weltweit und jährlich 350.000 Todesfällen durch HCV-bedingte Erkrankungen, darunter Zirrhose und Leberkrebs, eine globale Bedrohung im gesundheitswesen dar.^{1,2} Die Übertragung von HCV erfolgt über Blut, Blutprodukte oder Aktivitäten mit potenzieller perkutaner Exposition.^{3,4} Genetisch enthält HCV ein +-Strang-RNA-Genom von circa 9500 Nukleotiden, die strukturelle Proteine (Core, E1- und E2-Glykoprotein, p7-Ionenkanalprotein) und nicht strukturelle Proteine (NS2, NS3, NS4A/B, NS5A/B) kodieren, wobei letztere für die virale Replikation entscheidend sind und das Ziel von direkt wirkenden antiviralen Wirkstoffen darstellen.^{4,5} Zwei untranslatierte Regionen (UTR) des Genoms, 5'UTR und 3'UTR, dienen zur Regulation der Translation bzw. Replikation/Verpackung des Genoms.⁵ Die 5'UTR ist die am höchsten konservierte genomische Region der sechs wichtigsten HCV-Genotypen.⁶

Aus klinischer Sicht gibt es eine hohe Prävalenz asymptomatischer HCV-Infektionen und trotz (normalerweise Innerhalb von 5–12 wochen) nachweisbarer antikörper tritt bei bis zu 75% der Patienten eine chronische HCV-Infektion auf.² HCV-Testalgorithmen erfordern die Diagnose aktiver HCV-Infektionen bei antikörperpositiven Personen durch Nachweis von HCV-RNA in Plasma oder Serum, um eine geeignete Behandlung zu ermöglichen.^{7,8,9}

Die Quantifizierung der HCV-RNA (Viruslast) spielt eine entscheidende Rolle bei der Festlegung und Überwachung einer erfolgreichen HCV-Behandlung. Das anhaltende virologische Ansprechen (SVR), definiert als nicht mehr nachweisbare HCV-RNA nach erfolgreicher Therapie, ist ein Schlüsselmarker für die Heilung der HCV-Infektion.^{10,11} Bei der interferonbasierte Therapie wurden ein frühes virologisches Ansprechen (EVR), definiert als Abnahme der HCV-Viruslast um mindestens 2 log nach 12 Wochen Therapie, und ein schnelles virologisches Ansprechen (RVR), definiert als nicht mehr nachweisbare HCV-RNA nach 4 Wochen Therapie als positive Prädiktoren für SVR belegt.^{10,12,13} Diese Marker der viralen Kinetik werden in auf das Ansprechen der Patienten beruhenden Ansätzen eingesetzt, bei denen die Behandlungsoptionen zum Absetzen oder Ausweiten der Therapie individuell zugeschnitten werden, um eine SVR zu erreichen.¹⁴ Darüber hinaus haben langfristig angelegte Follow-up Studien gezeigt, dass die Dauerhaftigkeit der SVR nach erfolgreicher Behandlung und Ausrottung des Virus ein Fortschreiten der Lebererkrankung verhindert.¹⁰

Im Zeitalter direkt wirksamer antiviraler Wirkstoffe (Direct-Acting Antivirals, DAAs) wird die HCV-Viruslast vor Therapiebeginn zur Bestimmung der Baseline-Viruslast, während der Behandlung zum Monitoring des Ansprechverhaltens und nach der Therapie gemessen, um die SVR (oder das Rezidiv) zu evaluieren. Fast alle Patienten sprechen während der Behandlung virologisch auf DAAs an, definiert als Wert unterhalb der unteren Quantifizierungsgrenze (< LLoQ) für den Assay an und zeigen mit den meisten Behandlungsstrategien SVR-Raten von über 90% 12 Wochen nach der Therapie.^{8,11} Der Nachweis und die Quantifizierung der HCV-RNA werden bei der HCV-Diagnose und beim Management von Patienten mit antiviralen Therapien weiterhin eine entscheidende Rolle spielen.

Testprinzip

Der Aptima HCV Quant Dx Assay ist ein Nukleinsäure-Amplifikationstest mit transkriptionsvermittelter Echtzeit-Amplifikationstechnologie (TMA) zum Nachweis und zur Quantifizierung der HCV-RNA, um die Diagnosestellung zu erleichtern oder die Ausgangsviruslast vor der Therapie zu ermitteln sowie um das Ansprechen unter und nach Therapie zu messen. Der Assay hat eine konservierte Region des HCV-Genoms als Target und ermöglicht den Nachweis und die Quantifizierung der Genotypen 1, 2, 3, 4, 5 und 6. Der Assay ist gemäß dem 2. internationalen WHO-Standard für das Hepatitis-C-Virus (NIBSC-Code 96/798) standardisiert.¹²

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

Beim Target-Capture wird die Virus-RNA von den Proben isoliert. Die Patientenprobe wird mit einem Detergens behandelt, um die Virushülle zu solubilisieren, Proteine zu denaturieren und die genomische Virus-RNA freizusetzen. Capture-Oligonukleotide hybridisieren an hoch konservierte Regionen HCV-RNA, sofern in der Testprobe vorhanden. Das hybridisierte Target wird anschließend auf magnetischen Mikropartikeln gebunden, die dann in einem Magnetfeld von der Patientenprobe getrennt werden. Irrelevante Bestandteile werden durch Waschschriffe aus dem Reaktionsröhrchen entfernt.

Die Target-Amplifikation findet durch TMA statt, eine transkriptionsvermittelte Nukleinsäureamplifikationsmethode, bei der zwei Enzyme, die reverse Transkriptase des MMLV (Moloney murine leukemia virus) 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 mehrere Kopien des RNA-Amplikons vom Template der DNA-Kopie. Der Aptima HCV Quant Dx Assay nutzt die TMA-Methode, um einen Teil der 5'UTR des HCV-Genoms zu amplifizieren. Die Amplifikation dieser Region erfolgt über spezielle Primer, die zur Amplifikation der HCV-Genotypen 1, 2, 3, 4, 5 und 6 bestimmt sind.

Die Detektion wird erreicht, indem einzelsträngige Nukleinsäure-Torches verwendet werden, die während der Amplifikation des Targets vorhanden sind und spezifisch und in Echtzeit an das Amplikon hybridisieren. Jede Torch hat ein Fluorophor und einen Quencher. Wenn die Torch nicht mit dem Amplikon hybridisiert, befindet sich der Quencher nahe bei dem Fluorophor und unterdrückt die Fluoreszenz. Bindet die Torch 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 Torches an Amplikons hybridisieren, desto stärker ist das erzeugte Fluoreszenzsignal. Der Zeitraum, der verstreicht, bis das Fluoreszenzsignal einen bestimmten Schwellenwert erreicht hat, ist zur HCV-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 HCV- und IC-Signale in jeder Reaktion mit Kalibrierungsdaten verglichen werden.

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- A. Zur Verringerung des Risikos ungültiger Ergebnisse müssen die Packungsbeilage und das *Panther System Operator's Manual* (Bedienungsanleitung für das Panther System) vollständig durchgelesen werden, bevor dieser Assay durchgeführt wird.

Laborbezogen



- B. VORSICHT: Die Kontrollen für diesen Assay enthalten Humanplasma. In von der US-amerikanischen Zulassungsbehörde FDA (Food and Drug Administration) zugelassenen Verfahren ist das Plasma negativ 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 von Probenpools nicht-reaktiv auf HCV-RNA und HIV-1-RNA. Alle aus Humanblut stammenden Materialien sind als potenziell infektiös zu betrachten und mit den allgemeinen Vorsichtsmaßnahmen zu behandeln.^{15,16,17}
- C. Dieses Verfahren sollte nur von Personen durchgeführt werden, die in der Anwendung des Aptima HCV Quant Dx Assays und in der Handhabung potenziell infektiösen Materials entsprechend geschult sind. Verschüttungen sind unter Einhaltung entsprechender vor Ort gültiger Verfahren sofort zu desinfizieren.
- D. Nur die im Lieferumfang enthaltenen oder angegebenen Einweg-Laborprodukte verwenden.

- E. 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.
- F. 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.
- G. Material, das in Kontakt mit Patientenproben und Reagenzien gelangt ist, nach allen geltenden Vorschriften entsorgen.^{15,16,17,18} Alle Arbeitsflächen gründlich reinigen und desinfizieren.
- H. Die Kontrollen enthalten Natriumazid als Konservierungsmittel. Für den Reagenzientransfer keinen Metallröhrchen 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.
- I. Zu der guten Standardpraxis für Molekularbiologie-Laboratorien gehört auch die Überwachung der Laborumgebung. Zur Überwachung der Laborumgebung wird folgende Vorgehensweise empfohlen:
1. Einen Wattetupfer 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 Tupfer auf der betreffenden Oberfläche in einer vertikalen Bewegung von oben nach unten führen. Während der Probengewinnung den Tupfer etwa eine halbe Drehung drehen.
 6. Die Tupferprobe sofort in das Röhrchen geben und in dem 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 der Kappe verschließen.
 7. Die Schritte mit den verbleibenden Tupferproben wiederholen.
 8. Die Tupferprobe mit dem molekularen Assay testen.

Probenbezogen

- J. Proben können infektiös sein. Bei der Durchführung dieses Assays sind die allgemein gültigen Vorsichtsmaßnahmen^{15,16,17} zu befolgen. Entsprechend den vor Ort geltenden Bestimmungen sind angemessene Handhabungs- und Entsorgungsmethoden festzulegen.¹⁸ Dieses Verfahren sollte nur von Personen durchgeführt werden, die in der Anwendung des Aptima HCV Quant Dx Assays und in der Handhabung infektiösen Materials entsprechend geschult sind.
- K. Um die Probenintegrität zu wahren, müssen während des Probenversands die ordnungsgemäßen Lagerbedingungen aufrechterhalten werden. Die Probenstabilität unter anderen Versandbedingungen als den hier empfohlenen wurde nicht evaluiert.
- L. Kreuzkontamination in den Probenbehandlungsschritten vermeiden. Insbesondere ist darauf zu achten, beim Lösen oder Entfernen von Deckeln 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. Wechseln Sie die Handschuhe, wenn sie mit Proben in Kontakt kommen.

Testbezogen

- M. Das Reagenzien-Kit, den Kalibrator oder die Kontrollen nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden.
- N. Reagenzien aus Kits mit verschiedenen Chargennummern nicht austauschen, vermischen oder kombinieren. Assay-Flüssigkeiten können verschiedene Chargennummern aufweisen. Kontrollen und Kalibratoren können verschiedene Chargennummern aufweisen.
- O. Eine mikrobielle und Nuklease-Kontamination der Reagenzien ist zu vermeiden.
- P. Alle Assay-Reagenzien verschließen und bei den angegebenen Temperaturen lagern. Die Assayleistung kann durch Verwendung von falsch gelagerten Assay-Reagenzien beeinträchtigt sein. Siehe *Lagerungs- und Handhabungsbedingungen für Reagenzien* und *Testverfahren mit dem Panther System* für weitere Informationen.
- Q. Assay-Reagenzien oder Flüssigkeiten nicht kombinieren, außer auf ausdrückliche Anweisung. Füllen Sie Reagenzien oder Flüssigkeiten nicht nach. Das Panther System überprüft die Reagenzien-Füllstände.

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
qHCV-Amplifikationsreagenz	2 °C bis 8 °C		
qHCV-Amplifikationsrekonstitutionslösung	2 °C bis 8 °C	2 °C bis 8 °C	30 Tage ^a
qHCV-Enzymreagenz	2 °C bis 8 °C		
qHCV-Enzymrekonstitutionslösung	2 °C bis 8 °C	2 °C bis 8 °C	30 Tage ^a
qHCV Promotorreagenz	2 °C bis 8 °C		
qHCV-Promotorekonstitutionslösung	2 °C bis 8 °C	2 °C bis 8 °C	30 Tage ^a
qHCV Target-Capture-Reagenz	2 °C bis 8 °C	2 °C bis 8 °C	30 Tage ^a
qHCV NC CONTROL – (Negativkontrolle)	-15 °C bis -35 °C	15 °C bis 30 °C	Fläschchen für den Einmalgebrauch Innerhalb von 24 Stunden verwenden
qHCV LPC CONTROL + (schwach positive Kontrolle)	-15 °C bis -35 °C	15 °C bis 30 °C	Fläschchen für den Einmalgebrauch Innerhalb von 24 Stunden verwenden
qHCV HPC CONTROL + (stark positive Kontrolle)	-15 °C bis -35 °C	15 °C bis 30 °C	Fläschchen für den Einmalgebrauch Innerhalb von 24 Stunden verwenden
qHCV PCAL (Positivkalibrator)	-15 °C bis -35 °C	15 °C bis 30 °C	Fläschchen für den Einmalgebrauch Innerhalb von 24 Stunden verwenden

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

- B. Alle unbenutzten rekonstituierten Reagenzien und das Target-Capture-Reagenz (Target Capture Reagent, TCR) nach 30 Tagen oder nach Ablauf des Verfallsdatums des Master-Lots (das frühere Datum ist ausschlaggebend) entsorgen.
- C. Im Panther System gelagerte Reagenzien sind im Gerät 72 Stunden stabil. Reagenzien können bis zu 5 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.
- ⚠ E. Das Promotorreagenz und das rekonstituierte Promotorreagenz sind lichtempfindlich. Diese Reagenzien sind lichtgeschützt zu lagern und für die Anwendung vorzubereiten.

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, eine Kreuzkontamination zu vermeiden. Benutztes Material ist beispielsweise so zu beseitigen, dass es nicht über geöffnete Röhrchen geführt wird.

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

- Röhrchen, die Ethylendiamintetraacetat EDTA oder Acid-Citrate-Dextrose (ACD)-Antikoagulanzen enthalten, oder
- Plasmavorbereitungsröhrchen (Plasma Preparation Tubes, PPTs)
- Serumröhrchen
- Serum-Separator-Röhrchen (Serum Separator Tubes, SSTs)

Bei Serum ist vor der Weiterverarbeitung die Koagelbildung abzuwarten.

A. Probenentnahme

Vollblut kann bei 2 °C bis 30 °C gelagert werden und ist innerhalb von 6 Stunden nach der Probenentnahme zu zentrifugieren. Plasma oder Serum unter Einhaltung der Herstelleranweisungen für das jeweils verwendete Röhrchen vom Erythrozytenpellet trennen. Plasma oder Serum kann im primären Röhrchen auf dem Panther System getestet oder zuvor in ein sekundäres Probenaliquotröhrchen (Specimen Aliquot Tube, SAT) überführt werden. Das Serum- oder Plasmamindestvolumen für primäre Entnahmeröhrchen beträgt 1200 µl bzw. 700 µl bei SATs, um das Reaktionsvolumen von 500 µl zu erreichen.

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

B. Bedingungen für die Lagerung von Patientenproben

1. EDTA- und ACD-Plasmaproben

Vollblut kann bei 2 °C bis 30 °C gelagert werden und ist innerhalb von 6 Stunden nach der Probenentnahme zu zentrifugieren. Anschließend kann Plasma unter einer der folgenden Bedingungen längere Zeit gelagert werden:

- Im primären Entnahmeröhrchen oder SAT bis zu 24 Stunden lang bei 2 °C bis 25 °C,
- Im primären Entnahmeröhrchen oder SAT bei 2 °C bis 8 °C bis zu 5 Tage lang oder
- Im SAT bis zu 60 Tage lang bei -20 °C.

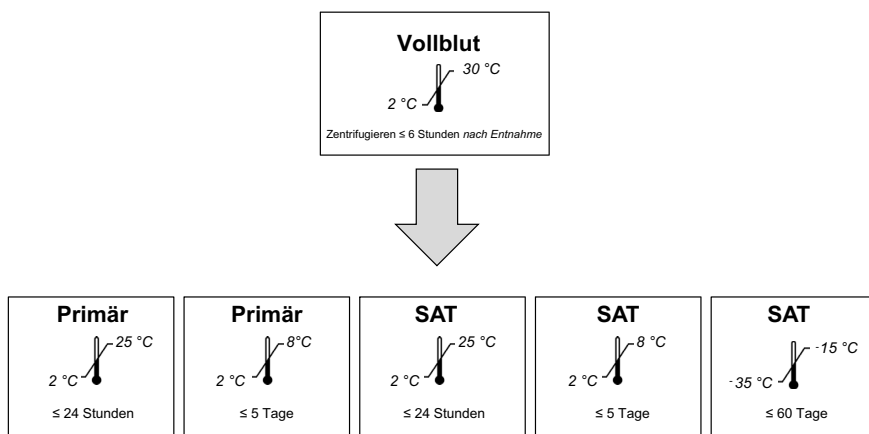


Abbildung 1. Bedingungen für die Lagerung von EDTA/ACD-Röhrchen

2. PPT-Patientenproben

Vollblut kann bei 2 °C bis 30 °C gelagert werden und ist innerhalb von 6 Stunden nach der Probenentnahme zu zentrifugieren. Anschließend kann Plasma unter einer der folgenden Bedingungen längere Zeit gelagert werden:

- Im primären Entnahmeröhrchen oder SAT bis zu 24 Stunden lang bei 2 °C bis 25 °C,
- Im primären Entnahmeröhrchen oder SAT bei 2 °C bis 8 °C bis zu 5 Tage lang oder
- Im primären Entnahmeröhrchen oder SAT bis zu 60 Tage lang bei -20 °C.

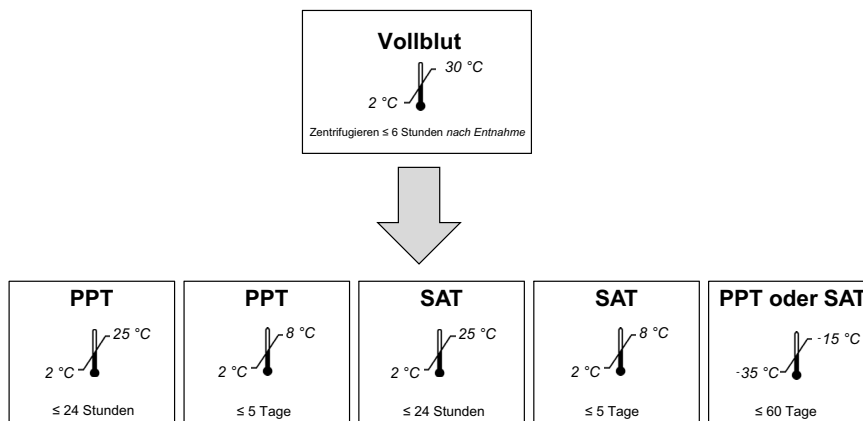


Abbildung 2. Bedingungen für die Lagerung von PPTs

3. Patientenproben in Serumröhrchen

Vollblut kann bei 2 °C bis 30 °C gelagert werden und ist innerhalb von 6 Stunden nach der Probenentnahme zu zentrifugieren. Anschließend kann Serum unter einer der folgenden Bedingungen längere Zeit gelagert werden:

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

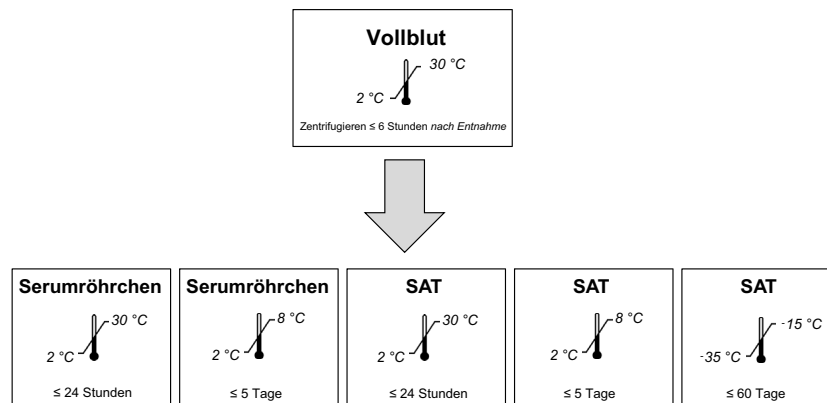


Abbildung 3. Bedingungen für die Lagerung von Serumröhrchen

4. SST-Patientenproben

Vollblut kann bei 2 °C bis 30 °C gelagert werden und ist innerhalb von 6 Stunden nach der Probenentnahme zu zentrifugieren. Anschließend kann Serum unter einer der folgenden Bedingungen längere Zeit gelagert werden:

- Im primären Entnahmeröhrchen oder SAT bis zu 24 Stunden lang bei 2 °C bis 30 °C,

- Im primären Entnahmeröhrchen oder SAT bei 2 °C bis 8 °C bis zu 5 Tage lang oder
- Im primären Entnahmeröhrchen oder SAT bei -20 °C bis zu 60 Tage lang.

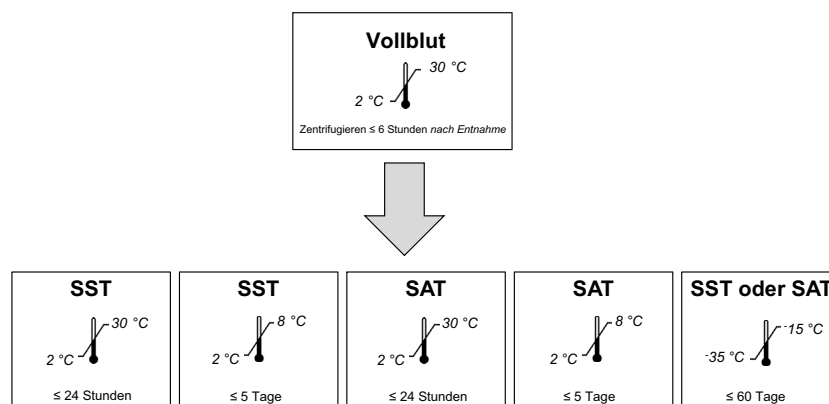


Abbildung 4. Bedingungen für die Lagerung von SSTs

C. Langzeitlagerung im gefrorenen Zustand

Plasma- oder Serumproben können in SAT 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 verdünnt werden. Für weitere Informationen siehe *Testverfahren mit dem Panther System*, Schritt E.6.

⚠ *Wenn überhaupt, so ist eine Verdünnung von Plasma- und Serumproben nur für quantitative Ergebnisse erforderlich. Für diagnostische Ergebnisse dürfen Plasma- oder Serumproben nicht verdünnt werden.*

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

Im Panther System gelagerte Proben

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

Halten Sie sich an die unter *Probenentnahme und -lagerung* beschriebenen Lagerbedingungen für Proben.

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 HCV Quant Dx Assay für das Panther System gelistet. Die Symbole zur Identifikation der Reagenzien sind neben dem Reagenznamen angegeben.

Im Lieferumfang enthaltene Reagenzien und Materialien

Hinweis: Informationen zu eventuell mit den Reagenzien verbundenen Gefahren- und Vorsichtshinweisen finden Sie in der Sicherheitsdatenblatt-Sammlung (Safety Data Sheet Library) unter www.hologic.com/sds.

Aptima HCV Quant Dx Assay-Kit, 100 Tests, Kat.-Nr. PRD-03506
(1 Assay-Box, 1 Kalibrator-Kit und 1 Kit mit Kontrollen)

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

Aptima HCV Quant Dx Assay-Box

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

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

Aptima HCV Quant Dx Kalibrator-Kit (Kat.-Nr. PRD-03507)

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

Symbol	Komponente	Menge
PCAL	qHCV Positivkalibrator <i>Transkript in gepufferter Lösung.</i>	5 x 2,5 ml
	Barcode-Etikett des Kalibrators	—

Aptima HCV Quant Dx Kit mit Kontrollen (Kat.-Nr. PRD-03508)

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

Symbol	Komponente	Menge
NC	qHCV Negativkontrolle <i>HCV-negatives defibriertes Humanplasma mit Gentamicin und 0,2% Natriumazid als Konservierungsmittel.</i>	5 x 0,8 ml
LPC	qHCV Schwach positive Kontrolle <i>Nicht-infektöse HCV-Armored RNA in defibriertem Humanplasma mit Gentamicin und 0,2% Natriumazid als Konservierungsmittel.</i>	5 x 0,8 ml
HPC	qHCV Stark positive Kontrolle <i>Nicht-infektöse HCV-Armored RNA in defibriertem Humanplasma mit Gentamicin und 0,2% Natriumazid als Konservierungsmittel.</i>	5 x 0,8 ml
	Barcode-Etikett der Kontrolle	—

Erforderliche, jedoch nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien

Hinweis: Materialien, die von Hologic erhältlich sind, sind mit der Katalognummer aufgeführt, sofern nicht anders angegeben.

Material	Optionale Materialien Best.-Nr.
Panther System	—
Panther Durchlaufkit für Echtzeitassays (nur für Echtzeitassays)	PRD-03455 (5000 Tests)
<i>Aptima Assayflüssigkeitskit (auch als Universal-Flüssigkeitskit bezeichnet) enthält Aptima Waschlösung, Aptima Puffer für Deaktivierungsflüssigkeit und Aptima Ölreagenz</i>	303014 (1000 Tests)
<i>Multi-Röhrchen-Einheiten (MTUs)</i>	104772-02
<i>Panther Entsorgungsbeutel-Kit</i>	902731
<i>Panther Abfallabdeckung</i>	504405
Oder Panther System-Durchlaufkit <i>(wenn keine Nicht-Echtzeit-TMA-Assays parallel zu Echtzeit-TMA-Assays durchgeführt werden) enthält MTUs, Abfallbeutel, Abfallbehälterabdeckungen, Auto-Detektions- und Assay-Flüssigkeiten)</i>	303096 (5000 Tests)
Spitzen, 1000 µl, leitfähig, zur Flüssigkeitsstandmessung	10612513 (Tecan)
Chlorbleiche, 5% bis 7% (0,7 M bis 1,0 M) Natriumhypochloritlösung	—
Ungepuderte Einweghandschuhe	—
Ersatzdeckel, undurchlässig	103036A
Ersatzdeckel für Reagenzien <i>Rekonstitutionsflaschen für Amplifikations-, Enzym- und Promoter-Reagenz</i>	CL0041 (100 Kappen)
<i>TCR-Flasche</i>	CL0040 (100 Kappen)
Labortischunterlagen mit Kunststoffrückseite	—
Fusselfreie Tücher	—
Pipettor	—
Spitzen	—
Es können primäre Entnahmeröhrchen mit folgenden Abmessungen verwendet werden: <i>13 mm x 100 mm 13 mm x 75 mm 16 mm x 100 mm</i>	—
Zentrifuge	—
Vortexer	—

Optionale Materialien

Material	Optionale Materialien Best.-Nr.
Aptima Probenaliquotröhrchen (Specimen Aliquot Tubes, SAT) (100 St.)	503762
Kappe für Transportröhrchen (100 St.) <i>Deckel für SAT</i>	504415
Aptima Probenverdünner	PRD-03003
Aptima Probenverdünner-Kit <i>enthält Probendiluent, 100 SATs und 100 Kappen</i>	PRD-03478
Transferpipetten	—
Handelsübliche Panels, z. B.: <i>HCV von Quality Control for Molecular Diagnostics (QCMD) oder SeraCare ACCURUN HCV-Panels</i>	—
Wattestäbchen	—
Wippe für Röhrchen (Rocker)	—

Testverfahren mit dem Panther System

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

A. Vorbereitung des Arbeitsbereichs

1. Reinigen Sie die Arbeitsflächen, auf denen die Reagenzien vorbereitet werden. Wischen Sie die Arbeitsflächen mit einer 2,5%igen bis 3,5%igen (0,35 M bis 0,5 M) Natriumhypochloritlösung ab. Lassen Sie die Natriumhypochloritlösung mindestens 1 Minute auf den Flächen einwirken. Spülen Sie sie anschließend mit entionisiertem Wasser ab. Die Natriumhypochloritlösung darf nicht antrocknen. Decken Sie die Labortischoberflächen mit sauberen, saugfähigen Labortischunterlagen mit Kunststoffrückseite ab.
2. Reinigen Sie eine separate Arbeitsfläche, auf der die Proben vorbereitet werden. Gehen Sie dabei vor, wie vorstehend beschrieben (Schritt A.1).
3. Reinigen Sie alle Pipettierer. Gehen Sie bei der Reinigung vor, wie vorstehend beschrieben (Schritt A.1).

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 um, um den Inhalt gründlich zu mischen. Es ist darauf zu achten, dass der Röhrcheninhalt vor dem Gebrauch komplett aufgetaut ist.

Option. Die Röhrchen mit dem Kalibrator und den Kontrollen können auf einer geeigneten Wippe platziert werden, um ihren Inhalt gründlich zu mischen. Es ist darauf zu achten, dass der Röhrcheninhalt vor dem Gebrauch komplett aufgetaut ist.

Hinweis: Beim Umdrehen 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. Gehen Sie folgenderweise vor, um das Target Capture-Reagenz (TCR) vorzubereiten:
 - a. Nehmen Sie das TCR aus der Lagerung (2 °C bis 8 °C). Überprüfen Sie die Chargennummer auf dem TCR-Fläschchen, um sicherzustellen, dass sie mit der Chargennummer auf dem Master-Lot Barcodeblatt übereinstimmt.
 - b. Schütteln Sie die TCR-Fläschchen sofort kräftig 10 Mal. Lassen Sie das TCR-Fläschchen mindestens 45 Minuten bei 15 °C bis 30 °C erwärmen. Während dieser Zeit sollten Sie das TCR-Fläschchen mindestens alle 10 Minuten schwenken und umdrehen.

Option. Das TCR-Fläschchen kann auf einer geeigneten Wippe 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 das TCR-Fläschchen auf einer geeigneten Wippe und lassen Sie es mindestens 45 Minuten bei 15 °C bis 30 °C erwärmen.

- c. Vergewissern Sie sich vor dem Gebrauch, dass alle Präzipitate in Lösung und die Magnetpartikel suspendiert sind.
2. Zum Rekonstituieren von Amplifikations-, Enzym- und Promotorreagenz 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 lyophilisierten Reagenz.
 - b. Vergewissern Sie sich, dass die Etiketten der Rekonstitutionslösung und des gefriergetrockneten Reagenzes dieselbe Farbe aufweisen. Prüfen Sie die Chargennummern auf dem Master-Lot Barcodeblatt, um sicherzustellen, dass die richtigen Reagenzien miteinander gepaart wurden.
 - i. Öffnen Sie das Fläschchen mit dem gefriergetrockneten Reagenz, indem Sie 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 das Fläschchen mit der entsprechenden Rekonstitutionslösung und legen Sie den Deckel auf eine saubere, abgedeckte Arbeitsfläche.
 - iv. Stellen Sie das Fläschchen mit der Rekonstitutionslösung auf eine stabile Fläche (d. h. 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 zusammengefügte Gefäße langsam um, damit die Lösung in das Glasfläschchen laufen kann (Abbildung 5, Schritt 3).
- vi. Schwenken Sie die zusammengefügte Gefäße 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, schwenken Sie die zusammengefügte Flaschen mindestens 10 Sekunden lang und mischen Sie anschließend die Lösung gründlich, indem Sie das Glasfläschchen leicht nach vorne und hinten kippen.
- c. Drehen Sie die zusammengefügte 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 das Rekonstitutionsverbindungsstück und das Glasfläschchen (Abbildung 5, Schritt 6).
- e. Verschließen Sie das Fläschchen wieder. Tragen Sie die Initialen des Bedieners und das Rekonstitutionsdatum auf dem Etikett ein (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.

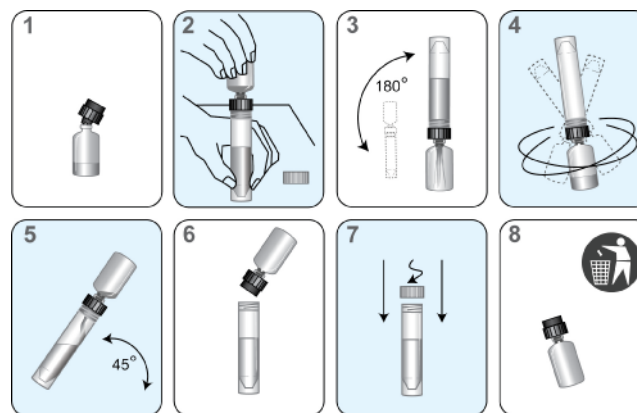


Abbildung 5. Rekonstitution von Reagenzien

D. Reagenzienvorbereitung für bereits vorbereitete Reagenzien

1. Nehmen Sie die bereits vorbereiteten Reagenzien aus der Lagerung (2 °C bis 8 °C).
2. Bereits vorbereitete Amplifikations-, Enzym-, Promotor- und TCR-Reagenzien müssen vor Beginn des Assays auf eine Temperatur von 15 °C bis 30 °C gebracht werden.
3. Bei bereits vorbereiteten TCR führen Sie vor dem Laden auf das System den Schritt C.1 oben durch.
4. Vor dem Laden auf das System müssen Amplifikations-, Enzym- und Promotorreagenzien zum gründlichen Mischen geschwenkt und umgedreht werden. Beim Umdrehen von Reagenzien übermäßige Schaumbildung vermeiden.

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

E. Probenhandhabung

1. Vergewissern Sie sich, dass gefrorene Patientenproben ganz aufgetaut sind. Mischen Sie die aufgetauten Patientenproben gründlich 3 bis 5 Sekunden auf dem Vortexer.
2. Bringen Sie die Patientenproben vor der Verarbeitung auf eine Temperatur von 15 °C bis 30 °C. Siehe *Im Panther System gelagerte Proben* für zusätzliche Informationen zu im System gelagerten Proben.
3. Vergewissern Sie sich, dass jedes primäre Entnahmeröhrchen mindestens 1200 µl Patientenprobe enthält. Vergewissern Sie sich, dass jedes Aptima Probenaliquotröhrchen (Specimen Aliquot Tube, SAT) mindestens 700 µl Patientenprobe enthält. Falls eine Verdünnung der Patientenprobe erforderlich ist, siehe Schritt E.6 unten für zusätzliche Informationen.
4. Mischen Sie die Patientenproben in SATs gründlich 3 bis 5 Sekunden auf dem Vortexer.
5. Zentrifugieren Sie jede Patientenprobe unmittelbar vor dem Laden in einen Probenständer 10 Minuten bei 1000 bis 3000g. Nehmen Sie nicht die Deckel ab. Luftbläschen im Röhrchen stören die Füllstandsmessung des Panther Systems.
Für Informationen zum Laden des Ständers und zum Abnehmen der Deckel siehe *Vorbereitung des Systems*, Schritt F.2 nachstehend.

6. Verdünnen einer Plasma- oder Serumprobe im SAT

Eine Plasmaprobe kann für die Analyse auf dem Panther System im SAT verdünnt werden.

- ⚠ Wenn überhaupt, so ist eine Verdünnung von Proben nur für quantitative Ergebnisse erforderlich. Für diagnostische Ergebnisse dürfen Proben nicht verdünnt werden.

Hinweis: Wenn eine Patientenprobe verdünnt wird, ist sie unmittelbar nach der Verdünnung zu testen.

a. Verdünnung von Proben, die in kleinen Voluminen vorliegen

Das Volumen von Plasmaproben kann mit dem Aptima Probenverdünner auf das erforderliche Mindestvolumen (700 µl) erhöht werden. Patientenproben mit mindestens 240 µl können mit zwei Teilen Probenverdünner (1:3) folgenderweise verdünnt werden:

- i. Geben Sie 240 µl Patientenprobe in das SAT.
- ii. Geben Sie 480 µl Probenverdünner hinzu.
- iii. Verschließen Sie das Röhrchen.
- iv. Drehen Sie es vorsichtig 5 Mal um, um den Inhalt zu mischen.

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

b. Verdünnung hochtitriger Proben

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

- i. Geben Sie 30 µl Patientenprobe in das SAT.
- ii. Geben Sie 2970 µl Probenverdünner hinzu.
- iii. Verschließen Sie das Röhrchen.
- iv. Drehen Sie es vorsichtig 5 Mal um, um den Inhalt zu mischen.

Patientenproben, die 1:100 verdünnt worden sind, können mit der 1:100-Option auf dem Panther System getestet werden (weitere Informationen finden Sie im *Panther System Operator's Manual* [Bedienungsanleitung für das Panther System]). Die Software gibt automatisch das Ergebnis für die unverdünnte Probe aus, 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.

F. Vorbereitung des Systems

1. Richten Sie das System entsprechend den Anweisungen im *Panther System Operator's Manual* (Bedienungsanleitung für das Panther System) und unter *Verfahrenshinweise ein*. Achten Sie darauf, dass Reagenzienstände und TCR-Adapter geeigneter Größe verwendet werden.
2. Laden Sie Proben in den Probenständer. Führen Sie für jedes Probenröhrchen (Patientenproben und ggf. Kalibrator und Kontrollen) die folgenden Schritte durch:
 - a. Lösen Sie den Deckel eines Probenröhrchens, aber nehmen Sie ihn noch nicht ab.

Hinweis: Achten Sie besonders darauf, eine Kontamination durch Aerosolausbreitung zu vermeiden. Lösen Sie vorsichtig die Deckel der Proben.
 - b. Laden Sie das Probenröhrchen in den Probenständer.
 - c. Wiederholen Sie die Schritte 2.a und 2.b für jede verbleibende Probe.
 - d. Wenn die Proben in den Probenständer geladen sind, nehmen Sie den Deckel von jedem Probenröhrchen ab und entsorgen Sie sie in einen Probenständer. Führen Sie die Deckel zur Vermeidung von Kontamination nicht über einen Probenständer oder ein Probenröhrchen.
 - 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: Sichern Sie bei gleichzeitiger Analyse anderer Assays und Probentypen den Probenhalter, bevor Sie den Probenständer in ein Probenfach laden.

- g. Wiederholen Sie die Schritte 2.a bis 2.f für den nächsten Probenständer.

Verfahrenshinweise

A. Kalibrator und Kontrollen

1. Der qHCV Positivkalibrator, die Röhren mit der schwach positiven, der stark positiven und der negativen qHCV-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 folgenden beiden Bedingungen erfüllt ist:
 - a. Der Kalibrator und die Kontrollen werden derzeit vom System verarbeitet.
 - b. Gültige Ergebnisse für den Kalibrator und die Kontrollen werden auf dem System registriert.
2. Sobald der Kalibrator und die Röhren mit den Kontrollen pipettiert worden sind und mit dem Aptima HCV Quant Dx 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 Assayreagenzien-Kit wird aus dem System genommen.
 - c. Das zugehörige Assayreagenzien-Kit hat die Stabilitätsgrenze überschritten.
3. Das Kalibrator- und alle Kontrollenröhren können einmal verwendet werden. Wenn versucht wird, mehr als einmal aus dem Röhren zu pipettieren, kann es zu Verarbeitungsfehlern kommen.

B. Handschuhpuder

Wie in jedem Reagenzsystem kann übermäßiger Puder auf manchen Handschuhen eine Kontamination geöffneter Röhren 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, anwenderbezogene oder gerätebezogene Probleme auftreten und dokumentiert werden. In diesem Fall müssen die Proben erneut getestet werden.

Assay-Kalibrierung

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

Während der Verarbeitung werden Kriterien für die Annahme des Kalibrators 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 erklärten 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 Kontrolle muss jedes Mal, wenn ein Reagenzien-Kit auf das Panther System geladen wird, getestet werden. Sobald dies erfolgt ist, 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. Wenn das Ergebnis für eine der Kontrollen ungültig ist, erklärt die Software den Lauf automatisch für ungültig. Proben eines für ungültig erklärten 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-Akzeptanzkriterien 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 Software für das Panther System dient zur genauen Verifizierung der Prozesse, wenn Verfahren gemäß den Anweisungen in der Packungsbeilage und im *Panther System Operator's Manual* (Bedienungsanleitung für das Panther System) durchgeführt werden.

Interpretation der Ergebnisse

Das Panther System bestimmt die Konzentration der HCV-RNA in Patientenproben und Kontrolle automatisch, indem es die Ergebnisse mit einer Kalibrationskurve vergleicht. HCV-RNA-Konzentrationen werden in IU/ml und Log_{10} IU/ml angegeben. In Tabelle 1 ist die Ergebnisauswertung gezeigt. Wenn Patientenproben mit 1:3 oder 1:100 verdünnt worden sind, berechnet das Panther System automatisch die HCV-Konzentration für die unverdünnte Patientenprobe, indem die verdünnte Konzentration mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert werden. 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 knapp über, aber nahe beim LoD bzw. LLoQ (Nachweisgrenze bzw. untere Quantifizierungsgrenze) verdünnt wird. Es wird empfohlen, eine andere unverdünnte Patientenprobe zu entnehmen und zu testen, wenn kein quantitatives Ergebnis erhalten wird.

Das Panther System liefert kein qualitatives Ergebnis (d.h. „Reaktiv“ oder „Nicht-reaktiv“) für die diagnostische Anwendung. Der Anwender muss die angegebene HCV-RNA-Konzentration selbst zu einem qualitativen Ergebnis interpretieren (Tabelle 1).

Patientenproben mit einem Ergebnis „Nicht nachgewiesen“ sind nicht-reaktiv auf HCV-RNA. Patientenproben mit einem Ergebnis „< 10 nachgewiesen“, mit einem Ergebnis innerhalb des linearen Bereichs und einem Ergebnis von $> 100.000.000$ (obere Quantifizierungsgrenze) bedeuten, dass HCV-RNA nachgewiesen wurde und dass diese Patientenproben auf HCV-RNA reaktiv sind.

Tabelle 1: Ergebnisauswertung.

Angegebenes Aptima HCV Quant Dx-Ergebnis		Auswertung der HCV-RNA-Konzentration	Diagnostische qualitative Auswertung des Anwenders ^a
IU/ml	Log_{10} Wert ^b		
Nicht nachgewiesen	Nicht nachgewiesen	Keine HCV-RNA nachgewiesen.	Nicht reaktiv auf HCV-RNA
< 10 nachgewiesen	< 1,00	Es wird HCV-RNA nachgewiesen, aber unterhalb der unteren Quantifizierungsgrenze (Lower Limit of Quantitation, LLoQ).	Reaktiv auf HCV-RNA
10 bis 100.000.000	1,00 bis 8,00	Die HCV-RNA-Konzentration liegt im linearen Bereich von 10 bis 100.000.000 IU/ml	Reaktiv auf HCV-RNA
> 100.000.000	> 8,00	Die HCV-RNA-Konzentration liegt über der oberen Quantifizierungsgrenze (Upper Limit of Quantitation, ULoQ).	Reaktiv auf HCV-RNA
Ungültig ^c	Ungültig ^c	Es gab einen Fehler bei der Erzeugung des Ergebnisses. Die Patientenprobe sollte noch einmal getestet werden.	Ungültig

^a Eine diagnostische Auswertung kann ausgehend von unverdünnten Serum- oder Plasmaproben erfolgen.

^b Wert ist auf zwei Dezimalstellen gekürzt.

^c Ungültige Ergebnisse sind in blauer Schrift angezeigt.

Einschränkungen

- A. Dieser Test darf nur von 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 Adäquanz der Entnahme, des Transports, der Lagerung und der Verarbeitung der Patientenproben ab.

Leistungsdaten

Nachweisgrenze (LoD) mit dem 2. internationalen WHO-Standard

Die Nachweisgrenze (Limit of Detection, LoD) des Assays ist definiert als die HCV-RNA-Konzentration, die gemäß CLSI EP17-A2 mit einer Wahrscheinlichkeit von mindestens 95% festgestellt wird.¹⁹

Die LoD wurde durch Testung von Panels des 2. internationalen WHO-Standards für Hepatitis C Virus-RNA (NIBSC 96/798, Genotyp 1), verdünnt in HCV-negativem Humanplasma und Serum, bestimmt. Es wurden mindestens 36 Replikate jeder Verdünnung mit jeder der drei Reagenzienchargen getestet, d.h. mindestens 108 Replikate pro Verdünnung. Zur Generierung der vorhergesagten Nachweisgrenzen wurde eine Probit-Analyse durchgeführt. Bei den in Tabelle 2 dargestellten LoD-Werten handelt es sich um die Ergebnisse der Reagenzienchargen mit der höchsten vorhergesagten Nachweisgrenze. Die LoD für den Aptima HCV Quant Dx Assay bei Verwendung des 2. internationalen WHO-Standards für beträgt 4,3 IU/ml für Plasma und 3,9 IU/ml für Serum.

Tabelle 2: Nachweisgrenze bei Verwendung des 2. internationalen WHO-Standards für HCV

Vorhergesagte Nachweisgrenze	Konzentration (IU/ml)	
	Plasma	Serum
10%	0,3	0,3
20%	0,4	0,5
30%	0,5	0,6
40%	0,7	0,8
50%	0,9	1,0
60%	1,1	1,2
70%	1,5	1,5
80%	2,0	2,0
90%	3,0	2,9
95%	4,3	3,9

Nachweisgrenze bei HCV-Genotypen

Die LoD wurde durch Testung der Verdünnungen von HCV-positiven klinischen Patientenproben für die Genotypen 1, 2, 3, 4, 5 und 6 in HCV-negativem Humanplasma und Serum bestimmt. Die Konzentrationen wurden über einen Vergleichsassay mit CE-Kennzeichnung bestimmt. Es wurden mindestens 20 Replikate jeder Panelprobe mit jeder der drei Reagenzienchargen getestet, was mindestens 60 Replikate pro Panelprobe ergibt. Zur Aufstellung der vorhergesagten 50%- und 95%-Nachweisgrenzen wurde eine Probit-Analyse durchgeführt. Bei den in Tabelle 3 dargestellten LoD-Werten handelt es sich um die Ergebnisse der Reagenzienchargen mit der höchsten vorhergesagten Nachweisgrenze.

Tabelle 3: Nachweisgrenze bei HCV-Genotypen bei Verwendung klinischer Patientenproben

Genotyp	Vorhergesagte Nachweisgrenze	Konzentration (IU/ml)	
		Plasma	Serum
1	50%	0,8	1,3
	95%	3,8	5,1
2	50%	1,0	1,1
	95%	2,8	4,0
3	50%	1,1	1,0
	95%	4,3	3,4
4	50%	1,3	0,7
	95%	4,8	2,3
5	50%	0,8	0,9
	95%	2,1	3,2
6	50%	0,6	0,9
	95%	3,9	3,9

Linearer Bereich

Der lineare Bereich wurde durch Testung von Panels, bestehend aus in HCV-negativem Humanplasma und Serum verdünnter HCV-Armored RNA, gemäß CLSI EP06-A bestimmt.²⁰ Die Konzentration der Panels lag im Bereich von 1,0 Log IU/ml bis 8,2 Log IU/ml. Der Aptima HCV Quant Dx Assay zeigte im gesamten Testbereich Linearität, mit einer oberen Quantifizierungsgrenze (Upper Limit of Quantitation, ULoQ) von 8,0 Log IU/ml (Abbildung 6).

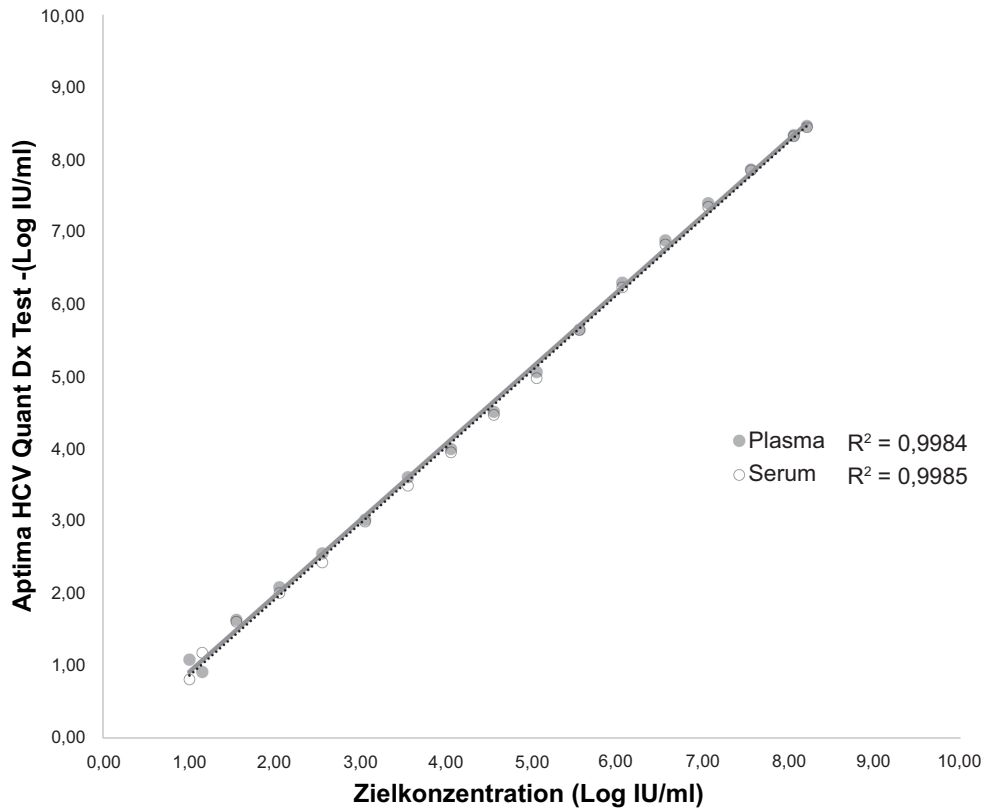


Abbildung 6. Linearität in Plasma und Serum

Linearität bei HCV-Genotypen

Die lineare Reaktion für die Genotypen 1, 2, 3, 4, 5 und 6 wurde durch Testung von pufferverdünnten HCV-Transkript-Panels im Konzentrationsbereich von 1,36 Log IU/ml bis 7,36 Log IU/ml bestätigt. Die Tests erfolgten auf drei Panther Systemen mit drei Reagenzchargen. Über den gesamten Testbereich wurde Linearität für alle getesteten Genotypen aufgezeigt (Abbildung 7).

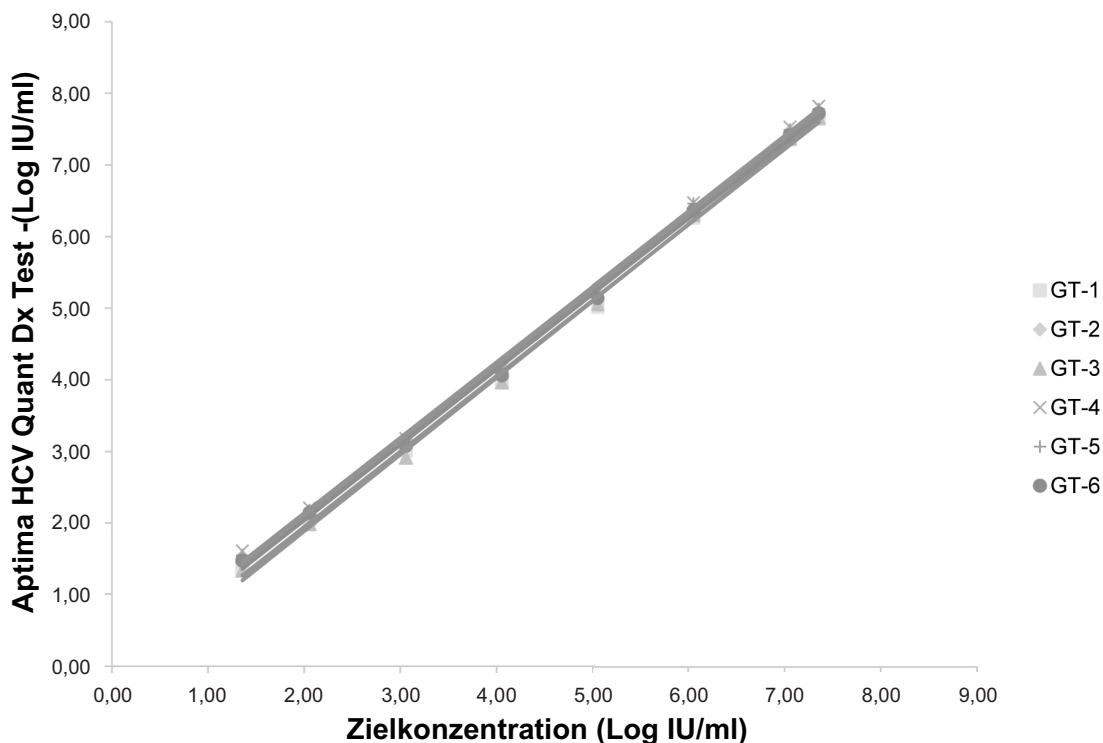


Abbildung 7. Linearität bei HCV-Genotypen 1 bis 6

Untere Quantifizierungsgrenze mit dem 2. internationalen WHO-Standard

Die untere Quantifizierungsgrenze (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) ist definiert als die niedrigste Konzentration, bei der HCV-RNA innerhalb eines Gesamtfehlers (Total Error, TE) zuverlässig gemäß CLSI EP17-A2 quantifiziert werden kann.¹⁹ Der Total Error wurde mit zwei Methoden ermittelt: Total Analytical Error (TAE) = |Bias| + 2SD, und Total Error (TE) = $\text{SQRT}(2) \times 2\text{SD}$. Zur Sicherstellung der Genauigkeit und Präzision der Messungen wurde der TE des Aptima HCV Quant Dx Assays auf 1 Log IU/ml festgesetzt (d.h. an der LLOQ ist der Unterschied zwischen zwei Messungen von mehr als 1 Log IU/ml statistisch signifikant).

Die LLoQ wurde durch Testung von Panels des 2. internationalen WHO-Standards für Hepatitis-C-Virus-RNA (NIBSC 96/798, Genotyp 1), verdünnt in HCV-negativem Humanplasma und Serum, bestimmt. Es wurden mindestens 36 Replikate jeder Verdünnung mit jeder der drei Reagenzienchargen getestet, d.h. mindestens 108 Replikate pro Verdünnung. Die Ergebnisse der Reagenzcharge mit der höchsten Konzentration größer oder gleich der Nachweisgrenze, welche die Anforderungen an TE und TAE erfüllen, sind in Tabelle 4 für Plasma und in Tabelle 5 für Serum dargestellt. Die LLoQ für den 2. internationalen WHO-Standard beträgt 7 IU/ml (0,82 Log IU/ml) für Plasma und 9 IU/ml (0,93 Log IU/ml) für Serum (Tabelle 6). Die LLoQ wurde für alle Genotypen ermittelt (siehe nächster Abschnitt „Bestimmung der unteren Quantifizierungsgrenze bei HCV-Genotypen“). Aus den Genotyp-Daten ergibt sich für den Assay eine untere Quantifizierungsgrenze von 10 IU/ml.

Tabelle 4: LLoQ bei Verwendung des 2. internationalen WHO-Standards für in Plasma verdünnte HCV

Reagenz-charge	Target-Konzentration	Target-Konzentration	Aptima HCV Quant Dx	SD	Abweichung	Berechneter TE	Berechneter TAE
	(IU/ml)	(Log IU/ml)	(Log IU/ml)	(Log IU/ml)	(Log IU/ml)	(Log IU/ml)	(Log IU/ml)
1	3	0,48	0,53	0,30	0,05	0,85	0,65
	6	0,78	0,73	0,31	-0,04	0,88	0,67
	8	0,90	1,08	0,23	0,18	0,65	0,64
2	3	0,48	0,37	0,32	-0,11	0,92	0,75
	6	0,78	0,82	0,27	0,04	0,78	0,59
	8	0,90	0,96	0,26	0,06	0,74	0,58
3	3	0,48	0,46	0,25	-0,01	0,71	0,52
	6	0,78	0,76	0,34	-0,02	0,95	0,69
	8	0,90	0,89	0,26	-0,01	0,73	0,53

SD = Standardabweichung

Tabelle 5: LLoQ bei Verwendung des 2. internationalen WHO-Standards für in Serum verdünnte HCV

Reagenz-charge	Target-Konzentration	Target-Konzentration	Aptima HCV Quant Dx	SD	Abweichung	Berechneter TE	Berechneter TAE
	(IU/ml)	(Log IU/ml)	(Log IU/ml)	(Log IU/ml)	(Log IU/ml)	(Log IU/ml)	(Log IU/ml)
1	3	0,48	0,65	0,33	0,17	0,94	0,84
	6	0,78	0,93	0,32	0,15	0,90	0,79
	8	0,90	1,08	0,28	0,18	0,80	0,74
2	3	0,48	0,52	0,36	0,04	1,02	0,76
	6	0,78	0,89	0,32	0,11	0,90	0,75
	8	0,90	1,01	0,21	0,11	0,60	0,53
3	3	0,48	0,47	0,39	-0,01	1,11	0,79
	6	0,78	0,71	0,30	-0,06	0,86	0,67
	8	0,90	0,95	0,29	0,05	0,83	0,63

SD = Standardabweichung

Tabelle 6: Zusammenfassung der LLoQ mit dem 2. internationalen WHO-Standard für HCV

Reagenzcharge	LLoQ Plasma		LLoQ Serum	
	(Log IU/ml)	(IU/ml)	(Log IU/ml)	(IU/ml)
1	0,73	5	0,93	9
2	0,82	7	0,89	8
3	0,76	6	0,71	5

Bestimmung der unteren Quantifizierungsgrenze bei HCV-Genotypen

Die untere Quantifizierungsgrenze (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) wurde durch Testung der Verdünnungen von HCV-positiven klinischen Patientenproben für die Genotypen 1, 2, 3, 4, 5 und 6 in HCV-negativem Humanplasma und Serum bestimmt. Die Bestimmung der Konzentration von klinischen Patientenproben wurde über einen Vergleichsassay mit CE-Kennzeichnung bestimmt. Es wurden mindestens 36 Replikate jeder Panelprobe mit jeder der drei Reagenzchargen getestet, was mindestens 108 Replikate pro Panelprobe ergibt. Die Ergebnisse der Reagenzcharge mit der höchsten Konzentration größer oder gleich der Nachweisgrenze, welche die Anforderungen an TE und TAE erfüllen, sind in Tabelle 7 für Plasma und Tabelle 8 für Serum dargestellt. Die LLoQ für die Genotypen 1 bis 6 in Plasma und Serum sind in Tabelle 9 zusammengefasst. Hierdurch wurde der Gesamt-LLoQ für den Assay auf 10 IU/ml festgelegt.

Tabelle 7: Bestimmung der LLoQ bei Genotypen in Plasma

Genotyp	Target-Konzentration	Target-Konzentration	Aptima HCV Quant Dx	SD	Abweichung	Berechneter TE	Berechneter TAE
	(IU/ml)	(Log IU/ml)	(Log IU/ml)	(Log IU/ml)	(Log IU/ml)	(Log IU/ml)	(Log IU/ml)
1	3	0,48	0,65	0,38	0,17	1,08	0,94
	6	0,78	0,88	0,35	0,11	1,00	0,82
	8	0,90	0,99	0,24	0,09	0,68	0,56
2	3	0,48	0,63	0,40	0,16	1,13	0,95
	4	0,60	0,76	0,29	0,15	0,81	0,73
	6	0,78	1,12	0,30	0,34	0,86	0,94
3	6	0,78	0,52	0,30	-0,26	0,85	0,86
	10	1,00	0,80	0,21	-0,20	0,59	0,62
	12	1,08	0,89	0,26	-0,19	0,74	0,71
4	8	0,90	0,61	0,39	-0,29	1,11	1,07
	10	1,00	0,82	0,31	-0,18	0,87	0,80
	12	1,08	1,01	0,29	-0,07	0,83	0,65
5	3	0,48	0,57	0,37	0,10	1,06	0,85
	6	0,78	0,87	0,31	0,09	0,89	0,72
	10	1,00	1,15	0,16	0,15	0,44	0,46
6	2	0,30	0,66	0,36	0,36	1,02	1,08
	3	0,48	0,79	0,28	0,31	0,80	0,87
	6	0,78	1,14	0,26	0,36	0,74	0,89

SD = Standardabweichung

Tabelle 8: Bestimmung der LLoQ bei Genotypen in Serum

Genotyp	Target-Konzentration	Target-Konzentration	Aptima HCV Quant Dx	SD	Abweichung	Berechneter TE	Berechneter TAE
	(IU/ml)	(Log IU/ml)	(Log IU/ml)	(Log IU/ml)	(Log IU/ml)	(Log IU/ml)	(Log IU/ml)
1	6	0,78	0,75	0,36	-0,03	1,02	0,75
	8	0,90	0,88	0,32	-0,02	0,89	0,65
	10	1,00	1,04	0,29	0,04	0,81	0,61
2	3	0,48	0,48	0,35	0,00	0,99	0,70
	6	0,78	0,80	0,31	0,02	0,86	0,63
	10	1,00	1,04	0,25	0,04	0,72	0,54
3	6	0,78	0,45	0,25	-0,33	0,72	0,84
	10	1,00	0,67	0,22	-0,33	0,63	0,78
	12	1,08	0,92	0,19	-0,16	0,54	0,54
4	1	0,00	0,19	0,27	0,19	0,77	0,73
	2	0,30	0,65	0,32	0,35	0,91	0,99
	3	0,48	0,65	0,34	0,17	0,96	0,85
5	3	0,46	0,48	0,37	0,02	1,04	0,76
	6	0,76	0,72	0,29	-0,04	0,81	0,61
	9	0,94	1,04	0,27	0,10	0,77	0,65
6	3	0,48	0,58	0,37	0,11	1,04	0,84
	6	0,78	0,99	0,22	0,21	0,61	0,64
	10	1,00	1,25	0,22	0,25	0,63	0,70

SD = Standardabweichung

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

HCV-Genotyp	LLoQ Plasma		LLoQ Serum	
	(Log IU/ml)	(IU/ml)	(Log IU/ml)	(IU/ml)
1	0,88	8	0,88	8
2	0,76	6	0,80	6
3	0,80	6	0,67	5
4	0,82	7	0,65	4
5	0,87	7	0,72	5
6	0,79	6	0,99	10

Präzision

Zur Beurteilung der Präzision wurde ein 10 Proben umfassendes Panel erstellt, indem HCV-positive klinische Patientenproben verdünnt oder HCV-negatives Plasma und Serum mit Armored RNA versetzt wurde. Das Panel wurde von drei Anwendern mit drei Reagenzchargen auf drei Panther Systemen in einem Zeitraum von 21 Tagen getestet.

Tabelle 10 zeigt die Präzision der Assay-Ergebnisse (in Log IU/ml) zwischen Geräten, zwischen Anwendern, zwischen Chargen, zwischen Durchläufen, innerhalb von Durchläufen und gesamt. Die Gesamtvariabilität betrug $\leq 13,31\%$ bei allen Panelproben, hauptsächlich aufgrund der Variabilität zwischen den Durchläufen (d.h. Zufallsfehlern).

Tabelle 10: Präzision des Aptima HCV Quant Dx Assays

Matrix	N	Mittlere Konzentration (Log IU/ml)	Zwischen Geräten		Zwischen Anwendern		Zwischen Chargen		Zwischen Durchläufen		Innerhalb von Durchläufen		Gesamt	
			SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)
Plasma	98 ^a	1,23	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	3,35	0,06	4,54	0,12	9,84	0,14	11,34
Plasma	162	2,06	0,05	2,23	0,00	0,00	0,07	3,20	0,03	1,47	0,10	4,91	0,14	6,88
Plasma	162	3,02	0,03	0,89	0,01	0,24	0,04	1,47	0,01	0,33	0,09	3,08	0,11	3,77
Plasma	162	4,87	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,60	0,04	0,86	0,06	1,13	0,10	2,04
Plasma	162	7,16	0,02	0,21	0,01	0,20	0,04	0,52	0,00	0,00	0,05	0,75	0,09	1,27
Serum	132 ^a	1,27	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07	5,16	0,00	0,00	0,15	12,17	0,17	13,31
Serum	162	2,17	0,02	0,99	0,04	1,71	0,07	3,01	0,05	2,15	0,08	3,53	0,12	5,61
Serum	162	3,09	0,02	0,67	0,00	0,00	0,06	1,79	0,03	0,90	0,07	2,26	0,11	3,44
Serum	161	4,86	0,00	0,00	0,04	0,78	0,08	1,67	0,00	0,00	0,08	1,72	0,13	2,65
Serum	162	7,16	0,00	0,00	0,05	0,70	0,05	0,73	0,02	0,31	0,04	0,55	0,10	1,35

CV = Variationskoeffizient, SD=Standardabweichung

^a Anzahl gültiger Ergebnisse innerhalb des linearen Bereichs des Assay.

Hinweis: Die Variabilität aufgrund von manchen Faktoren kann numerisch negativ sein, und zwar dann, wenn die Variabilität aufgrund dieser Faktoren sehr klein ist. In diesem Fall gilt SD und CV gleich 0.

Substanzen mit möglicher beeinträchtigender Wirkung

Es wurde die Anfälligkeit des Aptima HCV Quant Dx Assays gegenüber Interferenzen durch erhöhte Konzentrationen endogener Stoffe und von Wirkstoffen, die HCV-Infizierten häufig verordnet werden, evaluiert. Es wurden HCV-negative Plasmaproben und Proben verwendet, die bis zu einer Konzentration von 3,3 Log IU/ml von HCV-RNA mit HCV versetzt worden waren.

Bei Vorhandensein von Albumin (90 mg/ml), Hämoglobin (5 mg/ml), Triglyzeriden (30 mg/ml) oder unkonjugiertem Bilirubin (0,2 mg/ml) wurde keine Interferenz der Leistung des Assays festgestellt.

Klinische Plasmaproben von Patienten mit erhöhten Konzentrationen definierter Stoffe oder von Patienten mit den in Tabelle 11 gelisteten Krankheiten wurden mit dem Aptima HCV Quant Dx Assay getestet. Es wurde keine Interferenz der Assay-Leistung beobachtet.

Tabelle 11: Getestete Typen klinischer Patientenproben

Typen klinischer Patientenproben	
1	Rheumafaktor (RF)
2	Anti-Kern-Antikörper (ANA)
3	Anti-Jo-1-Antikörper (JO-1)
4	Systemischer Lupus erythematoses (SLE)
5	Rheumatoide Arthritis (RA)
6	Multiple Sklerose (MS)
7	Hyperglobulinämie
8	Erhöhte Alaninaminotransferase (ALT)
9	Aspartat-Aminotransferase (AST)
10	Alkoholbedingte Zirrhose (AC)
11	Multiple Myelom (MM)
12	Lipämisch (erhöhte Lipide)
13	Ikterisch (erhöhtes Bilirubin)
14	Hämolytisch (erhöhtes Hämoglobin)
15	Erhöhtes Proteinalbumin
16	HBV-Antikörper
17	HIV-1-Antikörper
18	HIV-2-Antikörper

Bei Vorhandensein der in Tabelle 12 gelisteten exogenen Stoffe in Konzentrationen vom mindestens Dreifachen der C_{max} (Humanplasma) wurde keine Interferenz der Leistung des Assays festgestellt.

Tabelle 12: Exogene Stoffe

Pool von exogenen Stoffen	Getestete exogene Stoffe
1	Telaprevir, Clarithromycin, Interferon alpha-2a, Dolutegravir, Azithromycin
2	Simeprevir, Sofosbuvir
3	Efavirenz, Boceprevir, pegyliertes Interferon alpha-2b, Emtricitabin, Raltegravir, Amoxicillin
4	Abacavirsulfat, Ribavirin, Dasabuvir, Rilpivirin, Rifampin/Rifampicin
5	Lopinavir, Tenofovir, Lamivudin, Valganciclovir
6	Heparin, EDTA, Natriumcitrat

Spezifität

Die Spezifität wurde mithilfe von 198 frischen und 538 gefrorenen HCV-negativen klinischen Proben bestimmt. Insgesamt wurden 370 Plasma- und 366 Serumproben getestet. Die Spezifität wurde als Prozentsatz der HCV-negativen Proben mit einem Ergebnis „nicht nachgewiesen“ berechnet. HCV-RNA wurde nicht in allen 736 Proben nachgewiesen. Die Spezifität lag bei 100% (736/736, 95% KI: 99,6 -100%).

Tabelle 13: Spezifität in klinischen Plasma- und Serumproben

	Frisches Plasma	Gefrorenes Plasma	Gesamtplasma	Frisches Serum	Gefrorenes Serum	Gesamtserum	Kombiniert
Gültige Replikate (n)	100	270	370	98	268	366	736
Nicht nachgewiesen	100	270	370	98	268	366	736
Spezifität % (95%-KI)	100% (97,1-100)	100% (98,9-100)	100% (99,2-100)	100% (97,0-100)	100% (98,9-100)	100% (99,2-100)	100% (99,6-100)

KI=Konfidenzintervall

Analytische Spezifität

Die mögliche Kreuzreaktivität auf Erreger (Tabelle 14) wurde mit oder ohne 3,3 Log IU/ml von HCV in HCV-negativem Humanplasma evaluiert. Es wurde keine Kreuzreaktivität festgestellt. Bei Gegenwart der Erreger wurde keine Interferenz festgestellt.

Tabelle 14: Zur Ermittlung der Analysespezifität getestete Erreger

Erreger	Konzentration		Erreger	Konzentration	
Hepatitis-A-Virus	100.000	Kopien/ml	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	1.000.000	KBE/ml ^f
Hepatitis-B-Virus (HBV)	100.000	IU/ml ^a	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1.000.000	KBE/ml
Hepatitis-G-Virus	1.470	PBE/ml ^b	<i>Staphylococcus aureus</i>	1.000.000	KBE/ml
HIV-1	100.000	Kopien/ml	<i>Propionibacterium acnes</i>	1.000.000	KBE/ml
HIV-2	100.000	PBE/mlml	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1.000.000	KBE/ml
Herpes-simplex-Virus Typ 1 (HSV-1)	100.000	PBE/ml	<i>Candida albicans</i>	1.000.000	KBE/ml
Herpes-simplex-Virus Typ 2 (HSV-2)	100.000	PBE/ml	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1.000.000	KBE/ml
Humanes Herpesvirus 6B	100.000	Kopien/ml	<i>Chlamydia trachomatis</i>	1.000.000	IFU/ml ^g
Humanes Herpesvirus 8	2.667	TCID50 E/ml ^c	<i>Trichomonas vaginalis</i>	1.000.000	Zellen/ml
Humanes T-Zell-lymphotropes Virus Typ 1 (HTLV-1)	100.000	vp/ml ^d			
Humanes T-Zell-lymphotropes Virus Typ 2 (HTLV-2)	100.000	vp/ml			
Parvovirus B19	100.000	IU/ml			
West Nil-Virus	100.000	PBE/ml			
Dengue-Virus 1	100.000	PBE/ml			
Dengue-Virus 2	100.000	PBE/ml			
Dengue-Virus 3	100.000	PBE/ml			
Dengue-Virus 4	100.000	PBE/ml			
Cytomegalovirus	100.000	PBE/ml			
Epstein-Barr-Virus	100.000	Kopien/ml			
Rötelnvirus	100.000	PBE/ml			
Humanes Papillomvirus	100.000	Zellen/ml			
Adenovirus Typ 5	100.000	TCID50 U/ml			
Influenza A-Virus	100.000	TCID50 U/ml			
Japanische Enzephalitis-Virus	NA	NA			
St. Louis-Enzephalitis-Virus	NA	NA			
Murray Valley-Enzephalitis-Virus	2.643	LD/ml ^e			
Gelbfiebertvirus	100.000	Zellen/ml			

^aIU/ml = Internationale Einheiten pro ml

^bPBE/ml = Plaque-bildende Einheiten pro ml

^cTCID50 E/ml = Gewebekultur-Infektionsdosisseinheiten pro ml

^dvp/ml = Viruspartikel pro ml

^eLD/ml = Lethale Dosis pro ml

^fKBE/ml = Kolonie-bildende Einheiten pro ml

^gIFU/ml = Einschlusskörper-bildende Einheiten pro ml

Klinische Proben mit anderen Viren als HCV

Die in Tabelle 15 aufgeführten Erreger wurden anhand von natürlich infizierten klinischen Proben bewertet. Diese wurden mit oder ohne 3,3 Log IU/ml von HCV-RNA getestet. Es wurde keine Kreuzreaktivität festgestellt. Es wurde keine Interferenz festgestellt.

Tabelle 15: Auf analytische Spezifität getestete klinische Proben

Mikroorganismus	Matrix	N (Spender)
HBV	Serum	5
HBV	Plasma	5
Dengue-Virus	Plasma	10
Hepatitis-A-Virus	Plasma	10
HTLV-1	Plasma	10
HTLV-2	Plasma	10
HIV-1	Plasma	10
West Nil-Virus	Plasma	10

Wiederholbarkeit bei klinischen Patientenproben

Die Wiederholbarkeit wurde durch Testung von drei Replikaten natürlich infizierter, klinischer HCV-positiver Plasma- und Serumproben evaluiert. Die Durchschnittskonzentration und die Standardabweichungen für die getesteten Plasma- und Serumproben werden in Tabellen 16 und 17 gezeigt.

Tabelle 16: Wiederholbarkeit bei klinischen Plasmaproben

Plasmaproben-ID	Durchschnitts-konzentration (Log IU/ml)	SD
1	1,68	0,05
2	1,69	0,17
3	1,73	0,06
4	1,73	0,06
5	1,84	0,05
6	2,30	0,10
7	2,71	0,09
8	2,80	0,06
9	3,22	0,04
10	3,80	0,05
11	4,12	0,08
12	4,21	0,11
13	4,90	0,14
14	6,94	0,11
15	7,05	0,04

Tabelle 17: Wiederholbarkeit bei klinischen Serumproben

Serumproben-ID	Durchschnitts-konzentration (Log IU/ml)	SD
1	1,67	0,07
2	1,74	0,10
3	1,86	0,15
4	1,67	0,07
5	2,00	0,07
6	2,51	0,08
7	3,12	0,23
8	3,29	0,02
9	3,70	0,18
10	3,99 ^a	0,13
11	4,35	0,05
12	5,48	0,12
13	5,74	0,07
14	5,80	0,13
15	7,15	0,10

^aErgebnis von zwei aus drei getesteten Replikaten. Ein abweichendes Replikat wurde entfernt.

Probenverdünnung mit Probenverdünner

Zur Beurteilung der HCV-RNA-Wiederherstellung in mit dem Aptima Probenverdünner verdünnten Proben wurden Plasma- und Serumproben im linearen Bereich in einem Verhältnis von 1:3 mit dem Aptima Probenverdünner verdünnt. Außerdem wurden hochtitrige, natürlich infizierte klinische Proben und mit Armored RNA versetzte Proben mit über der ULoQ liegenden Konzentrationen in einem Verhältnis von 1:100 mit dem Aptima Probenverdünner verdünnt. Jede Probe wurde unverdünnt und verdünnt (1:3 oder 1:100) in dreifacher Ausführung getestet. Die Differenz zwischen der angegebenen Durchschnittskonzentration (auf das Ergebnis für die verdünnte Probe angewendeter Verdünnungsfaktor) und der unverdünnten Durchschnittskonzentration werden in Tabelle 18 für Plasma und in Tabelle 19 für Serum aufgeführt. Die Probenkonzentrationen wurden in den verdünnten Proben genau wiederhergestellt.

Tabelle 18: Probenverdünnung mit Aptima Probenverdünner – Plasma

Verdünnung	Durchschnitts- konzentration, unverdünnt (Log IU/ml)	Durchschnitts- konzentration, angegeben ^a (Log IU/ml)	Differenz
1:3	1,68	1,89	-0,21
	1,69	1,69	0,00
	1,73	2,11	-0,38
	1,73	1,78	-0,05
	1,84	1,80	0,04
	2,30	2,23	0,07
	2,71	2,76	-0,05
	2,80	2,76	0,04
	3,22	3,28	-0,06
	3,80	3,71	0,09
	4,12	4,06	0,06
	4,21	4,07	0,14
	4,90	4,68	0,22
	6,94	6,72	0,22
	7,05	6,91	0,14
1:100	7,05	6,59	0,46
	> 8,00 (8,45) ^b	8,38	0,07

^aDie angegebene Konzentration ist der nach Anwendung des Verdünnungsfaktors berechnete Wert.

^bVersetzte Patientenprobe.

Hinweis: Alle Ergebnisse > 8,00 Log IU/ml wurden in einer weiteren Analyse geschätzt.

Tabelle 19: Probenverdünnung mit Aptima Probenverdünner – Serum

Verdünnungsfaktor	Durchschnittskonzentration, unverdünnt	Durchschnittskonzentration, angegeben ^a	Differenz
	(Log IU/ml)	(Log IU/ml)	
1:3	1,67	1,85	-0,18
	1,74	1,72	0,02
	1,86	1,66	0,20
	1,67	1,85	-0,18
	2,00	1,91	0,09
	2,51	2,37	0,14
	3,12	3,01	0,11
	3,29	3,35	-0,06
	3,70	3,53	0,17
	3,99 ^c	3,87	0,12
	4,35	4,30	0,05
	5,48	5,25	0,23
	5,74	5,62	0,12
	5,80	5,50	0,30
1:100	7,15	6,86	0,29
	7,15	6,65	0,50
	> 8,00 (8,44) ^b	8,46	-0,02

^a Die angegebene Konzentration ist der nach Anwendung des Verdünnungsfaktors berechnete Wert.

^b Versetzte Patientenprobe.

^c Ergebnis von zwei aus drei getesteten Replikaten. Ein abweichendes Replikat wurde entfernt.

Hinweis: Alle Ergebnisse > 8,00 Log IU/ml wurden in einer weiteren Analyse geschätzt.

Methodenkorrelation

Die Leistungsdaten des Aptima HCV Quant Dx Assays wurden mit denen eines anderen Assays mit CE-Kennzeichnung verglichen, indem unverdünnte klinische Proben von HCV-infizierten auf drei Panther Systemen mit vier Reagenzchargen getestet wurden. Insgesamt wurden für die lineare Regression 1058 Plasma- und Serumproben (872 Plasmaproben, 186 Serumproben) bei allen HCV-Genotypen im linearen, für beide Assays üblichen Bereich verwendet, wie in Abbildung 8 gezeigt.

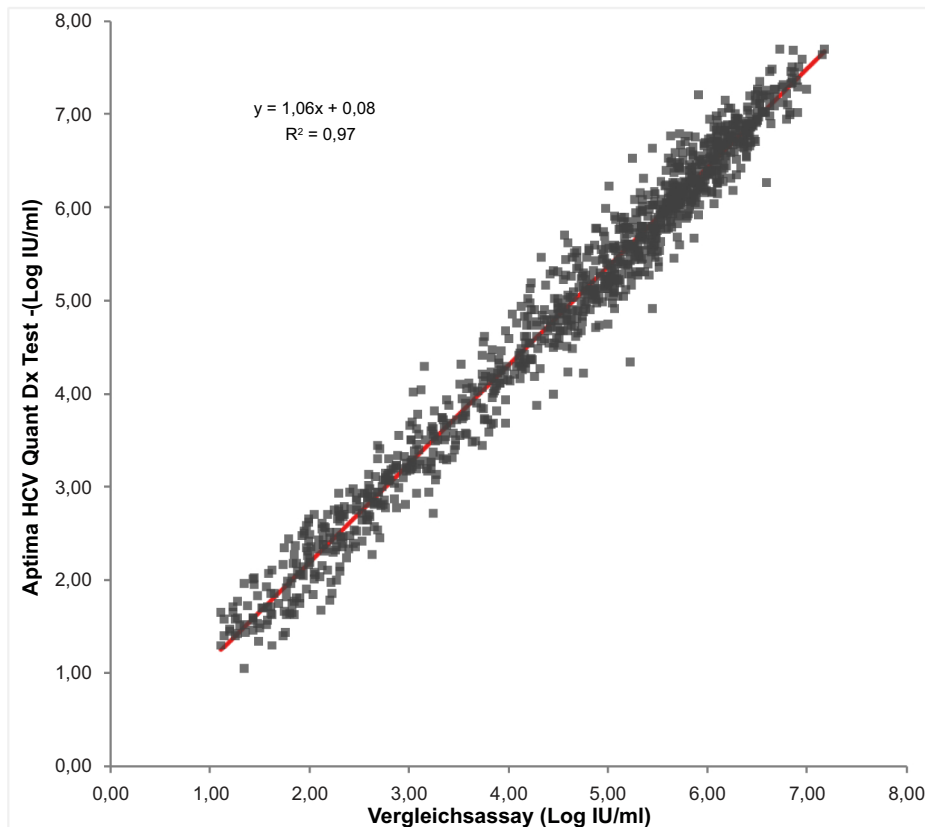


Abbildung 8. Korrelation zwischen dem Aptima HCV Quant Dx Assay und einem Vergleichsassay

Diagnostische Übereinstimmung

Zur Beurteilung der diagnostischen Übereinstimmung wurden 227 Plasma- und Serumproben von HCV-positiven Personen mit dem Aptima HCV Quant Dx Assay und einem qualitativen Vergleichsassay mit CE-Kennzeichnung getestet. Jedes quantifizierbare oder nachweisbare Ergebnis wurde als „Nachgewiesen“ kategorisiert. Jedes Ergebnis mit nicht nachgewiesenem Target wurde als „Target nicht nachgewiesen“ kategorisiert. Die diagnostische Übereinstimmung zwischen den Assays betrug 100%, wie in Tabelle 20 dargestellt.

Tabelle 20: Diagnostische Übereinstimmung zwischen dem Aptima HCV Quant Dx Assay und einem Vergleichsassay

		Aptima HCV Quant Dx Assay	
		Nachgewiesen	Target nicht nachgewiesen
Vergleichsassay	Nachgewiesen	99	0
	Target nicht nachgewiesen	0	128

Verschleppung

Um festzustellen, ob das Panther System das Risiko falsch-positiver Ergebnisse infolge einer verschleppungsbedingten Kontamination minimiert, wurde eine Analysestudie mit mehreren Läufen durchgeführt, bei der versetzte Panels auf drei Panther Systemen getestet wurden. Die Beurteilung der Verschleppung erfolgte anhand von hochtitrigen, mit Armored RNA versetzten Proben (7 Log IU/ml), die im Schachbrettmuster zwischen HCV-negativen Proben verteilt waren. Zur Testung wurden fünfzehn Läufe durchgeführt. Die Gesamtverschleppungsrate betrug 0,14% (1/704).

Serokonversionspanel

Es wurden 11 HCV-Serokonversionspanel-Sets aus insgesamt 72 Proben getestet. Die Ergebnisse des Aptima HCV Quant Dx Assays wurden mit den HCV-Antikörper-Testergebnissen verglichen. Die Anzahl der Tage bis zum ersten reaktiven Ergebnis ist in Tabelle 21 gelistet. Der Aptima HCV Quant Dx Assay wies HCV durchschnittlich 20 Tage vor jedem anderen Antikörpertest nach.

Tabelle 21: Zusammenfassung der Daten mit dem Serokonversionspanel

Panel-ID	Anzahl der getesteten Panelproben	Anzahl der reaktiven Panelproben			Tage bis zum ersten reaktiven Ergebnis			Unterschied bzgl. der Tage bis zum ersten reaktiven Ergebnis (ausgehend vom Datum der Blutentnahme)	
		Aptima HCV Quant Dx	HCV-Antikörper-Test1	HCV-Antikörper-Test2	Aptima HCV Quant Dx	HCV-Antikörper-Test1	HCV-Antikörper-Test2	Tage früher als mit dem HCV-Antikörper-Test1	Tage früher als mit dem HCV-Antikörper-Test2
		PHV911	4	4	3	3 ^a	14	14	11
PHV913	4	4	0	0	9 ^b	7	9	7	
PH919	7	4	3	25	28	28	3	3	
PH920	9	9	7	0 ^c	13	16	13	16	
PH921	11	11	9	0	7	18	7	18	
PH923	6	6	2	0	21	21	21	21	
PH924	6	6	3	0	59	59	59	59	
PH925	5	5	1	0	27	27	27	27	
PH926	5	5	1	0	14	14 ^b	14	14	
6227	7	4	2	42	74	74	32	32	
6229	8	8	4	0	17	20	17	20	
Gesamt	72	66	35	32			Mittelwert	19,36	20,73
							Median	14	18

Test1 auf HCV-Antikörper wurde mit dem Abbott Prism HCV Assay durchgeführt.

Test2 auf HCV-Antikörper wurden mit dem Ortho Enhanced SAVE-Assay durchgeführt, mit folgenden Ausnahmen:

Die Panels 6227 und 6229 wurden mit dem Assay Ortho ELISA Anti-HCV 3.0 getestet.

^a Die erste Blutprobe wurde aufgrund einer Nichtverfügbarkeit der Probe vom Anbieter nicht getestet.

^b Alle Blutproben in diesem Panel waren im HCV-Antikörper-Test nicht-reaktiv. Als Basis für die „Tage bis zum ersten reaktiven Ergebnis“ wurde der letzte Blutentnahmetag verwendet.

^c Die zweite Blutprobe wurde aufgrund einer Nichtverfügbarkeit der Probe vom Anbieter nicht getestet.

Bibliographie

1. Averhoff FM, Glass N and Holtzman D. Global Burden of Hepatitis C: Considerations for Healthcare Providers in the United States. *Clinical Infectious Diseases* 2012; 55 (S1): S10-15.
2. Current and Future Disease Progression of the Chronic HCV Population in the United States (2013) *PLOS ONE* Volume 8: Issue 5; 1-10.
3. Engle RE, Bukh J, Alter HJ et al., <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24797372> Transfusion-associated hepatitis before the screening of blood for hepatitis risk factors. *Transfusion*. 2014 May 5
4. Lee M-H, Yang, H-I, Yuan Y et al., Epidemiology and natural history of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterology* 2014; 20 (28): 9270-9280
5. *Hepatitis C Viruses: Genome and Molecular Biology* (2006); Horizon Biosciences
6. Smith DB, Bukh J, Kuiken C, et al, P. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology*. 2014 Jan;59(1):318-27.
7. EASL Recommendations on treatment of Hepatitis C 2014: www.easl.eu/_clinical-practice-guideline
8. AASLD and the Infectious Diseases Society of America (IDSA), in collaboration with the International Antiviral Society-USA (IAS-USA) 2014: www.hcvguidelines.org
9. CDC. Testing for HCV infection: An update for clinicians and laboratories. *MMWR* 2013; 62 (18)
10. Rutter, K, Hofer H, Beinhardt, S et al., Durability of SVR in chronic hepatitis C patients treated with peginterferon- α 2a/ribavirin in combination with a direct acting antiviral. *Aliment Pharmacol Ther*. 2013 Jul;38(2):118-23.
11. Treatment of Hepatitis C, A Systemic Review (2014) *JAMA* Volume 312: No.6; 631-640.
12. EASL International Consensus Conference on Hepatitis C. Consensus Statement. *J Hepatol* 1999; 30; 956-61
13. NIH Consensus and State-of-the-Science Statements. Management of Hepatitis C: 2002; 19 (3):1-46
14. Peiffer K-H and Sarrazin C. The importance of HCV RNA measurement in tailoring treatment duration: *Digestive and Liver Disease* 45S (2013) S323-S331.
15. **Clinical and Laboratory Standards Institute**. 2005. Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods; Approved Guideline. CLSI Document MM13-A. Wayne, PA.
16. **29 CFR Part 1910.1030**. Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens; current version.
17. **Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health**. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL); current version.
18. **Clinical and Laboratory Standards Institute**. 2002. Clinical Laboratory Waste Management. CLSI Document GP5-A2. Villanova, PA.
19. **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.
20. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)**. 2003. Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline. CLSI document EP06-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.



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

Kundendienst: +1 800 442 9892
customersupport@hologic.com

Technischer Kundendienst: +1 888 484 4747
molecularsupport@hologic.com

Weitere Kontaktinformationen finden Sie unter www.hologic.com.



Hologic N.V.
Da Vincilaan 5
1930 Zaventem
Belgium

Hologic, Aptima und Panther und assoziierte Logos sind Marken oder eingetragene Marken von Hologic, Inc. und/oder seinen Tochterunternehmen in den Vereinigten Staaten und/oder anderen Ländern.

Armored RNA ist eine Marke der Asuragen, Inc.

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

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

© 2015-2018 Hologic, Inc. Alle Rechte vorbehalten.

AW-13249-801 Rev. 004
2018-03