

## Aptima™ HBV Quant Assay

Voor *in-vitro* diagnostiek.

Alleen voor export uit de VS

<b>Algemene informatie</b> .....	<b>2</b>
Beoogd gebruik .....	2
Samenvatting en uitleg van de test .....	2
Uitgangspunten van de procedure .....	3
Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen .....	4
Eisen voor opslag en verwerking van reagentia .....	7
Monsterafname en -opslag .....	7
Monsters in het Panther-systeem .....	11
Vervoer van monsters .....	11
<b>Panther-systeem</b> .....	<b>12</b>
Geleverde reagentia en materialen .....	12
Benodigde maar apart geleverde materialen .....	14
Optionele materialen .....	15
Testprocedure voor het Panther-systeem .....	15
Opmerkingen met betrekking tot de procedure .....	20
<b>Kwaliteitscontrole</b> .....	<b>21</b>
Assaykalibratie .....	21
Negatieve en positieve controles .....	21
Interne kalibrator/interne controle .....	21
<b>Interpretatie van resultaten</b> .....	<b>22</b>
<b>Beperkingen</b> .....	<b>22</b>
<b>Prestaties</b> .....	<b>23</b>
Detectielimiet op basis van de 3e internationale WHO-norm .....	23
Detectielimiet voor alle HBV-genotypen .....	24
Lineair bereik .....	25
Lineariteit voor HBV-genotypen .....	26
Ondergrens voor kwantificering op basis van de 3e internationale WHO-norm .....	26
Bepaling van de ondergrens voor kwantificering (LLoQ) voor alle HBV-genotypen .....	28
Reproduceerbaarheid .....	30
Potentieel storende stoffen .....	32
Specificiteit .....	33
Analytische specificiteit .....	34
Herhaalbaarheid van klinische monsters .....	35
Monsterverdunning met behulp van een monsterverdunningsmiddel .....	36
Correlatie van methoden .....	38
Vermenging .....	38
<b>Literatuur</b> .....	<b>39</b>

## Algemene informatie

### Beoogd gebruik

De Aptima HBV Quant Assay (Aptima HBV Quant test) is een *in-vitro* amplificatietest op basis van nucleïnezuur waarmee de hoeveelheid DNA van het hepatitis B-virus (HBV) in menselijk plasma en serum op het volledig geautomatiseerde Panther™-systeem kan worden gekwantificeerd.

Plasma kan zijn geprepareerd in ethyleendiaminetetra-azijnzuur (EDTA), zuur-citraat-dextrose-oplossing (ACD) en PPT-buizen (Plasma Preparation Tubes). Serum kan zijn geprepareerd in serumbuizen en in SST-buizen (serumseparatorbuizen). De monsters worden met het volledig geautomatiseerde Panther-systeem onderzocht voor geautomatiseerde verwerking, amplificatie en kwantificering. Monsters die de HBV-genotypen A, B, C, D, E, F, G en H bevatten, worden in de test gevalideerd voor kwantificering.

De Aptima HBV Quant Assay is bestemd voor gebruik als hulpmiddel bij de behandeling van patiënten met chronische HBV-infecties die met antivirale medicijnen tegen HBV worden behandeld. Deze assay kan worden gebruikt om de HBV DNA-niveaus bij de start van en tijdens de behandeling te meten en zo de virale respons op de behandeling te helpen beoordelen. De resultaten van de Aptima HBV Quant Assay moeten binnen de context van alle relevante klinische en laboratoriumuitslagen worden geïnterpreteerd.

De Aptima HBV Quant Assay mag niet worden gebruikt als een screeningtest in bloed of bloedproducten voor HBV of als een diagnostische test om de aanwezigheid van HBV te bevestigen.

### Samenvatting en uitleg van de test

Het hepatitis B-virus (HBV) is één van de virussen die hepatitis kunnen veroorzaken en kan een levenslange HBV-infectie, levercirrose, leverkanker, leverfalen en zelfs de dood tot gevolg hebben. Volgens de Wereldgezondheidsorganisatie (WHO) is HBV één van de meest voorkomende infectieziekten ter wereld. De prevalentie van HBV-infectie en de wijze van overdracht variëren sterk wereldwijd. Ongeveer een derde van de wereldbevolking heeft serologische aanwijzingen van een vroegere of huidige HBV-infectie en meer dan 350 miljoen mensen over de hele wereld leiden aan een chronische HBV-infectie.<sup>1,2,3</sup> HBV-infecties leiden tot een verhoogd risico op leverdecompensatie, levercirrose en hepatocellulair carcinoom (HCC) met jaarlijks een mortaliteit van 0,5 tot 1,2 miljoen sterfgevallen en 5-10% gevallen van levertransplantatie wereldwijd.<sup>4,5</sup> Zonder de juiste behandeling, ingrepen en toezicht nadat de diagnose is gesteld, varieert de cumulatieve incidentie van cirrose na 5 jaar tussen de 8 en 20%. Wanneer cirrose zich heeft ontwikkeld, bedraagt het jaarlijkse risico op hepatocellulair carcinoom (HCC) 2-5%.<sup>6</sup>

HBV bevat een circulair, gedeeltelijk dubbelstrengig DNA-genoom van ongeveer 3200 basenparen, dat codeert voor vier gedeeltelijk overlappende ORF's (open reading frames) die de polymerase-, oppervlakte-, precore/core- en X-proteïnen tot expressie brengen. Het polymerase-ORF overlapt de andere 3 ORF's en codeert voor een essentieel viraal replicatieproteïne, nl. polymerase. Het oppervlakte-ORF brengt drie eiwitten tot expressie die essentieel zijn voor virale morfogenese, de virale toegang tot hepatocyten en voor het uitlokken van de immuunrespons van de host.<sup>7</sup> Er zijn 8 HBV-genotypen (A-H) die doorgaans worden aangetroffen in verschillende geografische locaties. Momenteel wordt de kwantificering van HBV-DNA gebruikt om te bepalen welke patiënten met een chronisch infectie moeten worden behandeld, om de respons op de behandeling te controleren en om verhogingen in de virale belasting te beoordelen die op resistentie zouden kunnen wijzen.<sup>5</sup>

De Aptima HBV Quant Assay is een *in-vitro* amplificatietest op basis van nucleïnezuur die in real-time via transcriptie gemedieerde amplificatie (TMA)-technologie op het Panther-systeem gebruikt om de hoeveelheid HBV-DNA (genotypen A, B, C, D, E, F, G en H) te meten. De Aptima HBV Quant Assay richt zich op twee sterk geconserveerde gebieden in de polymerase- en oppervlaktegenen (voor een hogere tolerantie tegen mogelijke mutaties). De assay is gestandaardiseerd in overeenstemming met de 3e internationale WHO-norm voor het hepatitis B-virus (NIBSC-code: 10/264).

## Uitgangspunten van de procedure

De Aptima HBV Quant Assay omvat drie grote stappen, die plaatsvinden in slechts één buis op het Panther-systeem: target capture, targetamplificatie door TMA en detectie van de amplificatieproducten (amplicon) door de sondes (probes) met fluorescerend etiket.

Tijdens de targetcapture wordt viraal DNA uit de monsters geïsoleerd. Het monster wordt behandeld met een detergent om de virusenvelop oplosbaar te maken, de eiwitten te denatureren en viraal genomisch DNA af te geven. Capture-oligonucleotiden hybridiseren met sterk geconserveerde regio's van HBV-DNA (indien aanwezig) in het testmonster. De gehybridiseerde target wordt dan gevangen op magnetische microdeeltjes die in een magnetisch veld van het monster worden gescheiden. Tijdens wasstappen worden vreemde componenten uit de reageerbuis verwijderd.


Targetamplificatie treedt op via TMA, een via transcriptie gemedieerde nucleïnezuuramplificatiemethode waarbij twee enzymen, MMLV (Moloney-muizenleukemievirus)-reverse-transcriptase en T7 RNA-polymerase, worden gebruikt. De reverse-transcriptase wordt gebruikt voor het maken van een DNA-kopie (met een promotorsequentie voor T7 RNA-polymerase) van de targetsequentie. Via T7 RNA-polymerase meerdere kopieën van RNA-amplicon aangemaakt op basis van het DNA-kopiesjabloon. De Aptima HBV Quant Assay gebruikt de TMA-methode om twee regio's van het HBV-genoom (polymerase genoom en oppervlakte-genoom) te vergroten. Amplificatie in die regio's wordt bereikt met behulp van specifieke primers die zijn ontworpen om de HBV-genotypen A, B, C, D, E, F, G en H te vergroten. De benadering met dubbele doelregio en primerontwerp die zich op de sterk geconserveerde regio's richt, garandeert een accurate kwantificering van het HBV-DNA.

Detectie wordt gerealiseerd met behulp van fluorescerende probes van enkelstrengs nucleïnezuur tijdens amplificatie van de target die zorgen voor realtime hybridisatie specifiek aan het amplicon. Elke probe is uitgerust met een fluorofoor en een quencher (uitdover). Wanneer geen hybridisatie met het amplicon plaatsvindt, bevindt de quencher zich in de buurt van de fluorofoor en onderdrukt het fluorescentie. Wanneer de probe zich aan het amplicon bindt, raakt de quencher verder verwijderd van de fluorofoor en zendt die een signaal uit op een bepaalde golflengte als gevolg van excitatie door een lichtbron. Hoe meer hybridisatie tussen probes en amplicon plaatsvindt, des te sterker het fluorescerende signaal. De tijd tot de afgifte van een fluorescerende signaal loopt gelijk aan die van de beginconcentratie van HBV. Elke reactie heeft een interne kalibrator/interne controle (IC) die controleert op variaties in de verwerking, amplificatie en detectie van het monster. De concentratie van een monster wordt vastgesteld door de Panther-systeemsoftware met behulp van de HBV- en IC-signalen voor elke reactie en deze te vergelijken met de kalibratiegegevens.

**Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen**

- A. Alleen voor *in-vitro* diagnostiek.
- B. Ter verkleining van het risico van ongeldige resultaten dient u de gehele bijsluiter en de *gebruikershandleiding van het Panther-systeem* zorgvuldig te lezen voor u deze assay gebruikt.
- C. qHBV Target Enhancer Reagent (TER) is corrosief. Kijk op pagina 5 van "Met betrekking tot de assay" voor een volledige lijst met aandachtspunten.

**Met betrekking tot het laboratorium**

-  D. **VOORZICHTIG:** de controles bij deze assay bevatten humaan plasma. Het plasma is negatief voor hepatitis-B-oppervlakte-antigeen (HBsAg), antistoffen tegen HCV, antistoffen tegen HIV-1 en HIV-2, en HIV-antigeen wanneer getest met door de Amerikaanse FDA (Food and Drug Administration) gelicentieerde procedures. Daarnaast is het plasma niet-reactief voor HBV-DNA, HCV-RNA en HIV-1-RNA wanneer getest met gelicentieerde nucleïnezuurtests met gepoolde monsters. Alle materiaal van menselijk bloed dient te worden beschouwd als potentieel besmettelijk en moet worden gehanteerd met universele voorzorgsmaatregelen.<sup>8,9,10</sup>
- E. Alleen personeel dat adequaat is opgeleid in het gebruik van de Aptima HBV Quant Assay en in het omgaan met potentieel besmettelijk materiaal, mag deze procedure uitvoeren. Als er materiaal is gemorst, desinfecteer dan onmiddellijk volgens de toepasselijke procedures binnen de instelling.
- F. Gebruik alleen de meegeleverde of aangegeven wegwerpartikelen voor in het laboratorium.
- G. Pas de normale voorzorgsmaatregelen voor een laboratorium toe. Niet met de mond pipetteren. Eet, drink of rook niet in de aangegeven werkgebieden. Draag poederloze wegwerphandschoenen, oogbescherming en labjassen tijdens het verwerken van monsters en kitreagentia. Was de handen grondig na het verwerken van monsters en kitreagentia.
- H. Werkoppervlakken, pipetten en overige apparatuur moeten regelmatig worden ontsmet met 2,5% tot 3,5% (0,35 M tot 0,5 M) natriumhypochlorietoplossing.
- I. Werp alle materialen weg die in contact zijn geweest met monsters en reagentia in overeenstemming met de toepasselijke nationale, internationale en regionale regelgeving.<sup>8,9,10,11</sup> Reinig en desinfecteer alle werkoppervlakken grondig.
- J. De controles bevatten natriumazide als conserveringsmiddel. Gebruik geen metalen buizen om reagentia over te zetten. Als oplossingen met natriumazideverbindingen via de gootsteen worden afgevoerd, moeten ze worden verdund en doorgespoeld met ruime hoeveelheden stromend water. Deze voorzorgsmaatregelen worden aanbevolen om te voorkomen dat afzettingen zich ophopen in metalen buizen waarin explosieve situaties kunnen ontstaan.

- K. Goede standaardpraktijken voor laboratoria voor moleculaire diagnostiek omvatten controle van de laboratoriumomgeving. De volgende procedure wordt voorgesteld ter bewaking van een laboratoriumomgeving:
1. Pak een wattenstaafje en voeg het bij de Aptima-SAT-buis.
  2. Plak het juiste etiket op elke SAT-buis.
  3. Vul elke SAT-buis met 1 ml Aptima-monsterverdunningsmiddel.
  4. Bevochtig een staafje lichtjes met nucleasevrij gedeïoniseerd water om oppervlaktemonsters af te nemen.
  5. Neem een monster af door met het staafje van boven naar beneden over het betreffende oppervlak te gaan. Draai het staafje ongeveer een halve slag terwijl u het monster afneemt.
  6. Plaats het afgenomen monster onmiddellijk in de bus en roer het wattenstaafje voorzichtig met wervelende bewegingen door de verdunner om potentieel afgenomen materiaal te onttrekken. Druk het staafje tegen de binnenkant van de transportbuis om zo veel mogelijk vloeistof te onttrekken. Gooi het staafje weg en doe een dop op de bus.
  7. Herhaal de stappen voor de resterende monsters.
  8. Test het monster met een moleculaire assay.

#### Met betrekking tot het monster



- L. De monsters kunnen besmettelijk zijn. Pas universele voorzorgsmaatregelen<sup>8,9,10</sup> toe wanneer u deze assay uitvoert. Er moeten geschikte methoden voor hantering en afvoer worden vastgesteld in overeenstemming met toepasselijke nationale, internationale en regionale regelgeving.<sup>11</sup> Alleen personeel dat adequaat is opgeleid in het gebruik van de Aptima HBV Quant Assay en in het omgaan met potentieel besmettelijk materiaal, mag deze procedure uitvoeren.
- M. Zorg dat de monsters worden verzonden onder de juiste opslagomstandigheden om hun integriteit te waarborgen. De stabiliteit van de monsters in andere dan de aanbevolen verzendingsomstandigheden is niet geëvalueerd.
- N. Voorkom kruisbesmetting tijdens de stappen waarin de monsters worden verwerkt. Wees vooral voorzichtig als u de doppen van de monsters losmaakt of verwijdert om besmetting via verspreiding van aerosolen te voorkomen. De monsters kunnen uitermate veel organismen bevatten. Zorg ervoor dat monsterrecipiënten niet met elkaar in contact komen en voer gebruikt materiaal niet over open recipiënten af. Vervang uw handschoenen als deze met een monster in contact komen.

#### Met betrekking tot de assay

- O. Gebruik de reagenskit, de kalibrator of de controles niet na de uiterste houdbaarheidsdatum.
- P. Verwissel, meng of combineer geen assayreagentia uit kits met verschillende hoofdpartijnummers. De assayvloeistoffen kunnen afkomstig zijn van verschillende partijnummers. De controles en de kalibrator kunnen afkomstig zijn van verschillende partijnummers.
- Q. Voorkom microbiële en nucleaseverontreiniging van de reagentia.

- R. Doe een dop op alle assayreagentia bij gespecificeerde temperaturen en sla ze op. Gebruik van verkeerd opgeslagen reagentia kan de uitslag van de assay negatief beïnvloeden. Zie *Eisen voor opslag en verwerking van reagentia* en *Testprocedure voor het Panther-systeem* voor meer informatie.
- S. Combineer geen assayreagentia of vloeistoffen zonder specifieke aanwijzingen. Flessen voor reagentia of vloeistoffen mogen niet helemaal worden gevuld. Het Panther-systeem verifieert het peil van de reagentia.
- T. Vermijd dat target enhancer reagens in aanraking komt met de huid, ogen en slijmvliezen. Was met water als er zich contact met deze reagens voordoet. Als er reagens is gemorst, desinfecteer dan onmiddellijk volgens de toepasselijke procedures binnen de site.
- U. Enkele reagentia in deze kit zijn voorzien van risico- en veiligheidssymbolen.

**Let op:** *Gevarenavoorlichting vindt plaats volgens de classificaties in EU-veiligheidsinformatiebladen (VIB's). Raadpleeg de VIB voor uw regio in de Safety Data Sheet Library (bibliotheek met veiligheidsinformatiebladen) op [www.hologicds.com](http://www.hologicds.com) voor meer informatie over gevarenavoorlichting in uw regio.*

	<p><b>Controles HBV VL-kit</b>  <b>Natriumazide 0,2%</b>            Human Serum 95-100%</p>
	<p><b>WAARSCHUWING</b>            H312 - Schadelijk bij contact met de huid            H412 - Schadelijk voor in het water levende organismen, met langdurige gevolgen            P273 - Voorkom lozing in het milieu            P280 - Draag beschermende handschoenen/beschermende kleding/oogbescherming/gelaatsbescherming</p>
	<p><b>Target Enhancer Reagent</b>  <b>Lithium Hydroxide, Monohydrate 5-10%</b></p>
	<p><b>GEVAAR</b>            H302 - Schadelijk bij inslikken            H314 - Veroorzaakt ernstige brandwonden en oogletsel            P260 - Stof/rook/gas/nevel/damp/spuitnevel niet inademen            P280 - Draag beschermende handschoenen/beschermende kleding/oogbescherming/gelaatsbescherming            P303 + P361 + P353 - INDIEN OP DE HUID (of haar): Trek alle besmette kleding onmiddellijk uit. Spoel de huid af met water/onder de douche            P305 + P351 + P338 - INDIEN IN DE OGEN: Spoel minutenlang voorzichtig met water. Verwijder eventuele contactlenzen als dit gemakkelijk gaat. Ga door met spoelen            P310 - Onmiddellijk een ANTIGIFCENTRUM of een arts raadplegen</p>

## Eisen voor opslag en verwerking van reagentia

- A. In de volgende tabel worden de opslagomstandigheden en stabiliteit voor reagentia, controles en kalibrator weergegeven.

Reagens	Ongeopend bewaard	Open kit (gereconstitueerd)	
		Opslag	Stabiliteit
qHBV-amplificatiereagens	2 °C tot 8 °C		
qHBV-amplificatiereconstitutieoplossing	2 °C tot 8 °C	2 °C tot 8 °C	30 dagen <sup>a</sup>
qHBV-enzymreagens	2 °C tot 8 °C		
qHBV-enzymreconstitutieoplossing	2 °C tot 8 °C	2 °C tot 8 °C	30 dagen <sup>a</sup>
qHBV-promotorreagens	2 °C tot 8 °C		
qHBV-promotorreconstitutieoplossing	2 °C tot 8 °C	2 °C tot 8 °C	30 dagen <sup>a</sup>
qHBV Target Capture Reagent	2 °C tot 8 °C	2 °C tot 8 °C	30 dagen <sup>a</sup>
qHBV PCAL (positieve kalibrator)	-15 °C tot -35 °C	15 °C tot 30 °C	Flesje voor eenmalig gebruik binnen 24 uur
qHBV NC CONTROL – (negatieve controle)	-15 °C tot -35 °C	15 °C tot 30 °C	Flesje voor eenmalig gebruik binnen 24 uur
qHBV LPC CONTROL + (laag-positieve controle)	-15 °C tot -35 °C	15 °C tot 30 °C	Flesje voor eenmalig gebruik binnen 24 uur
qHBV HPC CONTROL + (hoog-positieve controle)	-15 °C tot -35 °C	15 °C tot 30 °C	Flesje voor eenmalig gebruik binnen 24 uur
qHBV Target Enhancer Reagent	15 °C tot 30 °C	15 °C tot 30 °C	30 dagen <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Wanneer reagentia uit het Panther-systeem worden gehaald, moeten ze onmiddellijk opnieuw op de juiste opslagtemperatuur worden gebracht.

- B. Voer ongebruikte gereconstitueerde reagentia, TCR (target capture reagent) en TER (target enhancer reagent) na 30 dagen af of, indien dat eerder het geval is, na de uiterste houdbaarheidsdatum van de hoofdpartij.
- C. Reagentia in het Panther-systeem blijven daarin 72 uur stabiel. Reagentia kunnen maximaal 5 keer in het Panther-systeem worden geplaatst. Het Panther-systeem registreert elke keer dat de reagentia worden geladen.
- D. Na ontdooiing van de kalibrator moet de oplossing helder zijn, dus niet troebel en zonder neerslag.
- ⚠ E. Het promotorreagens en het gereconstitueerde promotorreagens zijn lichtgevoelig. Bescherm deze reagentia tegen licht tijdens opslag of voorbereiding voor gebruik.
- F. De qHBV Target Enhancer Reagent moet zich tussen 15 °C en 30 °C bevinden vóór gebruik.

## Monsterafname en -opslag

**Let op:** behandel alle monsters alsof ze potentieel besmettelijke stoffen bevatten. Pas universele voorzorgsmaatregelen toe.

**Let op:** voorkom kruisbesmetting tijdens de stappen waarin de monsters worden verwerkt. Voer gebruikt materiaal bijvoorbeeld niet over open buizen af.

**Let op:** alleen kunststof secundaire buisjes zijn geschikt voor opslag.

Volbloedmonsters die in de volgende glazen of kunststof buizen zijn afgenomen, kunnen worden gebruikt:

- Buizen die EDTA- of ACD-anticoagulantia bevatten
- PPT-buizen (Plasma Preparation Tubes)
- Serumbuizen
- SST-buizen (serumseparatorbuizen)

Serum kan pas verder verwerkt worden na stolselvorming.

#### A. Monsterafname

Volbloed kan worden bewaard bij 2 °C tot 30 °C en moet binnen 24 uur na monsterafname worden gecentrifugeerd. Scheid het plasma of serum van de gepelleteerde rode bloedcellen volgens de instructies van de fabrikant van de gebruikte buis. Plasma of serum kan in het primaire buisje worden getest op het Panther-systeem of worden overgebracht naar een secundair buisje, zoals het Aptima SAT-buisje (Specimen Aliquot Tube). De minimale hoeveelheid plasma of serum die nodig is voor een reactievolume van 500 µl is 1200 µl voor primaire afnamebuisjes en minimaal 700 µl voor secundaire buisjes. In de volgende tabel is weergegeven hoeveel dood volume elk type primair en secundair buisje moet bevatten.

Buisje (afmeting en type)	Dood volume bij Panther
Aptima SAT-buisje (Sample Aliquot Tube)	0,2 ml
12 x 75 mm	0,5 ml
13 x 100 mm	0,5 ml
13 x 100 mm met gel	0,3 ml
16 x 100 mm met gel	0,7 ml

Als ze niet onmiddellijk worden getest kunnen plasma en serum worden bewaard volgens onderstaande specificaties. Plasma of serum dat is overgebracht naar een secundair buisje mag worden bevroren bij -20 °C. Zorg ervoor dat u niet meer dan drie vries-dooi cycli doorloopt. Bevries de monsters niet in primaire EDTA-, ACD- of serumafnamebuizen.

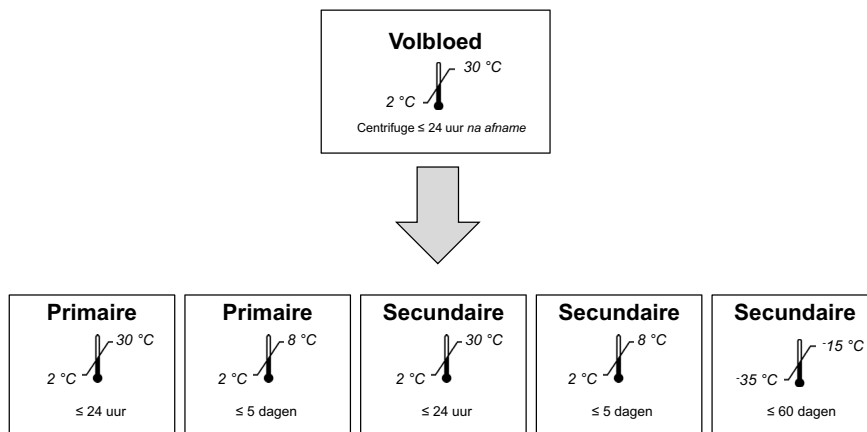
#### B. Opslagomstandigheden voor monsters

##### 1. EDTA- en ACD-plasmamonsters

Volbloed kan worden bewaard bij 2 °C tot 30 °C en moet binnen 24 uur na monsterafname worden gecentrifugeerd. Plasma kan vervolgens onder een van de volgende omstandigheden worden bewaard:

- Maximaal 24 uur bij 2 °C tot 30 °C in het primaire afnamebuisje of het secundaire buisje,
- maximaal 5 dagen bij 2 °C tot 8 °C in het primaire afnamebuisje of het secundaire buisje, of
- maximaal 60 dagen bij -20 °C in het secundaire buisje.



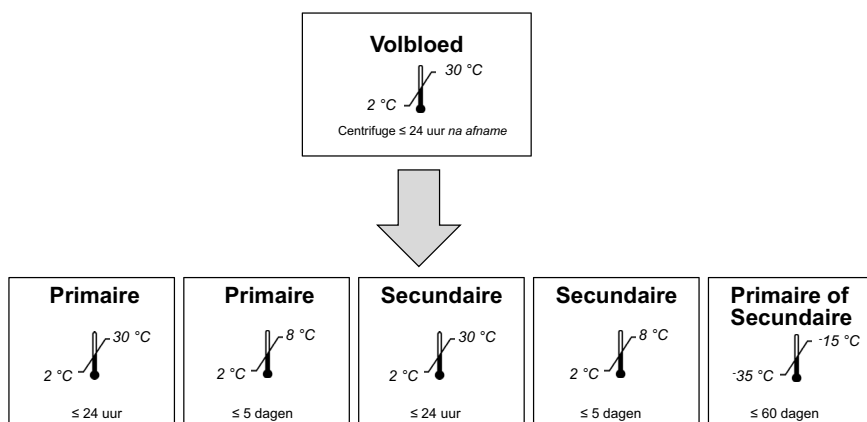


**Afbeelding 1. Bewaarcondities voor EDTA-/ACD-buizen**

## 2. PPT-monsters

Volbloed kan worden bewaard bij 2 °C tot 30 °C en moet binnen 24 uur na monsterafname worden gecentrifugeerd. Plasma kan vervolgens onder een van de volgende omstandigheden worden bewaard:

- Maximaal 24 uur bij 2 °C tot 30 °C in het PPT-buisje of het secundaire busje,
- maximaal 5 dagen bij 2 °C tot 8 °C in het PPT-buisje of het secundaire busje, of
- maximaal 60 dagen bij -20 °C in het PPT-buisje of het secundaire busje.

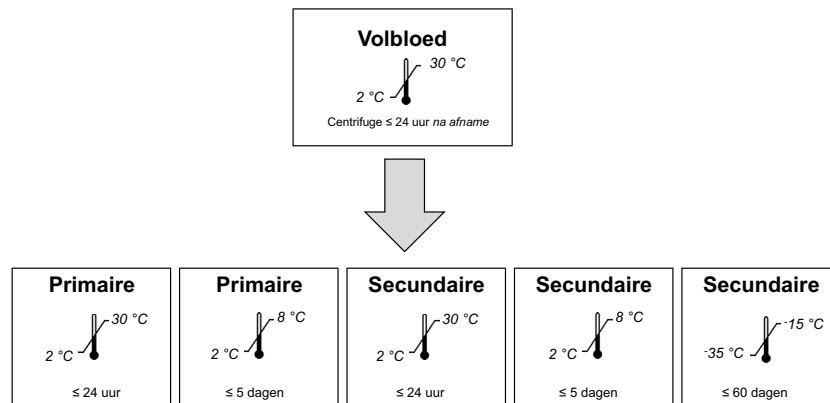


**Afbeelding 2. Opslagomstandigheden voor PPT-buizen**

## 3. Serumbuismonsters

Volbloed kan worden bewaard bij 2 °C tot 30 °C en moet binnen 24 uur na monsterafname worden gecentrifugeerd. Serum kan vervolgens onder een van de volgende omstandigheden worden bewaard:

- Maximaal 24 uur bij 2 °C tot 30 °C in het serumbuisje of het secundaire busje,
- maximaal 5 dagen bij 2 °C tot 8 °C in het serumbuisje of het secundaire busje, of
- maximaal 60 dagen bij -20 °C in het secundaire busje.

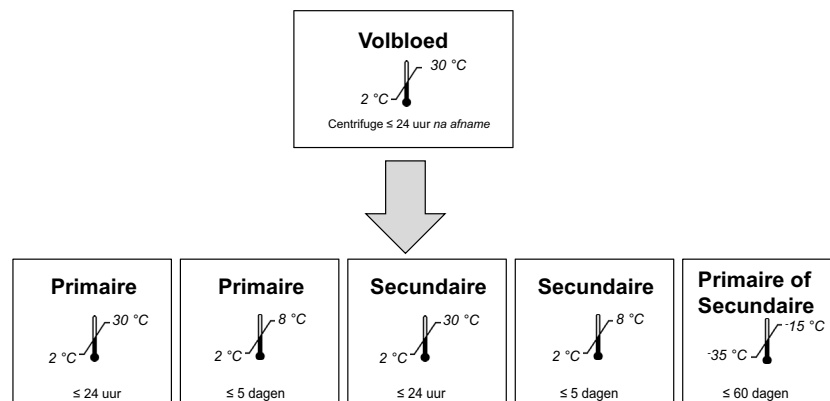


**Afbeelding 3. Opslagomstandigheden voor serumbuizen**

#### 4. SST-monsters

Volbloed kan worden bewaard bij 2 °C tot 30 °C en moet binnen 24 uur na monsterafname worden gecentrifugeerd. Serum kan vervolgens onder een van de volgende omstandigheden worden bewaard:

- Maximaal 24 uur bij 2 °C tot 30 °C in het SST-buisje of het secundaire buisje,
- maximaal 5 dagen bij 2 °C tot 8 °C in het SST-buisje of het secundaire buisje, of
- maximaal 60 dagen bij -20 °C in het SST-buisje of het secundaire buisje.



**Afbeelding 4. Opslagomstandigheden voor SST-buizen**

#### C. Langdurig bewaren in de vriezer

Plasma- en serummonsters kunnen tot maximaal 60 dagen in SAT-buizen bij -65 °C tot -85 °C worden bewaard.

#### D. Verdunning van plasma- en serummonsters

Plasma- en serummonsters mogen in het SAT-buisje of een secundair buisje worden verdund voor analyse in het Panther-systeem. Zie *Testprocedure voor het Panther-systeem*, paragraaf E "Verwerking van monsters", stap 6 voor meer informatie.

**Let op:** als een monster wordt verdund, moet het onmiddellijk na verdunning worden getest. Vries een verdund monster niet in.

### Monsters in het Panther-systeem

Monsters zonder dop mogen maximaal 8 uur in het Panther-systeem achterblijven. Monsters mogen uit het Panther-systeem worden gehaald en getest zolang ze niet langer dan 8 uur in totaal in het systeem hebben gezeten voordat het monster in het Panther-systeem werd gepipetteerd.

### Vervoer van monsters

De monsters moeten onder dezelfde omstandigheden worden bewaard als beschreven in *Monsterafname en -opslag*.

**Let op:** de monsters moeten worden vervoerd volgens de toepasselijke nationale, internationale en regionale transportvoorschriften.

## Panther-systeem

Hieronder staan reagentia voor de Aptima HBV Quant Assay voor het Panther-systeem vermeld. Naast de naam van het reagens worden tevens de identificatiesymbolen weergegeven.

### Geleverde reagentia en materialen

**Let op:** informatie over eventuele gevarenaanduidingen en veiligheidsmaatregelen die met reagentia in verband worden gebracht, vindt u in de Safety Data Sheet Library (bibliotheek met veiligheidsinformatiebladen) op [www.hologic.com/sds](http://www.hologic.com/sds).

**Aptima HBV Quant Assay Kit**, 100 tests (Cat. Nr. PRD-03424)  
(1 assay-doos, 1 kalibratorkit, 1 controlekit en 1 Target Enhancer Reagent-doos)

Extra kalibrators en controles kunnen afzonderlijk worden besteld. Raadpleeg de individuele catalogusnummers hieronder.

**Aptima HBV Quant Assay-doos**  
(bewaren op 2 °C tot 8 °C na ontvangst)

Symbol	Onderdeel	Hoeveelheid
<b>A</b>	<b>qHBV-amplificatiereagens</b> <i>Niet-besmettelijke nucleïnezuren gedroogd in gebufferde oplossing.</i>	1 flesje
<b>E</b>	<b>qHBV-enzymreagens</b> <i>Reverse-transcriptase en RNA-polymerase gedroogd in met HEPES gebufferde oplossing.</i>	1 flesje
<b>PRO</b>	<b>qHBV-promotorreagens</b> <i>Niet-besmettelijke nucleïnezuren gedroogd in gebufferde oplossing.</i>	1 flesje
<b>AR</b>	<b>qHBV-amplificatiereconstitutieoplossing</b> <i>Oplossing in water met glycerol en conserveringsmiddelen.</i>	1 x 7,2 ml
<b>ER</b>	<b>qHBV-enzymreconstitutieoplossing</b> <i>Met HEPES gebufferde oplossing met een surfactans en glycerol.</i>	1 x 5,8 ml
<b>PROR</b>	<b>qHBV-promotorreconstitutieoplossing</b> <i>Oplossing in water met glycerol en conserveringsmiddelen.</i>	1 x 4,5 ml
<b>TCR</b>	<b>qHBV Target Capture Reagent</b> <i>Nucleïnezuren in een gebufferde zoutoplossing met vastefase-, niet-besmettelijke nucleïnezuren en een interne kalibrator.</i>	1 x 72,0 ml
	<b>Reconstitutiekragen</b>	3
	<b>Streepjescodeblad hoofdpertij</b>	1 blad

**Aptima HBV Quant kalibratorkit** (Cat. Nr. PRD-03425)

(bewaren op -15 °C tot -35 °C na ontvangst)

Symbool	Onderdeel	Hoeveelheid
PCAL	<b>Positieve qHBV-kalibrator</b> <i>Plasmide DNA in gebufferde oplossing</i>	5 x 2,5 ml
	<b>Streepjescodelabel kalibrator</b>	—

**Aptima HBV Quant controlekit** (Cat. Nr. PRD-03426)

(bewaren op -15 °C tot -35 °C na ontvangst)

Symbool	Onderdeel	Hoeveelheid
NC	<b>Negatieve qHBV-controle</b> <i>HBV-negatief gedefibrineerd humaan plasma met gentamicine en 0,2% natriumazide als conserveringsmiddelen.</i>	5 x 0,8 ml
LPC	<b>Laag-positieve qHBV-controle</b> <i>Geïnactiveerd positief HBV-plasma in gedefibrineerd humaan plasma met gentamicine en 0,2% natriumazide als conserveringsmiddelen.</i>	5 x 0,8 ml
HPC	<b>Hoog-positieve qHBV-controle</b> <i>Geïnactiveerd positief HBV-plasma in gedefibrineerd humaan plasma met gentamicine en 0,2% natriumazide als conserveringsmiddelen.</i>	5 x 0,8 ml
	<b>Streepjescodelabel controles</b>	—

**Aptima HBV Quant Target Enhancer Reagent-doos**

(bewaren op 15 °C tot 30 °C na ontvangst)

Symbool	Onderdeel	Hoeveelheid
TER	<b>qHBV Target Enhancer Reagent</b> <i>Een geconcentreerde oplossing van lithiumhydroxideoplossing</i>	1 x 46,0 ml

**Benodigde maar apart geleverde materialen**

**Let op:** voor materialen die bij Hologic verkrijgbaar zijn, is het catalogusnummer vermeld, tenzij ze op andere wijze zijn gespecificeerd.

<b>Materiaal</b>	<b>Cat. Nr.</b>
Panther-systeem	—
Panther-runkit voor realtime assays (uitsluitend voor realtime assays)	PRD-03455 (5000 tests)
<i>Aptima-kit met assayvloeistof (ook bekend als universele vloeistofkit) bevat Aptima-wasoplossing, Aptima-buffer voor deactiveringsvloeistof en Aptima-oliereagens</i>	303014 (1000 tests)
<i>Apparaten voor meerdere buizen (MTU's)</i>	104772-02
<i>Panther-afvalzakkit</i>	902731
<i>Panther-afvalbakdeksel</i>	504405
Of runkit voor het Panther-systeem <i>(als niet-realtime TMA-assays op hetzelfde moment als realtime TMA-assays worden gedraaid) bevat MTU's, afvalzakken, afvalbakdeksels, automatische detectie en assayvloeistof</i>	303096 (5000 tests)
Punten, 1000 µl, geleidend, vloeistofdetectie	10612513 (Tecan)
Bleekmiddel, 5% tot 7% (0,7 M tot 1,0 M) natriumhypochlorietoplossing	—
Poederloze wegwerphandschoenen	—
Vervangende doppen voor reagentia <i>Flessen voor amplificatie-, enzym- en promotorreagensrestitutie CL0041 (100 doppen)</i>	
<i>TCR-fles</i>	CL0040 (100 doppen)
<i>TER-fles</i>	501604 (100 doppen)
Laboratoriumtafellaken met plastic achterkant	—
Pluisvrije doekjes	—
Pipet	—
Punten	—
Opties primaire afnamebuisjes:	
<i>13 mm x 100 mm</i>	—
<i>13 mm x 75 mm</i>	—
<i>16 mm x 100 mm</i>	—
Centrifuge	—
Vortexmixer	—

## Optionele materialen

Materiaal	Cat. Nr.
Opties secundaire buisjes:	
12 mm x 75 mm	—
13 mm x 100 mm	—
16 mm x 100 mm	—
Aptima-SAT-buizen (100 stuks)	503762
Doppen voor transportbuizen (100 stuks) <i>dop voor SAT</i>	504415
Aptima-monsterverdunningsmiddel	PRD-03003
Aptima-monsterverdunningsmiddelkit <i>bevat monsterverdunningsmiddel, 100 SAT-buizen en 100 doppen</i>	PRD-03478
Transferpipetten	—
In de handel verkrijgbare panels, zoals: <i>HBV-panelen van kwaliteitscontrole voor moleculaire diagnostiek (QCMD)</i>	—
Wattenstaafjes	—
Schudmachine	—

## Testprocedure voor het Panther-systeem

**Let op:** raadpleeg de gebruikershandleiding van het Panther-systeem voor aanvullende informatie over procedures.

### A. Voorbereiding werkgebied

1. Reinig de werkoppervlakken waar reagentia worden bereid. Veeg de werkoppervlakken af met 2,5% tot 3,5% (0,35 M tot 0,5 M) natriumhypochlorietoplossing. Laat de natriumhypochlorietoplossing ten minste 1 minuut intrekken en spoel de werkoppervlakken vervolgens af met gedeïoniseerd (DI) water. De natriumhypochlorietoplossing mag niet opdrogen. Bedek het tafelblad met schone, absorberende laboratoriumtafelkleden met een plastic achterkant.
2. Reinig een apart deel van het werkoppervlak waar reagentia worden bereid. Gebruik de hierboven beschreven procedure (stap A.1).
3. Reinig de pipetten. Gebruik de hierboven beschreven reinigingsprocedure (stap A.1).

### B. Voorbereiding kalibrator en controles

Voer de volgende stappen uit om ervoor te zorgen dat de kalibrator en controles zich tussen 15 °C en 30 °C bevinden vóór verwerking:

1. Verwijder de kalibrator en controle uit de opslag (-15 °C tot -35 °C) en plaats ze tussen 15 °C en 30 °C. Draai elke buis voorzichtig om en dit meermaals tijdens het volledige ontdooiingsproces, zodat de inhoud van de buizen grondig wordt vermengd. Controleer vóór gebruik of de inhoud van de buis volledig ontdooid is.

**Optie.** Kalibrator- en controlebuizen mogen op een schudmachine worden geplaatst om de inhoud goed te mengen. Controleer vóór gebruik of de inhoud van de buis volledig ontdooid is.

**Let op:** voorkom overmatige schuimvorming bij het omkeren van de kalibrator en de controles. Schuim verstoort detectie van het vloeistofpeil door het Panther-systeem.

2. Droog na ontdooiing van de inhoud de buitenkant van de buis af met een schoon, droog wegwerpdoekje.
3. Open de buizen niet om vervuiling te voorkomen.

C. Reconstitutie van de reagens/bereiding van een nieuwe kit

**Let op:** reagentia moeten voorafgaand aan gebruik met het Panther-systeem worden gereconstitueerd.

1. Ga als volgt te werk om het TCR (Target Capture Reagens) voor te bereiden:
  - a. Haal de TCR uit de opslag (2 °C tot 8 °C). Controleer of het partijnummer op de TCR-fles overeenkomt met het partijnummer op het streepjescodeblad van de hoofdpartij.
  - b. Schud de TCR-fles onmiddellijk 10 keer krachtig heen en weer. Laat de TCR-fles bij 15 °C tot 30 °C ten minste 45 minuten opwarmen. In die tijdsperiode dient u de TCR-fles ten minste om de 10 minuten rond te draaien en om te keren.

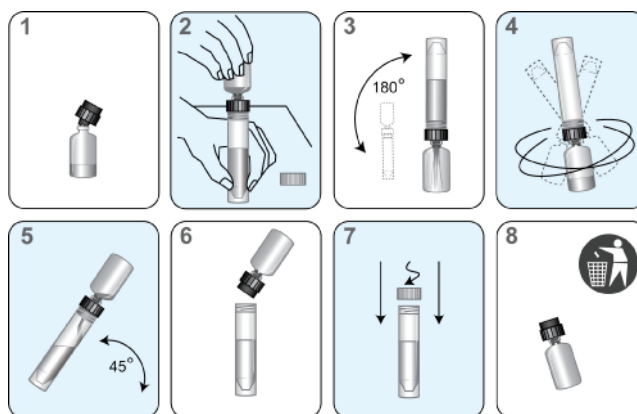
**Optie.** De TCR-fles kan op een schudmachine worden bereid volgens onderstaande aanwijzingen: haal de TCR uit de opslag (2 °C tot 8 °C) en schud de fles onmiddellijk 10 keren krachtig. Zet de TCR-fles op een schudmachine en laat ze bij 15 °C tot 30 °C ten minste 45 minuten opwarmen.
  - c. Controleer vóór gebruik of alle neerslag is opgenomen in de oplossing en de magnetische deeltjes zijn gesuspendeerd.
2. Ga als volgt te werk om amplificatie-, enzym- en promotorreagentia te reconstitueren:
  - a. Haal de gevriesdroogde reagentia en bijbehorende reconstitutieoplossingen uit de opslag (2 °C tot 8 °C). Voeg elke reconstitutieoplossing toe aan het bijbehorende gevriesdroogde reagens.
  - b. Controleer of de etiketten op de reconstitutieoplossing en het gevriesdroogde reagens dezelfde kleur hebben. Controleer de partijnummers op het streepjescodeblad van de hoofdpartij om u ervan te verzekeren dat de juiste reagentia met elkaar worden gecombineerd.
    - i. Open het gevriesdroogde reagensflesje door de metalen afdichting te verwijderen en de rubberen stop eraf te halen.
    - ii. Steek het ingekeepte uiteinde van de reconstitutiekraag (zwart) goed in het flesje (Afbeelding 5, stap 1).
    - iii. Open de bijbehorende fles met reconstitutieoplossing en leg de dop op een schoon, afgedekt werkoppervlak.
    - iv. Plaats de fles met reconstitutieoplossing op een stabiele ondergrond (bijvoorbeeld een tafel). Keer vervolgens het flesje met gevriesdroogde reagens boven de fles met reconstitutieoplossing om en bevestig de kraag goed op de fles met reconstitutieoplossing (Afbeelding 5, stap 2).
    - v. Keer de aan elkaar bevestigde flessen (reagensflesje aan de fles met oplossing) langzaam om de oplossing in het glazen flesje te laten leeglopen (Afbeelding 5, stap 3).
    - vi. Pak de aan elkaar bevestigde flessen op en draai ze gedurende ten minste 10 seconden rond (Afbeelding 5, stap 4).
    - vii. Wacht ten minste 30 minuten totdat het gevriesdroogde reagens in de oplossing is opgenomen.
    - viii. Draai nadat het gevriesdroogde reagens in de oplossing is opgenomen, de aan elkaar bevestigde flessen ten minste 10 seconden rond en schud de



oplossing in het glazen flesje daarna lichtjes heen en weer om de inhoud goed te vermengen.

- c. Kantel de aan elkaar bevestigde flessen weer langzaam, zodat alle oplossing terug in de fles met reconstitutieoplossing terugstroomt (Afbeelding 5, stap 5).
- d. Verwijder de reconstitutiekraag en het glazen flesje voorzichtig (Afbeelding 5, stap 6).
- e. Zet de dop weer op de fles. Noteer de initialen van de gebruiker en de datum van reconstitutie op het etiket (Afbeelding 5, stap 7).
- f. Gooi de reconstitutiekraag en het glazen flesje weg (Afbeelding 5, Stap 8).

**Waarschuwing:** voorkom overmatige schuimvorming bij reconstitutie van reagentia. Schuim verstoort detectie van het vloeistofpeil door het Panther-systeem.



**Afbeelding 5. Proces van reconstitutie van reagens**

3. Haal de qHBV Target Enhancer Reagent uit de opslag (15 °C tot 30 °C). Noteer de initialen van de gebruiker en de datum op het etiket. Controleer of het partijnummer op de TER-fles overeenkomt met het partijnummer op het streepjescodeblad van de hoofdpartij.
- D. Bereiding van reagentia voor eerder bereide reagentia
1. Haal de eerder voorbereide reagentia uit de opslag (2 °C tot 8 °C). Eerder bereide amplificatie-, enzym- en promotorreagentia en TCR moeten op 15 °C tot 30 °C worden gebracht voorafgaand aan de aanvang van de assay.
  2. Haal de TER uit de opslag (15 °C tot 30 °C).
  3. Voer voor eerder bereid TCR stap C.1 hierboven uit voordat u het met het systeem gebruikt.
  4. Om de amplificatie-, enzym- en promotorreagentia grondig te mengen voor ze in het systeem worden gebruikt, dient u ze rond te draaien en om te keren. Voorkom overmatige schuimvorming bij het omkeren van reagentia.
  5. Flessen met reagentia mogen niet helemaal worden gevuld. Het Panther-systeem herkent te volle flessen en verwerkt die niet.

## E. Verwerking van monsters

1. Bewaar verwerkte monsters in primaire buisjes of onverdunde monsters in secundaire buisjes op de juiste manier volgens de richtlijnen in "Monsterafname en -opslag" op pagina 7.
2. Controleer of bevroren monsters goed ontdooid zijn. Meng de ontdooide monsters gedurende 3 tot 5 seconden goed met de vortexmixer.
3. Zorg dat de monsters zich tussen 15 °C en 30 °C bevinden vóór verwerking. Raadpleeg *Monsters in het Panther-systeem* voor aanvullende informatie.
4. Controleer of elk primair afnamebuisje ten minste 1200 µl monstermateriaal bevat en of elk SAT-buisje ten minste 700 µl monstermateriaal bevat. Raadpleeg de tabel op pagina 8 van "*Monsterafname*" om te bepalen hoeveel dood volume elk type primair en secundair buisje moet bevatten. Als het monster moet worden verdund, raadpleeg dan stap E.6 hieronder voor meer informatie.
5. Vlak voordat u de monsters in een monsterrek plaatst, centrifugeert u elk monster gedurende 10 minuten op 1000 tot 3000g. Verwijder de doppen niet. Luchtbellen in het buisje verstoren detectie van het vloeistofpeil door het Panther-systeem.

Raadpleeg *Gereedmaken van het systeem*, stap F.2 hieronder, voor informatie over het laden van het rek en het verwijderen van de doppen.

6. Verdun monsters 1:3 in een SAT-buisje of 1:100 in een secundair buisje.

Een monster mag in een secundair buisje worden verdund voor analyse met het Panther-systeem.

**Let op:** als een monster wordt verdund, moet het onmiddellijk na verdunning worden getest.

## a. Verdunning van laagvolumemonsters

De hoeveelheid monsters kan worden verhoogd tot de vereiste minimumhoeveelheid (700 µl) met behulp van het Aptima-monsterverdunningsmiddel. Monsters van ten minste 240 µl kunnen als volgt worden verdund met twee delen monsterverdunningsmiddel (1:3):

- i. Doe 240 µl monster in een SAT-buis.
- ii. Voeg 480 µl Aptima-monsterverdunningsmiddel toe.
- iii. Doe een dop op de buis.
- iv. Draai de buis rustig 5 keer om de inhoud te mengen.

Monsters die 1:3 zijn verdund, kunnen worden getest met de 1:3-optie van het Panther-systeem (zie de *gebruikershandleiding van het Panther-systeem* voor meer informatie). De software rapporteert automatisch het resultaat voor het verdunde monster door de verdunningsfactor toe te passen. Deze monsters worden gemarkeerd als verdunde monsters.

## b. Verdunning van monster met een hoge titer

Als het resultaat van een monster hoger is dan de bovengrens voor de kwantificering (ULoQ), mag het als volgt worden verdund met 99 delen Aptima-monsterverdunningsmiddel (1:100):

- i. Breng 30 µl monstermateriaal over naar een SAT-buisje of een secundair buisje.
- ii. Voeg 2970 µl Aptima-monsterverdunningsmiddel toe.
- iii. Doe een dop op de buis.

iv. Draai de buis rustig 5 keer om de inhoud te mengen.

Monsters die 1:100 zijn verdund, kunnen getest worden met behulp van de 1:100 optie op het Panther-systeem (raadpleeg de *gebruikershandleiding van het Panther-systeem* voor meer informatie). De software zal het nauwkeurige resultaat automatisch vermelden door de verdunningsfactor toe te passen. De monsters zullen als verdunde monsters worden gemarkeerd.

**Let op:** de resultaten van verdunde monsters met verdunde concentraties die groter zijn dan de ULoQ (bovengrens voor kwantificering), zullen in de wetenschappelijke notatie worden gerapporteerd.

#### F. Gereedmaken van het systeem

1. Stel het systeem in volgens de instructies in de *gebruikershandleiding van het Panther-systeem* en *Opmerkingen met betrekking tot de procedure*. Zorg ervoor dat u reagensrekken en TCR-adapters van het juiste formaat gebruikt.
2. Plaats de monsters in het monsterrek. Voer voor elke monsterbuis (monster en, wanneer nodig, kalibrator en controles) de volgende stappen uit:
  - a. Maak één monsterdop los, maar verwijder de dop nog niet.

**Let op:** wees vooral voorzichtig om besmetting via verspreiding van aerosolen te voorkomen. Maak de doppen op de monsters voorzichtig los.

- b. Plaats de monsterbuis in het monsterrek.
- c. Herhaal stap 2.a en 2.b voor elk resterend monster.
- d. Wanneer de monsters in het monsterrek zijn geplaatst, dient u de dop van elke monsterbuis in één monsterrek eraf te halen en af te voeren. Houd een dop niet boven andere monsterrekken of monsterbuizen om vervuiling te voorkomen.
- e. Gebruik zo nodig een nieuwe wegwerptransferpipet om luchtbellen of schuim te verwijderen.
- f. Wanneer de laatste dop eraf is gehaald, plaatst u het monsterrek in het monstervak.

**Let op:** als u tegelijkertijd andere assays met andere monstertypes uitvoert, zet de monsterhouder dan vast voordat u het monsterrek in het monstervak plaatst.

- g. Herhaal stappen 2.a tot en met 2.f voor het volgende monsterrek.

## Opmerkingen met betrekking tot de procedure

### A. Kalibrator en controles

1. De buizen voor de positieve qHBV-kalibrator, de laag-positieve qHBV-controle, de hoog-positieve qHBV-controle en de negatieve qHBV-controle kunnen in elke positie in het monsterrek en in elke monstervakbaan in het Panther-systeem worden geplaatst. Monsters worden gepipetteerd wanneer aan een van de volgende twee voorwaarden is voldaan:
  - a. De kalibrator en controles worden op het moment verwerkt door het systeem.
  - b. Geldige resultaten voor de kalibrator en controles worden in het systeem geregistreerd.
2. Wanneer de kalibrator en controlebuizen zijn gepipetteerd en voor de Aptima HBV Quant Assay-reagenskit worden verwerkt, kunnen monsters tot maximaal 24 uur met de bijbehorende gereconstitueerde kit worden getest **behalve** in de volgende gevallen:
  - a. De resultaten voor de kalibrator of controles zijn ongeldig.
  - b. De bijbehorende assayreagentiakit is uit het systeem verwijderd.
  - c. De bijbehorende assayreagentiakit heeft de stabiliteitsgrenzen overschreden.
3. De kalibrator en elke controlebuis kan maar één keer worden gebruikt. Pogingen om de buis vaker dan een keer te gebruiken kunnen leiden tot verwerkingsfouten.

### B. Handschoenpoeder

Net als bij elk reagenssysteem kan overmatig poeder van sommige handschoenen geopende buizen vervuilen. Poederloze handschoenen worden daarom aanbevolen.

## **Kwaliteitscontrole**

Het resultaat van een run of monster kan door een gebruiker ongeldig worden verklaard als technische, bedienings- of instrumentproblemen zijn waargenomen tijdens de uitvoering van de assay en deze zijn genoteerd. In dit geval moeten monsters opnieuw worden getest.

### **Assaykalibratie**

Voor geldige resultaten moet een assay gekalibreerd zijn. Eén enkele positieve kalibrator wordt in drievoud uitgevoerd telkens wanneer een reagenskit in het Panther-systeem wordt geplaatst. Zodra die is vastgesteld, is de kalibratie maximaal 24 uur geldig. Software op het Panther-systeem waarschuwt de gebruiker wanneer kalibratie nodig is. De gebruiker scant een kalibratiecoëfficiënt van het streepjescodeblad van de hoofdpartij dat met elke reagenskit is meegeleverd.

Bij verwerking worden acceptatiecriteria voor de kalibrator automatisch geverifieerd door de software op het Panther-systeem. Als minder dan twee van de kalibratorreplica's geldig is, beschouwt de software de run automatisch als ongeldig. Monsters in een ongeldige run moeten opnieuw worden getest met een net voorbereide kalibrator en net bereide controles.

### **Negatieve en positieve controles**

Voor geldige resultaten moet een set assaycontroles worden getest. Eén replica van de negatieve controle, de laag-positieve controle en de hoog-positieve controle moet telkens wanneer een reagenskit in het Panther-systeem wordt geplaatst, worden getest. Zodra die zijn vastgesteld, zijn de controles maximaal 24 uur geldig. Software op het Panther-systeem waarschuwt de gebruiker wanneer controles nodig zijn.

Bij verwerking worden criteria voor het accepteren van controles automatisch geverifieerd door de software op het Panther-systeem. Voor geldige resultaten moet de negatieve controle het resultaat 'Niet aangetroffen' opleveren en de resultaten van de positieve controles moeten binnen de vooraf gedefinieerde parameters vallen (LPC nominaal doel: 2,7 Log<sub>10</sub> IE/ml, HPC nominaal doel: 4,6 Log<sub>10</sub> IE/ml). Als een van de controles een ongeldig resultaat heeft, beschouwt de software de run automatisch als ongeldig. Monsters in een ongeldige run moeten opnieuw worden getest met een net voorbereide kalibrator en net bereide controles.

### **Interne kalibrator/interne controle**

Elk monster bevat een interne kalibrator/interne controle (IC). Bij verwerking worden IC-acceptatiecriteria automatisch geverifieerd door de software op het Panther-systeem. Als een IC-resultaat ongeldig is, wordt het monsterresultaat als ongeldig beschouwd. Elk monster met een ongeldig IC-resultaat moet opnieuw worden getest voor een geldig resultaat.

De Panther-systeemsoftware is ontworpen om processen op een nauwkeurige manier te verifiëren als er procedures worden uitgevoerd volgens de instructies in deze bijsluiters en de *gebruikershandleiding van het Panther-systeem*.

## Interpretatie van resultaten

Het Panther-systeem stelt automatisch de HBV-DNA-concentratie vast voor monsters en controles door de resultaten te vergelijken met een kalibratiecurve. HBV-DNA-concentraties worden vermeld in IE/ml en  $\log_{10}$  (IE/ml). De interpretatie van de resultaten staat in Tabel 1. Als de verdunningsoptie wordt gebruikt voor verdunde monsters, berekent het Panther-systeem automatisch de HBV-concentratie voor het verdunde monster door de verdunde concentratie met de verdunningsfactor te vermenigvuldigen, en verdunde monsters worden aangemerkt als verdund.

**Let op:** voor verdunde monsters mogen resultaten met de vermelding 'Niet aangetroffen' of '< 10 aangetroffen' worden gegenereerd door verdunning van een monster met een concentratie hoger dan de LoD (detectielimiet) of LLoQ (ondergrens voor kwantificering), maar er niet ver af. Aanbevolen wordt nog een verdund monster af te nemen en te testen als er geen kwantitatief resultaat wordt verkregen.

Tabel 1: Interpretatie van resultaten

Gerapporteerde Aptima HBV Quant Assay- resultaten		Interpretatie
IE/ml	Log <sub>10</sub> Waarde <sup>a</sup>	
Niet aangetroffen	Niet aangetroffen	HBV-DNA niet aangetroffen.
< 10 aangetroffen	< 1,0	HBV-DNA is aangetroffen maar in een concentratie lager dan de LLoQ.
10 tot 1.000.000.000	1,0 tot 9,0	De HBV-DNA-concentratie ligt binnen het lineaire bereik van 10 tot 1.000.000.000 IE/ml.
> 1.000.000.000	> 9,0	HBV-DNA-concentratie is hoger dan de ULoQ.
Ongeldig <sup>b</sup>	Ongeldig <sup>b</sup>	Er is een fout opgetreden bij het genereren van het resultaat. Monsters moeten opnieuw worden getest.

<sup>a</sup> Waarde is afgerond op twee decimalen.

<sup>b</sup> Ongeldige resultaten worden in het blauw weergegeven.

**Let op:** de resultaten van verdunde monsters met verdunde concentraties die groter zijn dan de ULoQ (bovengrens voor kwantificering), zullen in de wetenschappelijke notatie worden gerapporteerd.

## Beperkingen

- Alleen personeel dat is getraind in de procedure, mag deze assay gebruiken. Niet-naleving van de instructies in deze bijsluiters kan leiden tot foutieve resultaten.
- Betrouwbare resultaten zijn afhankelijk van adequate monsterafname, vervoer, opslag en verwerking.
- Hoewel het niet vaak voorkomt, kunnen mutaties in de sterk geconserveerde regio's van het virale genoom, die bedekt zijn door de primers en/of sondes in de Aptima HBV Quant, resulteren in onderkwantificering of ervoor zorgen dat het virus niet wordt gedetecteerd.

**Prestaties****Detectielimiet op basis van de 3e internationale WHO-norm**

De detectielimiet (LoD) van de assay wordt gedefinieerd als de HBV-DNA-concentratie die is aangetroffen bij een waarschijnlijkheid van 95% of hoger volgens CLSI EP17-A2.<sup>12</sup>

De LoD werd bepaald op grond van testen met panels van de 3e internationale WHO-norm voor hepatitis-B-virus-DNA (NIBSC 10/264) verdund in HBV humaan negatief plasma en serum. Minimaal 36 replica's van elke verdunning werden getest met een van drie reagenspartijen voor minimaal 108 replica's per verdunning. Een waarschijnlijkheidsanalyse werd uitgevoerd voor de voorspelde detectielimieten. De LoD-waarden in Tabel 2 zijn de resultaten van de reagenspartij met de hoogste voorspelde detectielimiet. De LoD voor de Aptima HBV Quant Assay op basis van de 3e internationale WHO-norm is 5,58 IE/ml voor plasma en 4,29 IE/ml voor serum.

Tabel 2: Detectielimiet op basis van de 3e internationale WHO-norm voor HBV

Voorspelde detectielimiet	Concentratie (IE/ml)	
	Plasma	Serum
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

### Detectielimiet voor alle HBV-genotypen

De LoD werd bepaald door verdunningen te testen van HBV-positieve klinische monsters van genotypen A, B, C, D, E, F, G en H in HBV-negatief humaan plasma en serum. Concentraties werden bepaald op basis van een vergelijkende assay met CE-markering en een licentie van Health Canada. Minimaal 24 replica's van elk panellid werden getest met elke van twee reagenspartijen voor minimaal 48 replica's per panellid. Een waarschijnlijkheidsanalyse werd uitgevoerd voor 50% en 95% van de voorspelde detectielimieten. De LoD-waarden in Tabel 3 zijn de resultaten van de reagenspartij met de hoogste voorspelde detectielimiet.

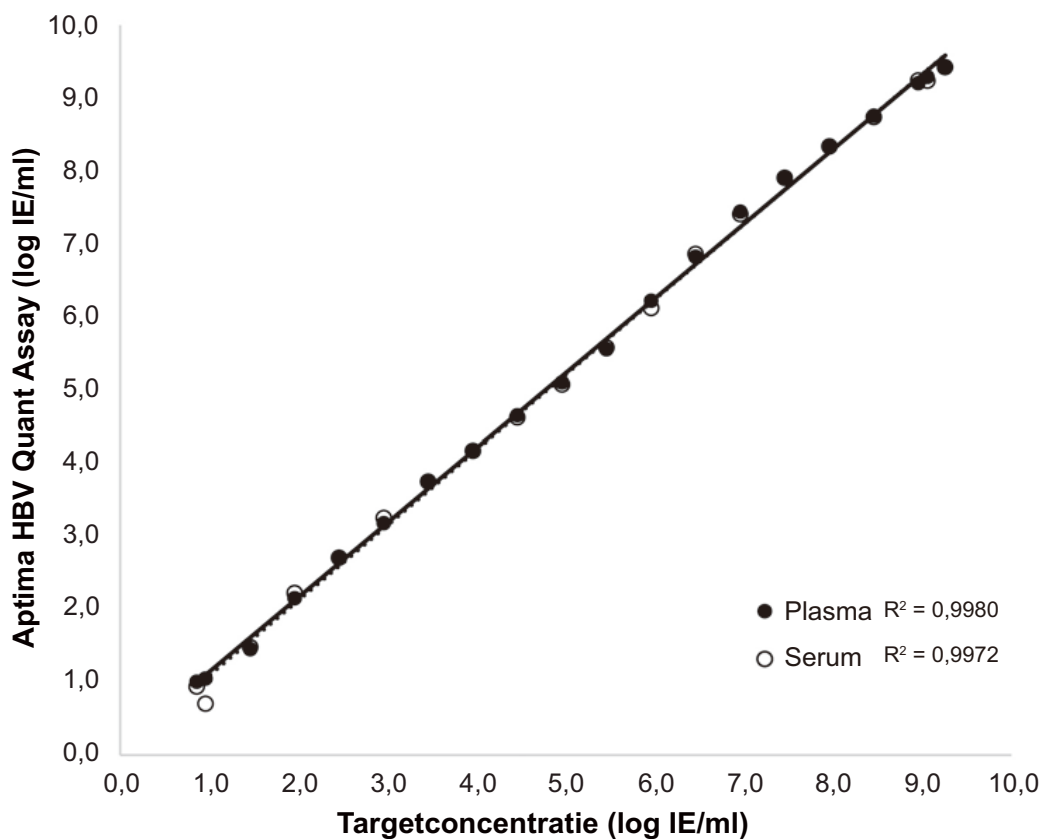
Tabel 3: Detectielimiet voor HBV-genotypen op basis van klinische monsters

Genotype	Voorspelde detectielimiet	Concentratie (IE/ml)	
		Plasma	Serum
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



## Lineair bereik

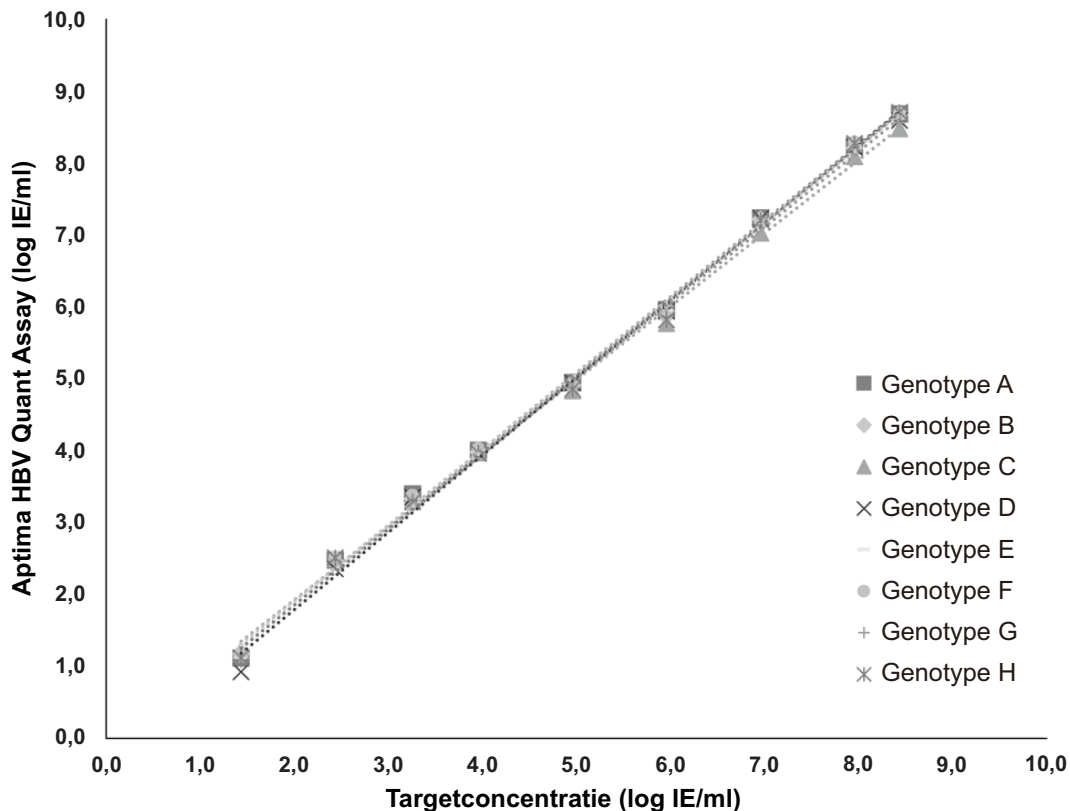
Het lineaire bereik werd bepaald op grond van testen met panelen van HBV-DNA verdund in HBV-negatief humaan plasma en serum volgens CLSI EP06-A.<sup>13</sup> Panelen bij concentraties variërend van 0,86 log IE/ml tot 9,26 log IE/ml. De Aptima HBV Quant Assay vertoonde lineariteit in het gehele geteste bereik, met een bovengrens voor kwantificering (ULoQ) van 9 log IE/ml zoals weergegeven in Afbeelding 6.



Afbeelding 6. Lineariteit in plasma en serum

## Lineariteit voor HBV-genotypen

De lineaire respons voor genotypen A, B, C, D, E, F, G en H werd bevestigd op basis van testen met panels van HBV-DNA verdund in buffer bij concentraties variërend van 1,44 log IE/ml tot 8,44 log IE/ml. Lineariteit werd aangetoond in het gehele geteste bereik voor alle genotypen zoals weergegeven in Afbeelding 7.



*Afbeelding 7. Lineariteit voor HBV-genotypen A tot H*

## Ondergrens voor kwantificering op basis van de 3e internationale WHO-norm

De ondergrens voor kwantificering (LLoQ) wordt gedefinieerd als de laagste concentratie waarin HBV-DNA op betrouwbare wijze wordt gekwantificeerd binnen een totale fout conform CLSI EP17-A2.<sup>12</sup> De totale fout werd geschat op basis van twee methoden: totale analytische fout (TAE) = |bias| + 2SD, en totale fout (TE) = SQRT(2) x 2SD. Om de nauwkeurigheid en precisie van de metingen te garanderen is de totale fout van de Aptima HBV Quant Assay ingesteld op 1 log IE/ml (d.w.z. dat bij LLoQ een verschil tussen twee metingen van meer dan 1 log IE/ml statistisch significant is).

De LLoQ werd bepaald door panelen van de 3<sup>e</sup> internationale WHO-norm voor DNA van het Hepatitis B-virus te testen (NIBSC 10/264)<sup>14</sup> verdund in HBV-negatief humaan plasma en serum. Er werden minimaal 45 replicates van elke oplossing getest met elk van de drie reagensbatches voor minimaal 135 replicates per oplossing. De resultaten van de reagensbatch met de hoogste concentratie die voldoet aan de TE- en TAE-vereisten zijn weergegeven in tabel 6. De berekende LLoQ voor de 3<sup>e</sup> internationale WHO-norm voor het Hepatitis B-virus is 4,8 IE/ml voor plasma en 6,34 IE/ml voor serum.

Tabel 4: Bepaling van LLoQ op basis van de 3e internationale WHO-norm voor HBV verdund in plasma

Reagenspartij	Targetconcentratie		Aptima HBV Quant	SD	Bias	Berekende TE	Berekende TAE
	(IE/ml)	(log IE/ml)	(log IE/ml)	(log IE/ml)	(log IE/ml)	(log IE/ml)	(log IE/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

SD = standaarddeviatie

Tabel 5: Bepaling van LLoQ op basis van de 3e internationale WHO-norm voor HBV verdund in serum

Reagenspartij	Targetconcentratie		Aptima HBV Quant	SD	Bias	Berekende TE	Berekende TAE
	(IE/ml)	(log IE/ml)	(log IE/ml)	(log IE/ml)	(log IE/ml)	(log IE/ml)	(log IE/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

SD = standaarddeviatie

Tabel 6: Overzicht van het berekende LLoQ op basis van de 3e internationale WHO-norm voor HBV

Reagenspartij	Plasma LLoQ		Serum LLoQ	
	(log IE/ml)	(IE/ml)	(log IE/ml)	(IE/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

SD = standaarddeviatie

### Bepaling van de ondergrens voor kwantificering (LLoQ) voor alle HBV-genotypen

De LLoQ werd bepaald door verdunningen te testen van HBV-positieve klinische monsters van genotypen A, B, C, D, E, F, G en H in HBV-negatief humaan plasma en serum. Minimaal 36 replica's van elk panellid werden getest met elke van twee reagenspartijen voor minimaal 72 replica's per panellid. De resultaten van de reagenspartij met de hoogste concentratie die overeenkomt met het nauwkeurigheidsoel ( $TE \leq 1 \log \text{IE/ml}$  en  $TAE \leq 1 \log \text{IE/ml}$ ) met 100% detectie, worden getoond in Tabel 7 voor plasma en in Tabel 8 voor serum. De resultaten voor de laagste concentratie die overeenkomt met het nauwkeurigheidsoel met 100% detectie worden met schaduw weergegeven in beide tabellen en worden samengevat in Tabel 9. Het berekende LLoQ voor de genotypen A, B, C, D, E, F, G en H in plasma en serum worden samengevat in Tabel 9. Hiermee werd de totale LLoQ voor de assay vastgesteld op 10 IE/ml.

Tabel 7: Bepaling van LLoQ voor alle genotypen in plasma

Genotype	Targetconcentratie		Aptima HBV Quant	SD	Bias	Berekende TE	Berekende TAE
	(IE/ml)	(log IE/ml)	(log IE/ml)	(log IE/ml)	(log IE/ml)	(log IE/ml)	(log IE/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

SD = standaarddeviatie

Tabel 8: Bepaling van LLoQ voor alle genotypen in serum

Genotype	Targetconcentratie		Aptima HBV Quant	SD	Bias	Berekende TE	Berekende TAE
	(IE/ml)	(log IE/ml)	(log IE/ml)	(log IE/ml)	(log IE/ml)	(log IE/ml)	(log IE/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

SD = standaarddeviatie

Tabel 9: Overzicht van LLoQ voor alle genotypen in plasma en serum

Genotype	Plasma LLoQ		Serum LLoQ	
	(log IE/ml)	(IE/ml)	(log IE/ml)	(IE/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

## Reproduceerbaarheid

Om de reproduceerbaarheid te beoordelen, werd een paneel van 28 leden gemaakt door de HBV-positieve klinische monsters (genotype A en C) te verdunnen of HBV-DNA (genotype A en C) toegevoegd aan HBV-negatief plasma en serum. Het paneel werd gedurende een periode van 20 dagen of meer getest door drie gebruikers met drie reagenspartijen op drie Panther-systemen.

Tabel 10 en Tabel 11 de nauwkeurigheid van assayresultaten (in log IE/ml) weer tussen instrumenten, tussen gebruikers, tussen partijen, tussen runs, binnen runs en in totaal. De totale variabiliteit was voornamelijk het gevolg van variabiliteit binnen de runs (d.w.z. willekeurige fout).

Tabel 10: Reproduceerbaarheid van de Aptima HBV Quant Assay voor genotype A

Matrix	N	Gemiddelde concentratie (log IE/ml)	Tussen gebruikers		Tussen instrumenten		Tussen partijen		Tussen runs		Binnen runs		Totaal	
			SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	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
Serum	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
Serum	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
Serum	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
Serum	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
Serum	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
Serum	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
Serum	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 = variatiecoëfficiënt, SD = standaarddeviatie

**Let op:** variabiliteit van sommige factoren kan numeriek negatief zijn, wat soms het geval is als de variabiliteit als gevolg van die factoren zeer klein is. Wanneer dat het geval is, worden SD en CV weergegeven als 0.

Tabel 11: Reproduceerbaarheid van de Aptima HBV Quant Assay voor genotype C

Matrix	N	Gemiddelde concentratie (log IE/ml)	Tussen gebruikers		Tussen instrumenten		Tussen partijen		Tussen runs		Binnen runs		Totaal	
			SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	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
Serum	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
Serum	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
Serum	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
Serum	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
Serum	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
Serum	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
Serum	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 = variatiecoëfficiënt, SD = standaarddeviatie

**Let op:** variabiliteit van sommige factoren kan numeriek negatief zijn, wat soms het geval is als de variabiliteit als gevolg van die factoren zeer klein is. Wanneer dat het geval is, worden SD en CV weergegeven als 0.

## Potentieel storende stoffen

De gevoeligheid van de Aptima HBV Quant Assay voor interferentie door een verhoogd gehalte aan endogene stoffen of door geneesmiddelen die veelal worden voorgeschreven aan met HBV geïnfecteerde personen, is geëvalueerd. HBV-negatieve plasmamonsters en monsters gespiket met HBV tot een concentratie van 4,3 log IE/ml HBV-DNA zijn getest.

Er is geen interferentie in de prestaties van de assay waargenomen in aanwezigheid van albumine (90 mg/ml), hemoglobine (5 mg/ml), triglyceriden (30 mg/ml) of niet-geconjugerd bilirubine (0,2 mg/ml).

Klinische plasmamonsters van patiënten met verhoogde concentraties van gedefinieerde stoffen of van patiënten met de ziekten die staan vermeld in Tabel 12 zijn getest met de Aptima HBV Quant Assay. Er is geen interferentie in de prestaties van de assay waargenomen.

Tabel 12: Geteste klinische monstertypes

<b>Klinische-monstertypes</b>	
<b>1</b>	Antinucleaire antistoffen (ANA)
<b>2</b>	Reumatoïde factor (RF)
<b>3</b>	Alcoholcirrose (AC)
<b>4</b>	Alcoholische hepatitis
<b>5</b>	Non-alcoholische hepatitis
<b>6</b>	Auto-immune hepatitis
<b>7</b>	Verhoogde alanineaminotransferase (ALT)
<b>8</b>	Hepatocellulair carcinoom (HCC)
<b>9</b>	Multipele sclerose (MS)
<b>10</b>	Systemische lupus erythematoses (SLE)
<b>11</b>	Hyperglobulinemia
<b>12</b>	Reumatoïde artritis (RA)
<b>13</b>	Anti-Jo-1-antistoffen (JO-1)
<b>14</b>	Multipel myeloom (MM)
<b>15</b>	Gehemolyseerd (verhoogde hemoglobine)
<b>16</b>	Icterisch (verhoogde bilirubine)
<b>17</b>	Lipemisch (verhoogde lipiden)
<b>18</b>	Verhoogde proteïnen
<b>19</b>	HBV-antistoffen (gevaccineerd)
<b>20</b>	HCV-antistoffen
<b>21</b>	HIV-1 en HIV-2 antistoffen



Er is geen interferentie in de prestaties van de assay waargenomen in aanwezigheid van de exogene stoffen die staan vermeld in Tabel 13 bij concentraties die minstens drie keer de  $C_{max}$  (humaan plasma) zijn.

Tabel 13: Exogene stoffen

Pool me exogene stoffen	Geteste exogene stoffen
1	Saquinavir-, ritonavir-, amprenavir-, indinavir-, lopinavir-, nelfinavirmesyfaat
2	Clarithromycin, valganciclovirhydrochloride, efavirenz, nevirapine
3	Paroxetine HCl, enfuvirtide, zidovudine, didanosine, abacavirsulfaat
4	Ribavirin, entecavir, adefovir dipivoxil, tenofovir disoproxilfumaraat, lamivudine, ganciclovir, acyclovir
5	Stavudine, ciprofloxacin, fluoxetine, azithromycine, valacyclovir, sertraline, zalcitabine
6	Interferon alpha-2a, interferon alpha-2b, gepegyleerd interferon alpha-2b

## Specificiteit

De specificiteit werd bepaald op basis van 292 verse en 747 bevroren klinische HBV-negatieve klinische monsters. In totaal zijn 521 plasma- en 518 serummonsters getest. De specificiteit werd berekend als het percentage HBV-negatieve monsters met 'Niet aangetroffen' als resultaat. HBV-DNA werd niet aangetroffen in 1038 monsters. De specificiteit was 99,9% (1038/1039, 95% BI: 99,5 -100%).

Tabel 14: Specificiteit in klinische plasma- en serummonsters

	Vers plasma	Bevroren plasma	Plasmatotaal	Vers serum	Bevroren serum	Serumtotaal	Gecombineerd
Geldige replica's (n)	145	376	521	147	371	518	1.039
Niet aangetroffen	145	376	521	147	370	517	1.038
<b>Specificiteit (95% BI)</b>	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)

BI = betrouwbaarheidsinterval

## Analytische specificiteit

Potentiële kruisreactiviteit tegen pathogenen uit Tabel 15 werd geëvalueerd in HBV-negatief humaan plasma in de aanwezigheid of afwezigheid van 4,3 log IE/ml HBV-DNA. Er werd geen kruisreactiviteit of interferentie geobserveerd in bacterieel besmet plasma of in monsters van patiënten die besmet zijn met andere door bloed overgedragen pathogenen of die geen HBV- of griepvaccins hadden gekregen.

Tabel 15: Pathogenen die zijn getest op analytische specificiteit

Micro-organisme/Pathoogeen	Bron	Micro-organisme/Pathoogeen	Bron
Hepatitis-C-virus	Klinisch monster	Humaan herpesvirus type 8	Cultuurvloeistof
Hepatitis-A-virus	Klinisch monster	Japanse-encefalitisvirus	Ascitische vloeistof
HBV-gevaccineerd	Klinisch monster	Murray-Valley-encefalitisvirus	Cellysaat
HIV-1 en HIV-2	Klinisch monster	Saint-Louis-encefalitisvirus	Cultuurvloeistof
Humaan T-cel-lymfotroopvirus type 1 en 2	Klinisch monster	Vacciniavirus	Cellysaat
Parvovirus B19	Klinisch monster	Gelekoortsvirus	Cultuurvloeistof
Cytomegalovirus	Klinisch monster	<i>Candida albicans</i>	Cultuur
Dengue-virus type 1-4	Klinisch monster	<i>Chlamydia trachomatis</i>	Cultuur
Epstein-Barr-virus	Klinisch monster	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Cultuur
Griep gevaccineerd	Klinisch monster	<i>Mycobacterium gordonae</i>	Cultuur
Humaan papillomavirus	Klinisch monster	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	Cultuur
Herpes simplex virus 1 en 2	Klinisch monster	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Cultuur
Rubellavirus	Klinisch monster	<i>Propionibacterium acnes</i>	Cultuur
Varicella zoster-virus	Klinisch monster	<i>Staphylococcus aureus</i>	Cultuur
West-Nijlvirus	Klinisch monster	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Cultuur
BK humaan polyomavirus	Cellysaat	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Cultuur
Humaan herpesvirus 6B	Cultuurvloeistof	<i>Trichomonas vaginalis</i>	Cultuur

## Herhaalbaarheid van klinische monsters

Herhaalbaarheid werd geëvalueerd op basis van testen met drie replica's van op natuurlijke wijze geïnfecteerde HBV-positieve klinische plasma- en serummonsters. De gemiddelde concentratie en standaarddeviatie voor de geteste plasma- en serummonsters assay worden weergegeven in Tabellen 16 en 17.

Tabel 16: Herhaalbaarheid van klinische plasmamonsters

Plasmamonster	Gemiddelde concentratie (log IE/ml)	SD
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

SD = standaarddeviatie

Tabel 17: Herhaalbaarheid van klinische serummonsters

Serummonster	Gemiddelde concentratie (log IE/ml)	SD
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

SD = standaarddeviatie

### Monsterverdunning met behulp van een monsterverdunningsmiddel

Ter bepaling van het herstel van HBV-DNA in monsters die waren verdund met Aptima-monsterverdunningsmiddel, werden plasma- en serummonsters die het lineaire bereik omspannen 1:3 verdund met Aptima-monsterverdunningsmiddel. Daarnaast werden op natuurlijke wijze geïnfecteerde klinische monsters met een hoge titer en HBV-DNA gespikete monsters met concentraties hoger dan de ULoQ 1:100 verdund met Aptima-monsterverdunningsmiddel. Elk monster werd in drievoud onverdund getest en verdund (1:3 of 1:100). Het verschil tussen de gemiddelde gerapporteerde concentratie (verdunningsfactor toegepast op het resultaat van het verdunde monster) en de gemiddelde onverdunde concentratie wordt weergegeven in Tabel 18 voor plasma en in Tabel 19 voor serum. De monsterconcentraties werden nauwkeurig uit de verdunde monsters gehaald.

Tabel 18: Monsterverdunning met Aptima-monsterverdunningsmiddel in plasma

Verdunning	Gemiddelde onverdunde concentratie (log IE/ml)	Gemiddelde gerapporteerde concentratie <sup>a</sup> (log IE/ml)	Vershil (log IE/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
	8,17	8,05	-0,12
1:100	8,17	7,82	-0,35
	> 9,00 <sup>b</sup> (10,20 <sup>c</sup> )	10,40	0,20

<sup>a</sup> De gerapporteerde concentratie is de waarde die is berekend nadat de verdunningsfactor is toegepast.

<sup>b</sup> Gespiket monster.

<sup>c</sup> Waarde van targetconcentratie is hoger dan de ULoQ (bovengrens voor kwantificering).

Tabel 19: Monsterverdunning met Aptima-monsterverdunningsmiddel in serum

Verdunning	Gemiddelde onverdunde concentratie (log IE/ml)	Gemiddelde gerapporteerde concentratie <sup>a</sup> (log IE/ml)	Vershil (log IE/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
1:100	8,47	8,31	-0,16
	8,47	8,19	-0,28
	> 9,00 <sup>b</sup> (10,20 <sup>c</sup> )	10,43	0,23

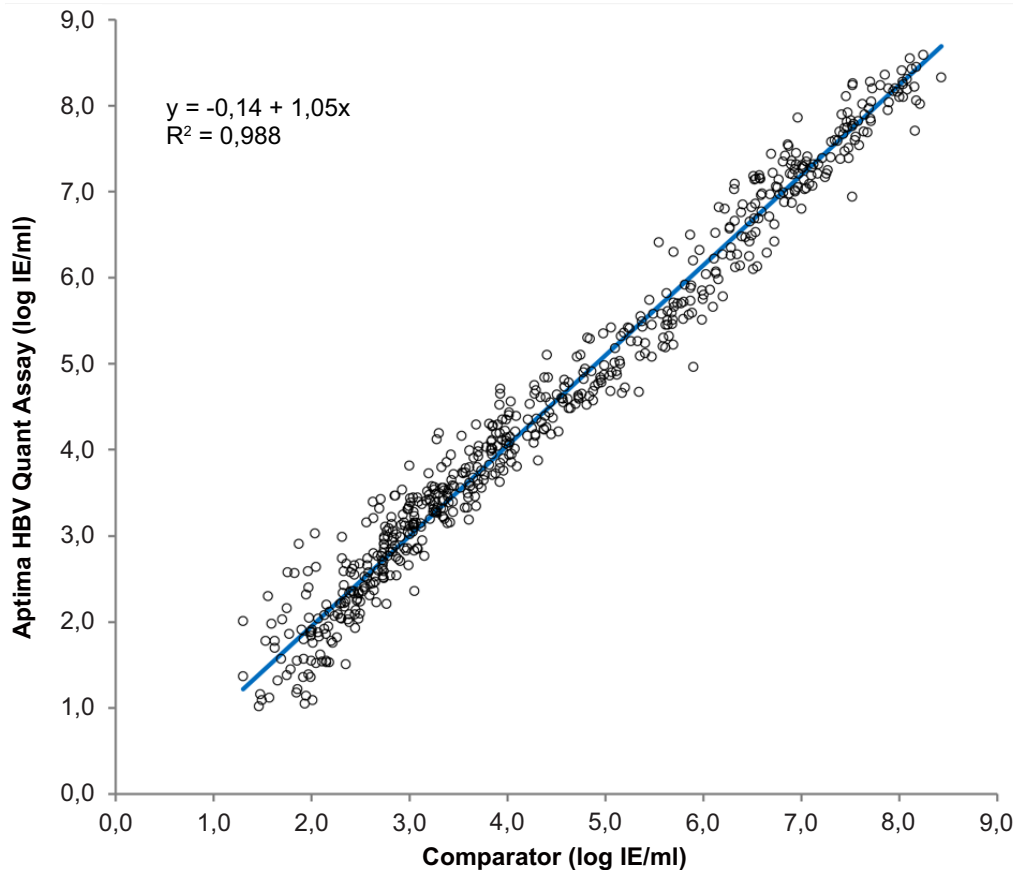
<sup>a</sup> De gerapporteerde concentratie is de waarde die is berekend nadat de verdunningsfactor is toegepast.

<sup>b</sup> Gespiket monster.

<sup>c</sup> Waarde van targetconcentratie is hoger dan de ULoQ (bovengrens voor kwantificering).

## Correlatie van methoden

De prestaties van de Aptima HBV Quant Assay werden beoordeeld tegenover een vergelijkende assay met CE-markering en een licentie van Health Canada, door de onverdunde klinische monsters van met HBV besmette patiënten te testen. Een totaal van 614 klinische monsters binnen het lineaire bereik, gemeenschappelijk voor beide testen, werden gebruikt voor de lineaire regressie zoals weergegeven in Afbeelding 8.



**Afbeelding 8. Correlatie tussen de Aptima HBV Quant Assay en de vergelijkende assay**

## Vermenging

Om vast te stellen dat het Panther-systeem het risico van fout-positieve resultaten als gevolg van vermenging minimaliseert, is een studie uitgevoerd met behulp van gespikete panels op drie Panther-systemen. Vermenging werd bepaald met behulp van het HBV-DNA gespikete plasmamonsters met een hoge titer (8 log IE/ml) verspreid in een dambordpatroon tussen HBV-negatieve monsters. Er zijn vijftien runs uitgevoerd voor de testen. Het algehele vermengingspercentage was 0,0% (0/705).

## Literatuur

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.
14. **NIBSC - Confidence in Biological Medicines.** 2014. Medicines & Healthcare products Regulatory Agency. 3rd WHO International Standard for Hepatitis B Virus for Nucleic Acid Amplification Techniques, NIBSC code: 10/264, Potters Bar, Hertfordshire, ENG.



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

**Klantenservice:** +1 800 442 9892  
customersupport@hologic.com  
**Technische ondersteuning:** +1 888 484 4747  
molecularsupport@hologic.com

Ga voor meer informatie naar [www.hologic.com](http://www.hologic.com).



**Hologic BV**  
Da Vincilaan 5  
1930 Zaventem  
Belgium

Hologic, Aptima en Panther zijn handelsmerken en/of gedeponeerde handelsmerken van Hologic, Inc. en/of haar dochterondernemingen in de Verenigde Staten en/of andere landen. Alle andere handelsmerken in deze bijsluiters zijn eigendom van hun respectieve eigenaars.

Dit product is mogelijk beschermd door een of meer Amerikaanse (VS) octrooien vermeld op [www.hologic.com/patents](http://www.hologic.com/patents).

© 2016-2020 Hologic, Inc. Alle rechten voorbehouden.  
AW-13182-1501 Rev. 007  
2020-12