

Aptima™ HBV Quant Assay

Pro diagnostické použití *in vitro*.

Pouze pro export ze Spojených států

Všeobecné informace	2
Určené použití	2
Shrnutí a vysvětlení testu	2
Principy postupu	3
Varování a bezpečnostní opatření	3
Požadavky na skladování a manipulaci s reagensy	6
Odběr a uchování vzorků	7
Vzorky uvnitř systému Panther	10
Přeprava klinických vzorků	10
Systém Panther	11
Reagensy a materiály, které jsou součástí dodávky	11
Požadované materiály, které jsou dodávány samostatně	13
Volitelné materiály	14
Postup testu na systému Panther	14
Poznámky k postupu	18
Kontrola kvality	19
Kalibrace testu	19
Negativní a pozitivní kontroly	19
Vnitřní kalibrátor / vnitřní kontrola	19
Interpretace výsledků	20
Omezení	20
Provedení	21
Mez detekce s použitím 3. mezinárodního standardu WHO	21
Mez detekce napříč HBV genotypy	22
Lineární rozsah	23
Linearita napříč HBV genotypy	24
Dolní mez kvantifikace s použitím 3. mezinárodní normy WHO	24
Stanovení dolní meze kvantifikace napříč genotypy HBV	26
Opakovatelnost	28
Potenciálně rušivé látky	30
Specifita	31
Analytická specifita	32
Opakovatelnost klinických vzorků	33
Ředění vzorku pomocí ředícího roztoku na vzorky	34
Metoda korelace	36
Křížová kontaminace	36
Literatura	37

Všeobecné informace

Určené použití

Aptima HBV Quant Assay (Test Aptima HBV Quant) je test amplifikace nukleových kyselin *in vitro* pro kvantifikaci DNA viru hepatitidy B (HBV) v lidské plazmě a séru na plně automatizovaném systému Panther™.

Plazma může být připravena v kyselině ethylendiamintetraoctové (EDTA), antikoagulačním roztoku citrát-dextróza (ACD) a zkumavkách na přípravu plazmy (PPTs, plasma preparation tubes). Sérum může být připraveno v sérových zkumavkách a zkumavkách pro separaci séra (SSTs, serum separator tubes). Vzorky se testují za použití plně automatizovaného systému Panther® pro zpracování vzorku, amplifikaci a kvantifikaci. Vzorky obsahující HBV genotypy A, B, C, D, E, F, G a H jsou pro kvantifikaci v testu validovány.

Aptima HBV Quant Assay je určený pro použití jako pomůcka při léčbě pacientů s chronickými infekcemi HBV podstupujících antivirovou léčbu HBV. Test může být použit k měření hladin DNA HBV na začátku a během léčby, jako pomoc při hodnocení virové odpovědi na léčbu. Výsledky testu Aptima HBV Quant Assay musí být interpretovány v kontextu všech relevantních klinických a laboratorních nálezů.

Aptima HBV Quant Assay není určen k použití jako screeningový test na HBV v krvi nebo krevních produktech nebo jako diagnostický test k potvrzení přítomnosti infekce HBV.

Shrnutí a vysvětlení testu

Virus hepatitidy B (HBV), jeden z několika virů, o nichž je známo, že způsobují hepatitidu, byl připisován celoživotní infekci HBV, cirhóze jater, rakovině jater, selhání jater a případně smrti. Světová zdravotnická organizace (WHO) uvádí HBV jako jednu z nejběžnějších infekčních chorob na světě. Prevalence infekce HBV a způsob přenosu se po celém světě značně liší. Asi třetina světové populace má sérologickou evidenci o minulé nebo současné infekci HBV s chronickou infekcí HBV, která se vyskytuje u více než 350 milionů lidí na celém světě.^{1,2,3} Infekce HBV vede ke zvýšenému riziku jaterní dekompenzace, cirhózy a hepatocelulárního karcinomu (HCC) s mortalitou 0,5 až 1,2 milionu úmrtí a 5-10 % případů transplantace jater po celém světě ročně.^{4,5} Bez vhodné léčby, intervence a monitorování po diagnóze se 5 letý kumulativní výskyt cirhózy pohybuje v rozmezí 8-20 %. Po rozvoji cirhózy je roční riziko hepatocelulárního karcinomu (HCC) 2-5 %.⁶

HBV obsahuje kruhový, částečně dvouřetězcový DNA genom s přibližně 3 200 páry bází, který kóduje čtyři částečně se překrývající otevřené čtecí rámce (ORF, open reading frames) exprimující polymerázu, povrchový antigen, vnitřní antigen (precore/core) a X proteiny. Polymerázový ORF překrývá ostatní 3 ORF a kóduje klíčový virový replikační protein, polymerázu. Povrchový ORF exprimuje tři proteiny, které jsou nezbytné pro virovou morfogenezi, vstup viru do hepatocytů a vyvolávají imunitní odpověď hostitele.⁷ Existuje 8 genotypů HBV (A-H), které se obvykle vyskytují na různých geografických místech. V současné době se kvantifikace DNA HBV používá ke stanovení, kteří pacienti s chronickou infekcí by měli být léčeni, ke sledování reakce na terapii a k posouzení opětovného výskytu virové zátěže, která může naznačovat rezistenci vůči lékům.⁵

Aptima HBV Quant Assay je test amplifikace nukleových kyselin *in vitro*, který používá technologii transkripce mediované amplifikace (TMA) v reálném čase v systému Panther pro kvantifikaci DNA HBV genotypů A, B, C, D, E, F, G, a H. Aptima HBV Quant Assay se zaměřuje na dvě vysoce konzervované oblasti v polymerázových genech a genech povrchových proteinů (pro zvýšenou toleranci k potenciálním mutacím). Test je standardizován podle 3. standardu WHO pro virus hepatitidy B (kód NIBSC: 10/264).

Principy postupu

Test Aptima HBV Quant Assay zahrnuje tři hlavní kroky, které probíhají v jediné zkumavce v systému Panther: záchyt cíle, amplifikace cíle metodou TMA a detekce produktů amplifikace (amplikonů) pomocí fluorescenčně značených sond (indikátory).

Během záchytu cíle je ze vzorků izolována virová DNA. Na vzorek je použit detergent, aby došlo k solubilizaci virové schránky, denuraci proteinů a uvolnění genomické DNA viru. Zachycené oligonukleotidy hybridizují do vysoce konzervovaných oblastí DNA HBV, jsou-li v testovacím vzorku přítomny. Hybridizovaný cíl je poté zachycen na magnetické mikročástice, které jsou od vzorku odděleny v magnetickém poli. Kroky promývání odstraní z reakční zkumavky nadbytečné složky.

Amplifikace cíle probíhá prostřednictvím TMA, což je metoda transkripčně mediované amplifikace nukleové kyseliny využívající dva enzymy, reverzní transkriptázu a T7 RNA polymerázu Moloneyho viru myší leukemie (MMLV). Reverzní transkriptáza se používá k vytvoření kopie DNA (obsahující promotorovou sekvenci pro T7 RNA polymerázu) cílové sekvence. RNA-polymeráza T7 vytváří vícečetné kopie amplikonu RNA z templátu kopie DNA. Aptima HBV Quant Assay využívá metodu TMA k amplifikaci dvou oblastí genomu HBV (gen polymerázy a gen povrchových proteinů). Amplifikace těchto oblastí je dosaženo pomocí specifických primerů navržených pro amplifikaci genotypů A, B, C, D, E, F, G a H. Přístup s duální cílovou oblastí s designem primerů zaměřených na vysoce konzervované regiony zajišťuje přesnou kvantifikaci DNA HBV.


Detekce se provádí pomocí indikátorů z jednovláknové nukleové kyseliny, které jsou součástí amplifikace cíle a které v reálném čase specificky hybridizují amplikon. Každý indikátor obsahuje fluorofor a zhášec. Když není indikátor hybridizován k amplikonu, je zhášec v těsné blízkosti fluoroforu a potlačuje fluorescenci. Po navázání indikátoru na amplikon se zhášec posune dále od fluoroforu a po excitaci zdrojem světla začne emitovat signál specifické vlnové délky. Čím více indikátorů se hybridizuje k amplikonu, tím větší fluorescenční signál je generován. Čas potřebný k tomu, aby fluorescenční signál dosáhl určené prahové hodnoty, je úměrný počáteční koncentraci HBV. Každá reakce má vnitřní kalibrátor/vnitřní kontrolu (IC, internal calibrator/internal control) kontrolující změny ve zpracování vzorků, amplifikaci a detekci. Koncentrace vzorku je stanovena softwarem systému Panther pomocí signálů HBV a IC pro každou reakci a jejich porovnáním s kalibračními údaji.

Varování a bezpečnostní opatření

- A. Pouze pro diagnostické použití *in vitro*.
- B. Před provedením tohoto testu si pečlivě přečtete celou příbalovou informaci a *Návod k použití systému Panther*. Snížíte tak riziko výskytu neplatných výsledků.
- C. qHBV Reagencie pro zesílení cíle (TER) je korozní. Viz „Pro test“ na straně 5. pro úplný seznam varování.



Pro laboratoř

-  D. UPOZORNĚNÍ: Kontroly pro tento test obsahují lidskou plazmu. Plazma je podle testování dle postupů licencovaných americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léků negativní na povrchový antigen hepatitidy B (HBsAg), protilátky proti HCV, protilátky proti HIV-1 a HIV-2 a antigen HIV. Kromě toho je plazma při testování pomocí licencovaných testů nukleových kyselin s použitím sdílených vzorků nereaktivní pro DNA HBV, RNA HCV a RNA HIV-1. Všechny materiály pocházející z lidské krve by měly být považovány za potenciálně infekční a mělo by se s nimi zacházet v souladu s univerzálními bezpečnostními opatřeními.^{8,9,10}
- E. Tento test mohou používat pouze pracovníci s náležitým školením v použití testu Aptima HBV Quant Assay a v manipulaci s potenciálně infekčními materiály. Dojde-li k rozlítí, ihned proveďte dezinfekci dle příslušných postupů daného pracoviště.
- F. Používejte pouze dodané nebo specifikované jednorázové laboratorní vybavení.
- G. Dodržujte běžná laboratorní bezpečnostní opatření. Nepipetujte ústy. Ve vyhrazených pracovních prostorech nejezte, nepijte ani nekuřte. Při manipulaci se vzorky a reagensy soupravy používejte jednorázové rukavice bez talku, ochranné brýle a laboratorní plášť. Po manipulaci se vzorky a reagensy soupravy si pečlivě omyjte ruce.
- H. Pracovní povrchy, pipety a další vybavení pravidelně dekontaminujte 2,5 % až 3,5 % (0,35 M až 0,5 M) roztokem chlornanu sodného.
- I. Veškeré materiály, které přišly do styku se vzorky a reagensy, zlikvidujte v souladu s místními a národními předpisy.^{8,9,10,11} Důkladně vyčistěte a dezinfikujte všechny pracovní povrchy.
- J. Kontroly obsahují azid sodný jako konzervant. K převádění reagentu nepoužívejte kovové trubičky. Pokud jsou roztoky obsahující sloučeniny azidu sodného vypouštěny do odpadního potrubí, měly by být zředěny a vypláchnuty velkým množstvím vody. Tato opatření se doporučují, aby se zabránilo hromadění usazenin v kovových potrubích, ve kterých by mohlo dojít k vytvoření výbušných podmínek.
- K. Mezi standardy správné praxe molekulárních laboratoří patří monitorování prostředí. Pro monitorování prostředí laboratoře je navržen následující postup:
1. Opatřete si bavlněný tampon a použijte jej v páru se zkumavkami na vzorky Aptima Aliquot (SAT, Specimen Aliquot Tube).
 2. Každou SAT řádně označte.
 3. Každou SAT naplňte 1 ml roztoku na ředění vzorků Aptima.
 4. Chcete-li odebrat vzorky povrchu, tampon lehce navlhčete deionizovanou Nuclease-free vodou.
 5. Otřete určený povrch vertikálním pohybem shora dolů. Při otírání místa otáčejte tamponem přibližně o polovinu otáčky.
 6. Tampon se vzorkem okamžitě vložte do zkumavky a tamponem lehce otáčejte v ředícím roztoku, aby se do roztoku uvolnily materiály potenciálně zachycené na tamponu. Přitiskněte tampon na stěnu transportní zkumavky, aby se uvolnilo co nejvíce kapaliny. Tampon zlikvidujte a zkumavku uzavřete.
 7. Opakujte kroky pro zbývající tampony se vzorky.
 8. Otestujte tampon pomocí molekulárního testu.

Pro vzorky

- L. Vzorky mohou být infekční. Při provádění tohoto testu dodržujte univerzální bezpečnostní opatření^{8,9,10}. Zajistěte správné postupy při manipulaci a likvidaci v souladu s místními nařízeními.¹¹ Tento test mohou používat pouze pracovníci s náležitým školením v použití testu Aptima HBV Quant Assay a v manipulaci s infekčními materiály.

- M. Chcete-li zajistit integritu vzorku, zajistěte při přepravě vzorků vhodné přepravní podmínky. Stabilita vzorků za jiných než doporučených přepravních podmínek nebyla hodnocena.
- N. Při manipulaci se vzorky zabraňte křížové kontaminaci. Dávejte zvláštní pozor, aby nedošlo ke kontaminaci rozstříkáváním aerosolů při uvolňování nebo otevírání vzorků. Vzorky mohou obsahovat extrémně vysoké koncentrace organismů. Zajistěte, aby se jednotlivé nádoby na vzorky vzájemně nedotýkaly, a použité materiály při likvidaci nepřenášejte nad otevřenými nádobami. Pokud se vzorku dotknete, vyměňte si rukavice.

Pro test

- O. Nepoužívejte souprava reagensů, kalibrátor a kontroly po datu expirace.
- P. Nezaměňujte, nemíchejte ani nekombinujte reagenty testu ze souprav s různými čísly hlavní šarže. Kapaliny testu mohou mít různá čísla šarží. Kontroly a kalibrátor mohou mít různá čísla šarží.
- Q. Zabraňte mikrobiální a nukleázové kontaminaci reagensů.
- R. Všechny reagenty testu uzavřete a uchovávejte při uvedené teplotě. Fungování testu může být negativně ovlivněno použitím nesprávně uchovávaných reagensů. Další informace viz *Požadavky na skladování a manipulaci s reagensy a Postup testu na systému Panther*.
- S. Nekombinujte žádné reagenty ani kapaliny testu, pokud k tomu neobdržíte výslovný pokyn. Reagenty ani kapaliny nedolévejte. Systém Panther ověřuje hladiny reagensů.
- T. Vyvarujte se kontaktu reagenty pro zesílení cíle s kůží, očima a sliznicemi. Pokud dojde ke kontaktu s touto reagenty, opláchněte se vodou. Pokud dojde k rozlití této reagenty, zředte ji vodou a postupujte podle příslušných postupů na pracovišti.
- U. Některé reagenty v sadě jsou označeny výstražnými symboly nebezpečnosti a bezpečnostními symboly.

Poznámka: Informace o nebezpečí jsou v souladu s klasifikacemi bezpečnostních listů (BL) EU. Informace o nebezpečí specifické pro vaši oblast naleznete v BL specifickém pro danou oblast v knihovně bezpečnostních listů na adrese www.hologicds.com.


	Kontroly sady HBV VL
	Azid sodný 0,2 % Lidské sérum 95-100 %
	VAROVÁNÍ H312 - Zdraví škodlivý při styku s kůží H412 - Škodlivý pro vodní organismy, s dlouhodobými účinky P273 - Zabraňte uvolnění do životního prostředí P280 - Používejte ochranné rukavice / ochranný oděv / ochranné brýle / obličejový štít
	Reagenty pro zesílení cíle Hydroxid lithný, monohydrát 5-10 %
	NEBEZPEČÍ H302 - Zdraví škodlivý při požití H314 - Způsobuje těžké poleptání kůže a poškození očí P260 - Nevdechujte prach/dým/plyn/mlhu/páry/aerosoly P280 - Používejte ochranné rukavice / ochranný oděv / ochranné brýle / obličejový štít P303 + P361 + P353 - PŘI STYKU S KŮŽÍ (nebo s vlasy): Veškeré kontaminované části oděvu okamžitě svlékněte. Opláchněte kůži vodou/osprchujte se P305 + P351 + P338 - PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně vyplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, jsou-li nasazeny a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování P310 - Okamžitě volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO nebo lékaře

Požadavky na skladování a manipulaci s reagensiiemi

- A. V následující tabulce jsou uvedeny skladovací podmínky a stabilita reagensii, kontrol a kalibrátoru.

Reagencie	Skladování v neotevřeném stavu	Otevřená souprava (po rekonstituci)	
		Skladování	Stabilita
Amplifikační reagencie qHBV	2 °C až 8 °C		
Rekonstituční roztok pro amplifikaci qHBV	2 °C až 8 °C	2 °C až 8 °C	30 dní ^a
Enzymová reagencie qHBV	2 °C až 8 °C		
Rekonstituční roztok pro enzymy qHBV	2 °C až 8 °C	2 °C až 8 °C	30 dní ^a
Promotorová reagencie qHBV	2 °C až 8 °C		
Rekonstituční roztok pro promotor qHBV	2 °C až 8 °C	2 °C až 8 °C	30 dní ^a
Reagencie pro záchyt cíle qHBV	2 °C až 8 °C	2 °C až 8 °C	30 dní ^a
qHBV PCAL (pozitivní kalibrátor)	-15 °C až -35 °C	15 °C až 30 °C	Jednorázová lahvička Použijte do 24 hodin
qHBV NC CONTROL – (negativní kontrola)	-15 °C až -35 °C	15 °C až 30 °C	Jednorázová lahvička Použijte do 24 hodin
qHBV LPC CONTROL + (nízká pozitivní kontrola)	-15 °C až -35 °C	15 °C až 30 °C	Jednorázová lahvička Použijte do 24 hodin
qHBV HPC CONTROL + (vysoká pozitivní kontrola)	-15 °C až -35 °C	15 °C až 30 °C	Jednorázová lahvička Použijte do 24 hodin
Reagencie pro zesílení cíle qHBV	15 °C až 30 °C	15 °C až 30 °C	30 dní ^a

^a Po vyjmutí reagensii ze systému Panther je nutné je ihned vrátit zpět do prostředí s vhodnou skladovací teplotou.

- B. Zlikvidujte veškeré nepoužité rekonstituované reagensie, reagensie pro záchyt cíle (TCR) a reagensie pro zesílení cíle (TER) po 30 dnech nebo po uplynutí data expirace hlavní šarže podle toho, která situace nastane dříve.
- C. Reagensie uložené v systému Panther mají stabilitu v přístroji po dobu 72 hodin. Reagensie lze do systému Panther zavést až 5 krát. Systém Panther zaznamenává každé zavedení reagensii.
- D. Po rozmrazení kalibrátoru musí být roztok čirý, tj. nesmí být zakalený nebo obsahovat sraženiny.
-  E. Reagensie promotoru a rekonstituovaná reagensie promotoru jsou fotosenzitivní. Při skladování a přípravě k použití chraňte tyto reagensie před světlem.
- F. Reagensie pro zesílení cíle qHBV musí být před použitím uloženy při teplotě 15 °C až 30 °C.

Odběr a uchovávání vzorků

Poznámka: Všechny vzorky je nutné považovat za potenciálně infekční. Dodržujte univerzální bezpečnostní opatření.

Poznámka: Dávejte pozor, aby při manipulaci se vzorky nedošlo ke křížové kontaminaci. Například při likvidaci nepřenášejte použitý materiál nad otevřenými zkumavkami.

Poznámka: K uchovávání se doporučují pouze plastové sekundární zkumavky.

Lze použít vzorky plné krve odebrané do následujících skleněných nebo plastových zkumavek:

- Zkumavky obsahující antikoagulanty EDTA nebo ACD
- zkumavky na přípravu plazmy (PPT)
- Sérové zkumavky
- Zkumavky pro separaci séra (SST)

Pokud jde o sérum, nechejte před dalším zpracováním vytvořit sraženinu.

A. Odběr klinických vzorků

Celá krev může být uchovávána při teplotě 2 °C až 30 °C a musí být odstředěna do 24 hodin po odběru vzorků. Oddělte plazmu nebo sérum od peletovaných červených krvinek dle pokynů výrobce použitých zkumavek. Plazmu nebo sérum lze v systému Panther testovat v primární zkumavce nebo přenést do sekundární zkumavky, například zkumavky na vzorky Aptima Aliquot. Pro získání reakčního objemu 500 µl je minimální objem plazmy nebo séra pro primární odběrovou zkumavku až 1200 µl a pro sekundární zkumavky je minimální objem 700 µl. Následující tabulka uvádí požadavky na mrtvý objem pro každý typ primární a sekundární zkumavky.

Zkumavka (velikost a typ)	Mrtvý objem v systému Panther
Zkumavka na vzorky Aptima Aliquot (SAT)	0,2 ml
12 x 75 mm	0,5 ml
13 x 100 mm	0,5 ml
13 x 100 mm s gelem	0,3 ml
16 x 100 mm s gelem	0,7 ml

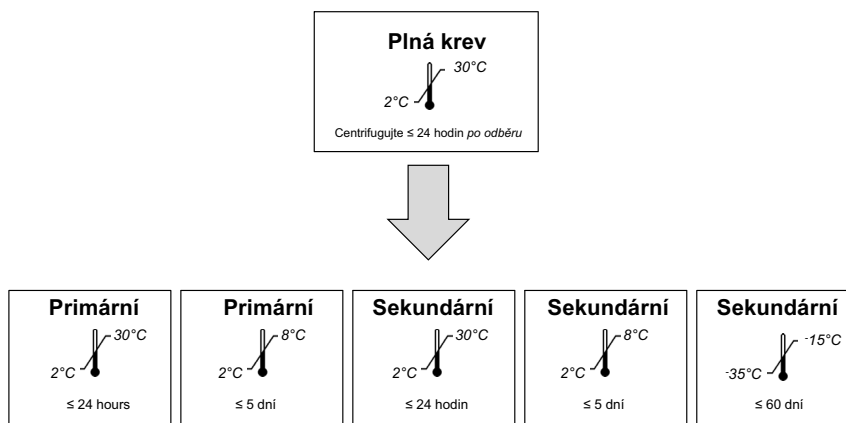
Pokud nejsou testovány okamžitě, lze plazmu a sérum uchovávat v souladu s níže uvedenými specifikacemi. Pokud jsou převedeny do sekundární zkumavky, mohou být plazma nebo sérum zmrazeny na teplotu -20 °C. Nepřekračujte 3 cykly zmrazení-rozpuštění. Nezmrazujte vzorky v EDTA, ACD nebo v sérum v primárních odběrových zkumavkách.

B. Podmínky uchovávání vzorků

1. Vzorky plazmy v EDTA a ACD

Celá krev může být uchovávána při teplotě 2 °C až 30 °C a musí být odstředěna do 24 hodin po odběru vzorků. Plazma může být poté uchovávána za jedné z následujících podmínek:

- V primární odběrové zkumavce nebo sekundární zkumavce při teplotě 2 °C až 30 °C po dobu až 24 hodin,
- v primární odběrové zkumavce nebo sekundární zkumavce při teplotě 2 °C až 8 °C po dobu až 5 dnů nebo
- v sekundární zkumavce při teplotě -20 °C po dobu až 60 dnů.

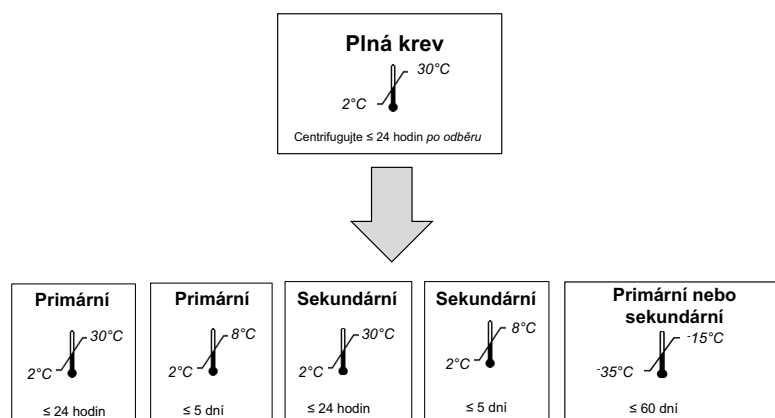


Obrázek 1. Podmínky uchování pro zkumavky s EDTA/ACD

2. Vzorky v PPT

Celá krev může být uchována při teplotě 2 °C až 30 °C a musí být odstředěna do 24 hodin po odběru vzorků. Plazma může být poté uchována za jedné z následujících podmínek:

- V PPT nebo sekundární zkumavce při teplotě 2 °C až 30 °C po dobu až 24 hodin,
- v PPT nebo sekundární zkumavce při teplotě 2 °C až 8 °C po dobu až 5 dnů nebo
- v PPT nebo sekundární zkumavce při teplotě -20 °C po dobu až 60 dnů.

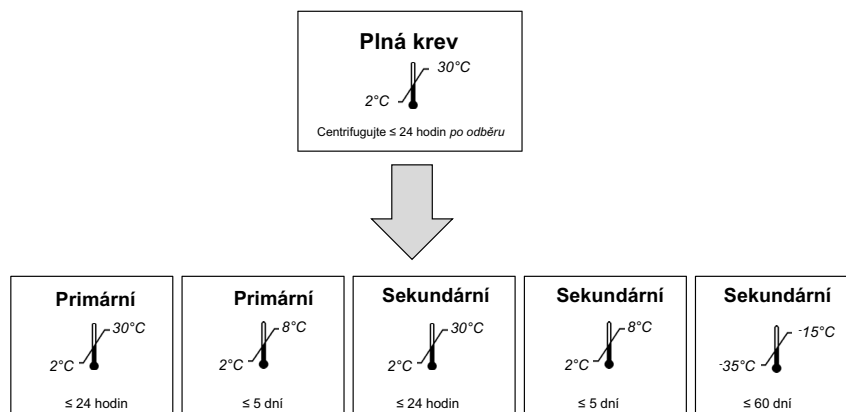


Obrázek 2. Podmínky uchování pro PPT

3. Sérové zkumavky se vzorkem

Celá krev může být uchovávána při teplotě 2 °C až 30 °C a musí být odstředěna do 24 hodin po odběru vzorků. Sérum může být poté uchováváno za jedné z následujících podmínek:

- V sérové zkumavce nebo sekundární zkumavce při teplotě 2 °C až 30 °C po dobu až 24 hodin,
- v sérové zkumavce nebo sekundární zkumavce při teplotě 2 °C až 8 °C po dobu až 5 dnů nebo
- v sekundární zkumavce při teplotě -20 °C po dobu až 60 dnů.

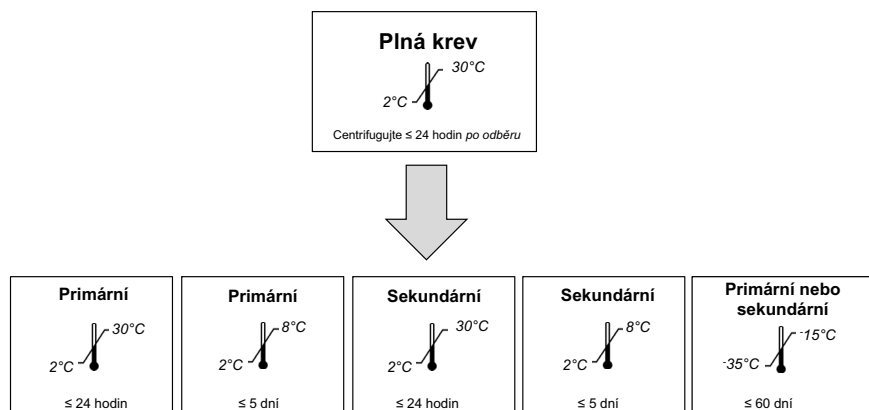


Obrázek 3. Podmínky uchovávání pro sérové zkumavky

4. Vzorky v SST

Celá krev může být uchovávána při teplotě 2 °C až 30 °C a musí být odstředěna do 24 hodin po odběru vzorků. Sérum může být poté uchováváno za jedné z následujících podmínek:

- V SST nebo sekundární zkumavce při teplotě 2 °C až 30 °C po dobu až 24 hodin,
- v SST nebo sekundární zkumavce při teplotě 2 °C až 8 °C po dobu až 5 dnů nebo
- v SST nebo sekundární zkumavce při teplotě -20 °C po dobu až 60 dnů.



Obrázek 4. Podmínky skladování pro SST

C. Dlouhodobé skladování ve zmrazeném stavu

Vzorky plazmy nebo séra mohou být skladovány při teplotě -65 °C až -85 °C po dobu až 60 dnů v SAT.

D. Ředění vzorků plazmy a séra

Vzorky plazmy a séra mohou být pro testování v systému Panther zředěny v SAT nebo sekundární zkumavce. Pro více informací viz *Postup testu na systému Panther*, odstavec E „Manipulace se vzorkem“, krok 6.

Poznámka: Pokud je vzorek naředěn, měl by být testován ihned po naředění. Zředěný vzorek nezmrazujte.

Vzorky uvnitř systému Panther

Vzorky mohou být v systému Panther ponechány neuzavřené po dobu až 8 hodin. Vzorky mohou být odebrány ze systému Panther a testovány, dokud celkový čas uvnitř systému nepřesáhne před pipetováním vzorku systémem Panther 8 hodin.

Přeprava klinických vzorků

Udržujte podmínky uchovávání vzorků, jak popisuje *Odběr a uchovávání vzorků*.

Poznámka: Vzorky je nutné odeslat v souladu s platnými národními, mezinárodními a místními pravidly pro přepravu.

Systém Panther

Níže jsou uvedeny reagentie testu Aptima HBV Quant Assay pro systém Panther. Vedle názvu reagentie jsou rovněž uvedeny symboly pro identifikaci reagentií.

Reagentie a materiály, které jsou součástí dodávky

Poznámka: Rizikové a bezpečnostní informace související s reagentiemi naleznete v knihovně bezpečnostních datových listů na adrese www.hologic.com/sds.

Souprava testu Aptima HBV Quant Assay, 100 testů, (kat. č. PRD-03424)

(1 krabička testu, 1 kalibrační souprava, 1 kontrolní souprava a 1 krabička reagentie pro zesílení cíle)

Další kalibrátory a kontroly lze objednat samostatně. Viz jednotlivá katalogová čísla níže.

Krabička testu Aptima HBV Quant Assay

(po přijetí uchovávejte při teplotě 2 °C až 8 °C)

Symbol	Složka	Množství
A	Amplifikační reagentie qHBV <i>Neinfekční nukleové kyseliny vysušené v pufrovaném roztoku.</i>	1 lahvička
E	Enzymová reagentie qHBV <i>Vysušená reverzní transkriptáza a RNA-polymeráza v pufrovaném roztoku HEPES.</i>	1 lahvička
PRO	Promotorová reagentie qHBV <i>Neinfekční nukleové kyseliny vysušené v pufrovaném roztoku.</i>	1 lahvička
AR	Rekonstituční roztok pro amplifikaci qHBV <i>Vodný roztok obsahující glycerol a konzervační látky.</i>	1 x 7,2 ml
ER	Rekonstituční roztok pro enzymy qHBV <i>Roztok pufrovaný HEPES obsahující surfaktant a glycerol.</i>	1 x 5,8 ml
PROR	Rekonstituční roztok pro promotor qHBV <i>Vodný roztok obsahující glycerol a konzervační látky.</i>	1 x 4,5 ml
TCR	Reagentie pro záchyt cíle qHBV <i>Nukleové kyseliny v pufrovaném solném roztoku obsahujícím pevnou fázi, neinfekční nukleové kyseliny a vnitřní kalibrátor.</i>	1 x 72,0 ml
	Rekonstituční objímky	3
	List s čárovým kódem hlavní šarže	1 list

Kalibrační souprava Aptima HBV Quant (kat. č. PRD-03425)
(po přijetí uchovávejte při teplotě -15 °C až -35 °C)

Symbol	Složka	Množství
PCAL	Pozitivní kalibrátor qHBV <i>Plazmidová DNA v pufovaném roztoku</i>	5 x 2,5 ml
	Štítek čárového kódu kalibrátoru	–

Souprava kontrol Aptima HBV Quant (kat. č. PRD-03426)
(po přijetí uchovávejte při teplotě -15 °C až -35 °C)

Symbol	Složka	Množství
NC	Negativní kontrola qHBV <i>HBV negativní defibrinovaná lidská plazma obsahující gentamicin a 0,2 % azid sodný jako konzervanty.</i>	5 x 0,8 ml
LPC	Nízká pozitivní kontrola qHBV <i>Inaktivovaná HBV pozitivní plazma v defibrinované lidské plazmě obsahující gentamicin a 0,2 % azid sodný jako konzervanty.</i>	5 x 0,8 ml
HPC	Vysoká pozitivní kontrola qHBV <i>Inaktivovaná HBV pozitivní plazma v defibrinované lidské plazmě obsahující gentamicin a 0,2 % azid sodný jako konzervanty.</i>	5 x 0,8 ml
	Štítek s čárovým kódem kontroly	–

Krabička s reagensy pro zesílení cíle Aptima HBV Quant
(po přijetí uchovávejte při teplotě 15 °C až 30 °C)

Symbol	Složka	Množství
TER	Reagencie pro zesílení cíle qHBV <i>Koncentrovaný roztok hydroxidu lithného</i>	1 x 46,0 ml

Požadované materiály, které jsou dodávány samostatně

Poznámka: Není-li uvedeno jinak, materiály dodávané společností Hologic mají uvedeno katalogové číslo.

Materiál	Kat. č.
Systém Panther	–
Testovací souprava Panther pro testování v reálném čase (pouze pro testy v reálném čase)	PRD-03455 (5000 testů)
<i>Souprava kapalin pro test Aptima (rovněž známá jako univerzální souprava kapalin)</i>	303014 (1000 testů)
<i>obsahuje promývací roztok Aptima, pufr Aptima pro deaktivaci kapaliny a olejovou reagensii Aptima</i>	
<i>Vícezkumavkové jednotky (MTU)</i>	104772-02
<i>Souprava odpadních vaků Panther</i>	902731
<i>Kryt odpadního koše Panther</i>	504405
Nebo testovací souprava systému Panther	
<i>(při provádění testů TMA neprobíhajících v reálném čase paralelně s testy TMA probíhajícími v reálném čase)</i>	303096 (5000 testů)
<i>obsahuje MTU, odpadní vaky, kryty odpadních košů, automatickou detekci a testovací kapaliny</i>	
Špičky, 1000 µl, vodivé, pro snímání tekutin	10612513 (Tecan)
Bělidlo, 5 % až 7 % (0,7 M až 1,0 M) roztok chlornanu sodného	–
Jednorázové rukavice bez talku	–
Náhradní uzávěry pro reagensie	
<i>Rekonstituční lahvičky pro amplifikační, enzymovou a promotorovou reagensii</i>	CL0041 (100 uzávěrů)
<i>Lahvička TCR</i>	CL0040 (100 uzávěrů)
<i>Lahvička TER</i>	501604 (100 uzávěrů)
Kryty laboratorních stolů s plastovou vrstvou	–
Utěrky neuvolňující vlákna	–
Pipetor	–
Špičky	–
Druhy primární odběrové zkumavky:	
<i>13 mm x 100 mm</i>	–
<i>13 mm x 75 mm</i>	–
<i>16 mm x 100 mm</i>	–
Centrifuga	–
Vortex mixér	–

Volitelné materiály

Materiál	Kat. č.
Druhy sekundárních zkumavek:	
12 mm x 75 mm	–
13 mm x 100 mm	–
16 mm x 100 mm	–
Zkumavky na vzorky Aptima Aliquot (SAT) (100 balení)	503762
Uzávěr přepravní zkumavky (100 balení), uzávěr pro SAT	504415
Roztok na ředění vzorků Aptima	PRD-03003
Souprava roztoku na ředění vzorků Aptima obsahuje roztok na ředění vzorků, 100 SAT a 100 uzávěrů	PRD-03478
Pipety pro přenos	–
Komerčně dostupné panely, například: HBV panely od Quality Control for Molecular Diagnostics (QCMD)	–
Bavlněné tampóny	–
Zásobník se zkumavkami	–

Postup testu na systému Panther

Poznámka: Další informace o postupu naleznete v návodu k použití systému Panther.

A. Příprava pracovní plochy

- Očistěte pracovní povrchy na místě, kde budete připravovat reagenty. Otřete pracovní povrchy 2,5 % až 3,5 % (0,35 M až 0,5 M) roztokem chlornanu sodného. Roztok chlornanu sodného nechte působit na kontaktní povrchy alespoň 1 minutu a poté je opláchněte deionizovanou vodou (DI). Roztok chlornanu sodného nenechte zaschnout. Pokryjte pracovní desku laboratorního stolu čistým absorpčním ubrusem s plastovou vrstvou.
- Očistěte samostatný pracovní povrch, na kterém budete připravovat vzorky. Dodržujte výše uvedený postup (krok A.1).
- Vyčistěte všechny pipety. Použijte výše uvedený postup čištění (krok A.1).

B. Příprava kalibrátoru a kontrol

Před zpracováním nechte kalibrátor a kontroly dosáhnout teplotu 15 °C až 30 °C tímto způsobem:

- Vyjměte kalibrátor a kontroly z prostoru pro uchování (-15 °C až -35 °C) a umístěte je při teplotě 15 °C až 30 °C. Během procesu rozmrazování každou zkumavku opatrně obraťte, aby se důkladně promíchala. Před použitím se ujistěte, že je obsah zkumavky úplně rozmrazený.

Volitelná možnost. Zkumavky kalibrátoru a kontroly mohou být umístěny v zásobníku se zkumavkami pro důkladné promíchání. Před použitím se ujistěte, že je obsah zkumavky úplně rozmrazený.

Poznámka: Při převracení kalibrátoru a kontrol zabraňte vytvoření nadměrného množství pěny. Pěna narušuje funkci snímání hladiny systémem Panther.

- Po rozmrazení obsahu zkumavky vysušte vnější stranu zkumavky čistým suchým jednorázovým ubrouskem.
- V tuto chvíli zkumavky neotevírejte, abyste zabránili kontaminaci.

C. Rekonstituce/příprava reagensie z nové soupravy

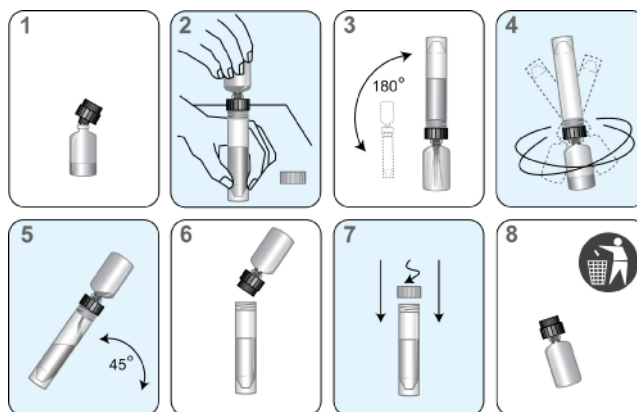
Poznámka: Rekonstituci reagensie je nutné provést před zahájením veškerých prací na systému Panther.

1. Chcete-li připravit reagensii pro záchyt cíle (TCR), proveďte následující kroky:
 - a. Vyjměte TCR z prostoru pro uchovávání (2 °C až 8 °C). Zkontrolujte číslo šarže na lahvičce TCR a ujistěte se, že odpovídá číslu šarže na listu čárového kódu hlavní šarže.
 - b. Lahvičku TCR okamžitě 10 krát silně protřepejte. Ponechejte lahvičku TCR alespoň 45 minut při teplotě 15 °C až 30 °C, aby se zahřála. Během této doby s lahvičkou TCR zakružte a převraťte ji nejméně každých 10 minut.

Volitelná možnost. Lahvička TCR může být připravena na zásobníku se zkumavkami podle těchto pokynů: Vyjměte TCR z prostoru pro uchovávání (2 °C až 8 °C) a okamžitě 10 krát silně protřepejte. Umístěte lahvičku TCR na zásobník se zkumavkami a nechte TCR při teplotě 15 °C až 30 °C zahřát po dobu nejméně 45 minut.
 - c. Zajistěte, aby byla veškerá sraženina v roztoku a magnetické částice byly před použitím suspendovány.
2. Chcete-li rekonstituovat amplifikační, enzymovou a promotorovou reagensii, postupujte takto:
 - a. Lyofilizované reagensie a odpovídající rekonstituční roztoky vyjměte z prostoru pro uchovávání (2 °C až 8 °C). Každý rekonstituční roztok spárujte s odpovídající lyofilizovanou reagensií.
 - b. Zajistěte, aby rekonstituční roztok a lyofilizovaná reagensie měly shodné barvy na štítku. Zkontrolujte čísla šarže na listu s čárovým kódem hlavní šarže, abyste zajistili správné spárování reagensií.
 - i. Otevřete lahvičku s lyofilizovanou reagensií odstraněním kovového těsnění a gumové zátky.
 - ii. Pevně nasuňte konec rekonstituční objímky se zářezem (černý) na lahvičku (Obrázek 5, krok 1).
 - iii. Otevřete odpovídající lahvičku s rekonstitučním roztokem a uzávěr odložte na čistý a zakrytý pracovní povrch.
 - iv. Umístěte lahvičku s rekonstitučním roztokem na stabilní povrch (tj. na pracovní stůl). Poté otočte lahvičku s lyofilizovanou reagensií na lahvičku s rekonstitučním roztokem a k lahvičce s rekonstitučním roztokem pevně připojte objímku (Obrázek 5, krok 2).
 - v. Pomalu obraťte spojené lahvičky (lahvička připojená k lahvičce s roztokem), aby roztok mohl vytéct do skleněné lahvičky (Obrázek 5, krok 3).
 - vi. Zvedněte spojené lahvičky a otáčejte s nimi po dobu alespoň 10 sekund (Obrázek 5, krok 4).
 - vii. Počkejte nejméně 30 minut, než lyofilizovaná reagensie přejde do roztoku.
 - viii. Poté, co lyofilizovaná reagensie přešla do roztoku, otáčejte se spojenými lahvičkami po dobu alespoň 10 sekund a poté s roztokem ve skleněné lahvičce jemně zatřepejte tam a zpět, aby se důkladně promíchal.
 - c. Spojené lahvičky znovu pomalu nakloňte, aby veškerý roztok mohl vytéct zpět do lahvičky s rekonstitučním roztokem (Obrázek 5, krok 5).
 - d. Opatrně odstraňte rekonstituční objímku a skleněnou lahvičku (Obrázek 5, krok 6).

- e. Znovu uzavřete lahvičku uzávěrem. Na štítek запиšte iniciály obsluhy a datum rekonstituce (Obrázek 5, krok 7).
- f. Odstraňte rekonstituční objímku a skleněnou lahvičku (Obrázek 5, krok 8).

Varování: Při rekonstituci reagensů zabraňte nadměrné tvorbě pěny. Pěna narušuje funkci snímání hladiny systémem Panther.



Obrázek 5. Proces rekonstituce reagentie

3. Vyjměte reagentie pro zesílení cíle qHBV z prostoru pro uchovávání (15 °C až 30 °C). Na štítek запиšte iniciály obsluhy a datum otevření. Zkontrolujte číslo šarže na lahvičce TER a ujistěte se, že odpovídá číslu šarže na listu čárového kódu hlavní šarže.
- D. Příprava u již dříve připravovaných reagensů
1. Vyjměte dříve připravené reagentie z prostoru pro uchovávání (2 °C až 8 °C). Před zahájením testu musí dříve připravené amplifikační, enzymové, promotorové reagentie a TCR dosáhnout teploty 15 °C až 30 °C.
 2. Vyjměte TER z prostoru pro uchovávání (15 °C až 30 °C).
 3. U dříve připraveného TCR proveďte před vložením do systému krok C.1 uvedený výše.
 4. Před vložením do systému zakružte amplifikační, enzymovou a promotorovou reagentií a převraťte je, aby se řádně promíchaly. Při převracení reagentií zabraňte nadměrné tvorbě pěny.
 5. Lahvičky s reagentiemi nedoplňujte. Systém Panther rozpozná lahvičky, které byly doplněny, a zamítne je.
- E. Manipulace se vzorkem
1. Zajistěte, aby zpracované vzorky v primárních zkumavkách nebo nezřaděné vzorky v sekundárních zkumavkách byly řádně skladovány v souladu s pokyny v části „Odběr a uchovávání vzorků“ na straně 7.
 2. Zajistěte, aby byly zmrazené vzorky důkladně rozmrazeny. Rozmrazené vzorky odstředějte po dobu 3 až 5 sekund, aby se důkladně promíchaly.
 3. Před zpracováním nechte vzorky dosáhnout teplotu 15 °C až 30 °C. Viz *Vzorky uvnitř systému Panther* pro další informace o vzorcích uvnitř systému.
 4. Ujistěte se, že každá primární odběrová zkumavka obsahuje až 1200 µl vzorku nebo každá SAT obsahuje alespoň 700 µl vzorku. Viz tabulku v části *Odběr klinických vzorků* na straně 7, kde naleznete požadavky na mrtvý objem pro každý typ primární a sekundární zkumavky. Je-li nutné ředění vzorků, viz krok E.6 níže pro další informace.

5. Těsně před vložením vzorků do stojanu na vzorky odstřeďte každý vzorek na 1000 až 3000 g po dobu 10 minut. Neodstraňujte uzávěry. Bubliny ve zkumavce mohou narušit snímání hladiny systémem Panther.

Informace o plnění stojanu a odstranění uzávěrů viz *Příprava systému*, krok F.2 níže.

6. V sekundární zkumavce zřeďte vzorek v poměru 1:3 v SAT nebo 1:100.

Pro testování v systému Panther může být vzorek zředěn v sekundární zkumavce.

Poznámka: *Pokud je vzorek naředěn, musí být testován ihned po naředění.*

- a. Ředění vzorků s nízkým objemem

Objem vzorků může být zvýšen na minimální požadovaný objem (700 µl) pomocí roztoku na ředění vzorků Aptima. Vzorky s obsahem nejméně 240 µl mohou být naředěny dvěma částmi roztoku na ředění vzorků (1:3) takto:

- i. Umístěte 240 µl vzorku do SAT.
- ii. Přidejte 480 µl roztoku na ředění vzorků Aptima.
- iii. Zkumavku uzavřete.
- iv. Jemně s ní 5 krát otočte, aby se promíchala.

Vzorky naředěné v poměru 1:3 lze v systému Panther testovat s použitím volitelné možnosti 1:3 (pro další informace viz *Návod k použití systému Panther*). Software automaticky ohlásí upravený výsledek použitím faktoru ředění. Tyto vzorky budou označeny jako zředěné vzorky.

- b. Ředění vzorků s vysokým titrem

Pokud je výsledek vzorku nad horní mezí kvantifikace (ULoQ), může být naředěn 99 díly roztoku na ředění vzorků Aptima (1:100) následně:

- i. Umístěte 30 µl vzorku do SAT nebo sekundární zkumavky.
- ii. Přidejte 2970 µl roztoku na ředění vzorků Aptima.
- iii. Zkumavku uzavřete.
- iv. Jemně s ní 5 krát otočte, aby se promíchala.

Vzorky naředěné v poměru 1:100 lze v systému Panther testovat s použitím volitelné možnosti 1:100 (pro další informace viz *Návod k použití systému Panther*). Software automaticky ohlásí upravený výsledek použitím faktoru ředění. Tyto vzorky budou označeny jako zředěné vzorky.

Poznámka: *U zředěných vzorků s čistými koncentracemi vyššími než ULoQ budou výsledky uváděny pomocí vědeckého zápisu.*

F. Příprava systému

1. Nastavte systém podle pokynů v *Návodu k použití systému Panther* a v části *Poznámky k postupu*. Nezapomeňte použít vhodnou velikost stojanů na reagenty a adaptérů TCR.
2. Vložte vzorky do stojanu na vzorky. Pro každou zkumavku se vzorkem (vzorek a v případě potřeby kalibrátor a kontroly) proveďte následující kroky:
 - a. Povolte uzávěr jedné zkumavky se vzorkem, ale zatím jej neodstraňujte.

Poznámka: *Věnujte zvláštní pozornost tomu, aby nedošlo ke kontaminaci rozstříkáním aerosolů. Opatrně uvolněte uzávěry na vzorcích.*
 - b. Vložte zkumavku se vzorkem do stojanu na vzorky.
 - c. Opakujte kroky 2.a a 2.b pro každý zbývající vzorek.

- d. Po vložení vzorků do stojanu na vzorky odstraňte a zlikvidujte všechny uzávěry zkumavek se vzorky v jednom stojanu na vzorky. Abyste předešli kontaminaci, nepřenášejte uzávěr přes žádné jiné stojany na vzorky nebo zkumavky se vzorky.
- e. V případě potřeby použijte novou, jednorázovou přenosovou pipetu k odstranění veškerých bublin nebo pěny.
- f. Po odstranění posledního uzávěru vložte stojan na vzorky do prostoru na vzorky.
Poznámka: Pokud současně provádíte další testy s jinými typy vzorků, zajistěte před vložím stojanu na vzorek do prostoru na vzorky přídržovač vzorků.
- g. Opakujte kroky 2.a až 2.f pro další stojan na vzorky.

Poznámky k postupu

A. Kalibrátor a kontroly

1. Pozitivní kalibrátor qHBV, nízká pozitivní kontrola qHBV, vysoká pozitivní kontrola qHBV a negativní kontrola qHBV mohou být vloženy v libovolné poloze stojanu na vzorky a do kteréhokoli dráhy prostoru na vzorky v systému Panther. Pipetování vzorků započne, jakmile bude splněna jedna z následujících dvou podmínek:
 - a. V systému je aktuálně zpracováván kalibrátor a kontroly.
 - b. V systému jsou registrovány platné výsledky pro kalibrátor a kontrolu.
2. Jakmile proběhne pipetování a zpracování kalibrátoru a kontrolních zkumavek pro soupravu reagentů testu Aptima HBV Quant Assay, můžete otestovat vzorky pomocí přiřazené rekonstituční soupravy v průběhu 24 hodin, **pokud nenastane následující:**
 - a. Výsledky kalibrátoru nebo kontroly jsou neplatné.
 - b. Přiřazená souprava reagentů testu je vyjmuta ze systému.
 - c. Přiřazená souprava reagentů testu překročila limity stability.
3. Kalibrátor a každou kontrolní zkumavku lze použít pouze jednou. Pokusy použít zkumavku vícekrát mohou vést k chybám při zpracování.

B. Talek na rukavicích

Stejně jako u jiných systémů reagentů může nadbytek talku na rukavicích způsobit kontaminaci otevřených zkumavek. Doporučujeme používat rukavice bez talku.

Kontrola kvality

Obsluha může zrušit výsledek cyklu nebo vzorku, pokud jsou při provádění testu zjištěny a zdokumentovány technické problémy, problémy na straně obsluhy nebo problémy na straně přístroje. V tomto případě musí být vzorky testovány znovu.

Kalibrace testu

Aby byly generovány platné výsledky, musí být provedena kalibrace testu. Jeden pozitivní kalibrátor se analyzuje třikrát pokaždé, když je reagenční souprava vložena do systému Panther. Po stanovení je kalibrace platná po dobu maximálně 24 hodin. Software systému Panther upozorní obsluhu, když je požadována kalibrace. Obsluha naskenuje kalibrační koeficient nalezený na listu čárového kódu hlavní šarže dodávaného s každou reagenční soupravou.

Během zpracování software systému Panther automaticky ověří kritéria pro akceptování kalibrátoru. Pokud jsou platné méně než dva replikáty kalibrátoru, software cyklus automaticky zneplatní. Vzorky ve zneplatněném cyklu musí být znovu testovány pomocí čerstvě připraveného kalibrátoru a čerstvě připravených kontrol.

Negativní a pozitivní kontroly

Aby byly generovány platné výsledky, musí být testována sada kontrol testu. Vždy, když je reagenční souprava vložena do systému Panther, musí být testován jeden replikát negativní kontroly, nízké pozitivní kontroly a vysoké pozitivní kontroly. Po stanovení jsou kontroly platné po dobu maximálně 24 hodin. Software systému Panther upozorní obsluhu, když jsou vyžadovány kontroly.

Během zpracování software systému Panther automaticky ověří kritéria pro akceptování kontrol. Aby bylo možné vygenerovat platné výsledky, musí negativní kontrola vygenerovat výsledek „Nedetekováno“ a pozitivní kontroly musí vygenerovat výsledky v rámci předdefinovaných parametrů (nominální cíl LPC: $2,7 \log_{10}$ IU/ml, nominální cíl HPC: $4,6 \log_{10}$ IU/ml). Pokud má některá z kontrol neplatný výsledek, software automaticky zneplatní cyklus. Vzorky ve zneplatněném cyklu musí být znovu testovány pomocí čerstvě připraveného kalibrátoru a čerstvě připravených kontrol.

Vnitřní kalibrátor / vnitřní kontrola

Každý vzorek obsahuje vnitřní kalibrátor / vnitřní kontrolu (IC). Během zpracování jsou kritéria akceptování IC automaticky ověřována softwarem systému Panther. Pokud je výsledek IC neplatný, je výsledek vzorku zneplatněn. Každý vzorek s neplatným výsledkem IC musí být testován znovu, aby byl získán platný výsledek.

Software systému Panther je navržen tak, aby přesně ověřoval procesy v rámci postupů prováděných podle pokynů uvedených v této příbalové informaci a v *Návodu k použití systému Panther*.

Interpretace výsledků

Systém Panther automaticky stanoví koncentraci DNA HBV pro vzorky a kontroly porovnáním výsledků s kalibrační křivkou. Koncentrace DNA HBV jsou uvedeny v IU/ml a \log_{10} IU/ml. Interpretaci výsledků uvádí Tabulka 1. Pokud se pro zředěné vzorky použije volitelná možnost ředění, systém Panther automaticky vypočítá koncentraci HBV pro čistý vzorek vynásobením zředěné koncentrace faktorem zředění a zředěné vzorky budou označeny jako zředěné.

Poznámka: U zředěných vzorků mohou být výsledky uvedené jako „Nedetekováno“ nebo „Detekováno <10“ získány zředěním vzorku s koncentrací nad, ale blízko LoD (mez detekce) nebo LLoQ (dolní mez kvantifikace). Pokud není dosaženo kvantitativního výsledku, doporučuje se odebrat a otestovat další čistý vzorek.

Tabulka 1: Interpretace výsledků

Ohlášený výsledek Aptima HBV Quant Assay		Interpretace
IU/ml	Log ₁₀ Hodnota ^a	
Nedetekováno	Nedetekováno	DNA HBV nebyla detekována.
Detekováno <10	<1,0	DNA HBV je detekována, ale na úrovni pod LLoQ
10 až 1 000 000 000	1,0 až 9,0	Koncentrace DNA HBV je v lineárním rozmezí 10 až 1 000 000 000 IU/ml
>1 000 000 000	>9,0	Koncentrace DNA HBV je nad ULoQ
Neplatné ^b	Neplatné ^b	Při generování výsledku došlo k chybě. Vzorky je nutné testovat znovu

^aHodnota je zkrácena na dvě desetinná místa.

^bNeplatné výsledky jsou zobrazeny modrou barvou.

Poznámka: U zředěných vzorků s čistými koncentracemi vyššími než ULoQ budou výsledky uváděny pomocí vědeckého zápisu.

Omezení

- Tento test mohou používat pouze osoby vyškolené v provedení příslušných postupů. Při nedodržení pokynů uvedených v této příbalové informaci může dojít k chybným výsledkům.
- Spolehlivost výsledků závisí na vhodném odběru, transportu, uchování a zpracování vzorků.
- Ačkoli je to vzácné, mutace ve vysoce konzervovaných oblastech virového genomu pokryté primery a/nebo sondami v testu Aptima HBV Quant Assay mohou vést k nedostatečné kvantifikaci nebo selhání detekce viru.

Provedení**Mez detekce s použitím 3. mezinárodního standardu WHO**

Mez detekce (LoD) testu je definována jako koncentrace DNA HBV, která je detekována s 95 % nebo vyšší pravděpodobností podle CLSI EP17-A2.¹²

LoD byla stanovena testovacími panely 3. mezinárodního standardu WHO pro DNA viru hepatitidy B (NIBSC 10/264) zředěnou v HBV negativní lidské plazmě a séru. Minimálně 36 replikátů každého zředění bylo testováno s každou ze tří šarží reagensů, tedy minimálně 108 replikátů na jedno ředění. Byla provedena probit analýza za účelem generování předpokládaných mezí detekce. Hodnoty LoD, které uvádí Tabulka 2, jsou výsledky ze šarže reagensů s nejvyšší předpokládanou mezí detekce. LoD pro Aptima HBV Quant Assay používající 3. mezinárodní standard WHO je 5,58 IU/ml pro plazmu a 4,29 IU/ml pro sérum.

Tabulka 2: Mez detekce s použitím 3. mezinárodního standardu WHO pro HBV

Předpokládaná mez detekce	Koncentrace (IU/ml)	
	Plazma	Sérum
10 %	0,16	0,19
20 %	0,27	0,30
30 %	0,39	0,42
40 %	0,55	0,56
50 %	0,75	0,73
60 %	1,02	0,96
70 %	1,42	1,29
80 %	2,09	1,81
90 %	3,58	2,91
95 %	5,58	4,29

Mez detekce napříč HBV genotypy

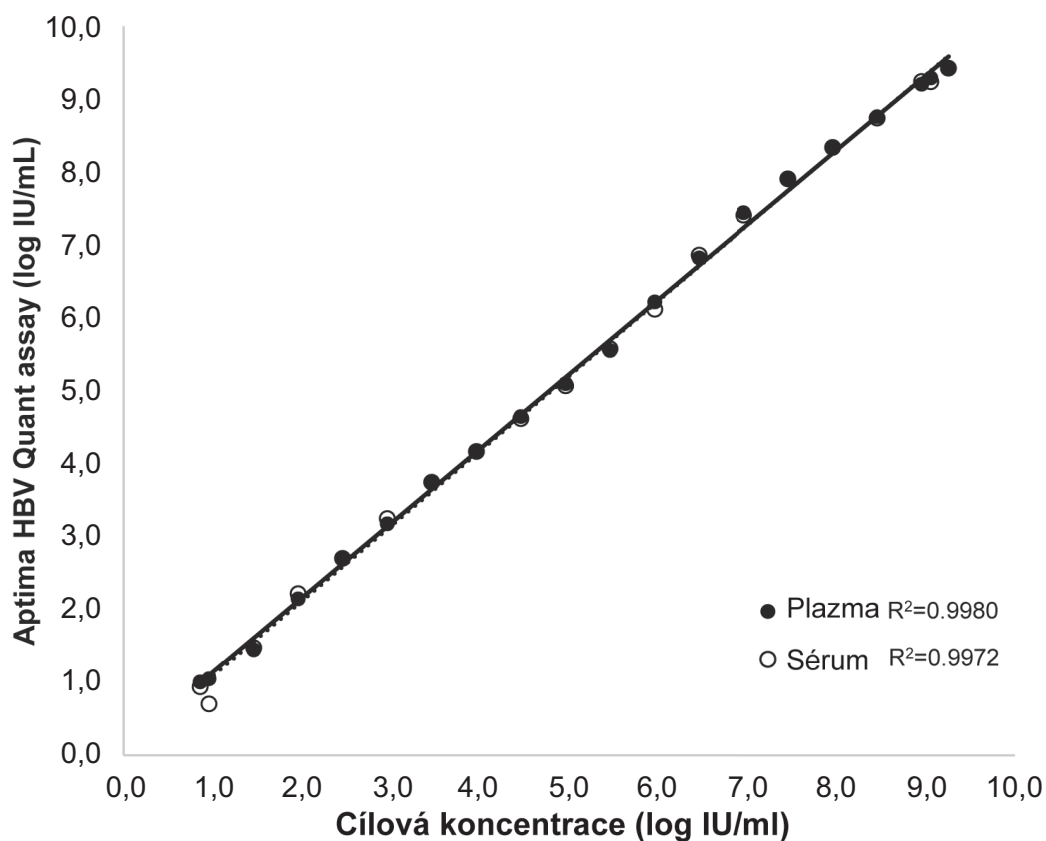
LoD byla stanovena testováním ředění HBV pozitivních klinických vzorků na genotypy A, B, C, D, E, F, G a H v HBV negativní lidské plazmě a séru. Koncentrace byly stanoveny za použití srovnávacího testu s označením CE a Health Canada. Minimálně 24 replikátů každého článku panelu bylo testováno s každou ze dvou šarží reagensů, tedy minimálně 48 replikátů na jeden článek panelu. Byla provedena probit analýza za účelem generování předpokládané 50 % a 95 % meze detekce. Hodnoty LoD, které uvádí Tabulka 3, jsou výsledky ze šarže reagensů s nejvyšší předpokládanou mezí detekce.

Tabulka 3: Mez detekce napříč HBV genotypy pomocí klinických vzorků

Genotyp	Předpokládaná mez detekce	Koncentrace (IU/ml)	
		Plazma	Sérum
A	50 %	0,48	0,88
	95 %	3,05	3,95
B	50 %	0,59	0,69
	95 %	3,00	4,97
C	50 %	0,79	0,93
	95 %	5,32	4,78
D	50 %	0,82	1,37
	95 %	4,61	7,29
E	50 %	0,93	1,01
	95 %	4,80	4,90
F	50 %	0,75	0,69
	95 %	3,13	3,30
G	50 %	0,52	0,62
	95 %	2,86	3,05
H	50 %	1,05	1,36
	95 %	6,44	6,31

Lineární rozsah

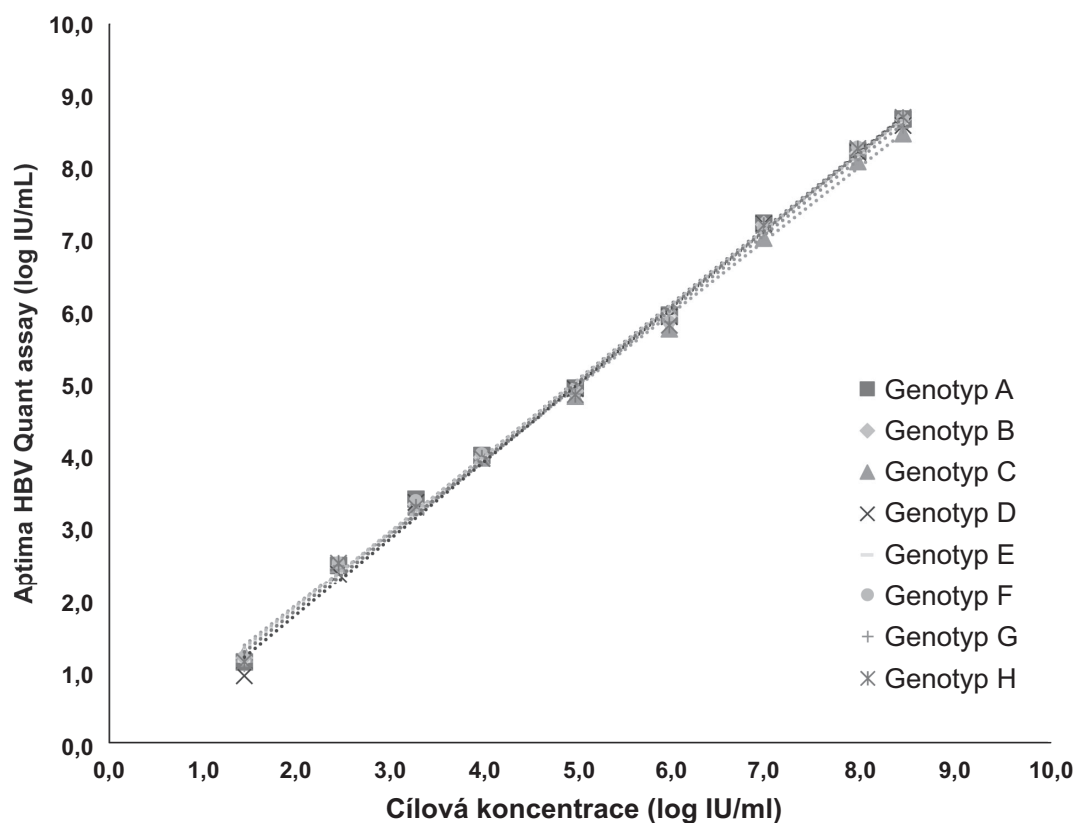
Lineární rozsah byl stanoven testováním panelů s HBV Armored RNA zředěnou v HCV negativní lidské plazmě a séra podle CLSI EP06-A.¹³ Koncentrace panelů se pohybovala v rozmezí od 0,86 log IU/ml do 9,26 log IU/ml. Aptima HBV Quant Assay prokázal linearitu v celém testovaném rozsahu, s horní mezí kvantifikace (ULoQ) 9 log IU/ml, jak je ukázáno v Obrázek 6.



Obrázek 6. Linearita v plazmě a séru

Linearita napříč HBV genotypy

Lineární odpověď na genotypy A, B, C, D, E, F, G, a H byla potvrzena testováním panelů DNA HBV zředěné v pufru při koncentracích od 1,44 log IU/ml do 8,44 log IU/ml. Jak znázorňuje Obrázek 7, byla prokázána linearita v celém testovaném rozsahu na všech testovaných genotypech.



Obrázek 7. Linearita napříč HCV genotypy A až H

Dolní mez kvantifikace s použitím 3. mezinárodní normy WHO

Dolní mez kvantifikace (LLoQ) je definována jako nejnižší koncentrace, při které je RNA HBV spolehlivě kvantifikována v rámci celkové chyby, podle CLSI EP17-A2.¹² Celková chyba byla odhadnuta dvěma způsoby: Celková analytická chyba (TAE) = odchylka + 2SD a celková chyba (TE) = SQRT(2) x 2SD. Aby byla zajištěna správnost a přesnost měření, byla celková chyba testu Aptima HBV Quant Assay nastavena na 1 log IU/ml (tj. v LLoQ je rozdíl mezi dvěma měřeními více než 1 log IU/ml statisticky významný).

LLOQ byla stanovena testovacími panely 3. mezinárodního standardu WHO pro DNA viru hepatitidy B (NIBSC 10/264)¹⁴ zředěnou v HBV negativní lidské plazmě a séru. Minimálně 45 replikátů každého roztoku bylo testováno s každou ze tří šarží reagensů, tedy minimálně 135 replikátů na jedno ředění. Výsledky ze šarže reagensů s nejvyšší koncentrací, která splňuje požadavky na TE a TAE uvádí Tabulka 6. Vypočtená LLoQ pro 3. mezinárodní standard WHO pro virus hepatitidy B je 4,80 IU/ml pro plazmu a 6,34 IU/ml pro sérum.

Tabulka 4: Stanovení LLoQ s použitím 3. mezinárodního standardu WHO pro HBV zředěný v plazmě

Šarže reagensie	Cílová koncentrace		Aptima HBV Quant	SD	Odchylka	Vypočtená TE	Vypočtená TAE
	(IU/ml)	(log IU/ml)	(log IU/ml)	(log IU/ml)	(log IU/ml)	(log IU/ml)	(log IU/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 = směrodatná odchylka

Tabulka 5: Stanovení LLoQ s použitím 3. mezinárodního standardu WHO pro HBV zředěný v séru

Šarže reagensie	Cílová koncentrace		Aptima HBV Quant	SD	Odchylka	Vypočtená TE	Vypočtená TAE
	(IU/ml)	(log IU/ml)	(log IU/ml)	(log IU/ml)	(log IU/ml)	(log IU/ml)	(log IU/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 = směrodatná odchylka

Tabulka 6: Shrnutí vypočtené LLoQ s použitím 3. mezinárodního standardu WHO pro HBV

Šarže reagensie	LLOQ v plazmě		LLOQ v séru	
	(log IU/ml)	(IU/ml)	(log IU/ml)	(IU/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 = směrodatná odchylka

Stanovení dolní meze kvantifikace napříč genotypy HBV

LLOQ byla stanovena testováním zředěných HBV pozitivních klinických vzorků pro genotypy A, B, C, D, E, F, G a H v HBV negativní lidské plazmě a séru. Minimálně 36 replikátů každého článku panelu bylo testováno s každou ze dvou šarží reagensů, tedy minimálně 72 replikátů na jeden článek panelu. Výsledky ze šarže reagensů s nejvyšší koncentrací splňující požadavky na TE a TAE uvádí Tabulka 7 pro plazmu a Tabulka 8 pro sérum. Vypočtená LLOQ pro genotypy A, B, C, D, E, F, G a H v plazmě a séru jsou shrnuje Tabulka 9. Tím byla stanovena celková LLOQ pro test na hodnotu 10 IU/ml.

Tabulka 7: Stanovení LLOQ napříč genotypy v plazmě

Genotyp	Aptima HBV						
	Cílová koncentrace		Quant	SD	Odchylka	Vypočtená TE	Vypočtená TAE
	(IU/ml)	(log IU/ml)	(log IU/ml)	(log IU/ml)	(log IU/ml)	(log IU/ml)	(log IU/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 = směrodatná odchylka

Tabulka 8: Stanovení LLoQ napříč genotypy v séru

Genotyp	Aptima HBV						
	Cílová koncentrace		Quant	SD	Odchylka	Vypočtená TE	Vypočtená TAE
	(IU/ml)	(log IU/ml)	(log IU/ml)	(log IU/ml)	(log IU/ml)	(log IU/ml)	(log IU/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 = směrodatná odchylka

Tabulka 9: Souhrn LLoQ napříč genotypy v plazmě a séru

Genotyp	LLoQ v plazmě		LLoQ v séru	
	(log IU/ml)	(IU/ml)	(log IU/ml)	(IU/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

Opakovatelnost

Pro posouzení opakovatelnosti byl vytvořen 28 článkový panel zředěním HBV pozitivních klinických vzorků (genotyp A a C) nebo obohacením HBV negativní plazmy a séra o DNA HBV (genotyp A a C). Panel byl testován třemi technikami za použití tří šarží reagensů na třech systémech Panther po dobu 20 nebo více testovacích dnů.

Tabulka 10 a Tabulka 11 ukazuje opakovatelnost výsledků testu (v log IU/ml) mezi přístroji, technikami, šaržemi, cykly, v rámci cyklů a celkově. Celková variabilita byla primárně způsobena variabilitou uvnitř cyklu (tj. náhodné chyby).

Tabulka 10: Opakovatelnost kvantitativního testu Aptima HBV Quant Assay pro genotyp A

Matrice	N	Střední koncentrace (log IU/ml)	Mezi techniky		Mezi přístroji		Mezi šaržemi		Mezi cykly		V rámci cyklu		Celkem	
			SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)
Plazma	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
Plazma	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
Plazma	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
Plazma	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
Plazma	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
Plazma	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
Plazma	162	7,69	0,03	0,38	0,02	0,23	0,01	0,15	0,01	0,12	0,10	1,30	0,11	1,39
Sérum	160	1,17	0,02	1,93	0,02	1,71	0,06	5,54	0,02	1,64	0,20	17,07	0,21	18,21
Sérum	162	1,82	0,02	1,15	0,01	0,79	0,10	5,43	0,01	0,72	0,15	8,13	0,18	9,90
Sérum	162	3,16	0,01	0,26	0,02	0,62	0,09	2,78	0,02	0,59	0,11	3,38	0,14	4,47
Sérum	162	4,06	0,01	0,19	0,01	0,22	0,04	0,99	0,01	0,15	0,07	1,68	0,08	1,98
Sérum	162	5,60	0,02	0,36	0,01	0,24	0,06	1,15	0,01	0,22	0,13	2,40	0,15	2,70
Sérum	162	6,30	0,03	0,49	0,03	0,42	0,01	0,17	0,01	0,16	0,11	1,77	0,12	1,90
Sérum	162	7,48	0,05	0,62	0,03	0,36	0,02	0,25	0,02	0,23	0,08	1,09	0,10	1,35

CV = koeficient variability, SD = směrodatná odchylka

Poznámka: Variabilita některých faktorů může být číselně negativní, což může nastat, pokud je variabilita způsobená těmito faktory velmi malá. Když k tomu dojde, hodnota SD a CV je uvedena jako 0.

Tabulka 11: Opakovatelnost kvantitativního testu Aptima HBV Quant Assay pro genotyp C

Matrice	N	Střední koncentrace (log IU/ml)	Mezi techniky		Mezi přístroji		Mezi šaržemi		Mezi cykly		V rámci cyklu		Celkem	
			SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)
Plazma	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
Plazma	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
Plazma	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
Plazma	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
Plazma	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
Plazma	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
Plazma	162	7,75	0,03	0,33	0,02	0,19	0,02	0,24	0,01	0,08	0,07	0,94	0,08	1,04
Sérum	160	1,20	0,02	1,54	0,02	1,55	0,05	4,24	0,02	1,78	0,18	14,74	0,19	15,59
Sérum	162	1,90	0,02	1,20	0,02	0,87	0,05	2,73	0,01	0,72	0,15	8,10	0,17	8,71
Sérum	162	3,19	0,03	0,93	0,03	0,92	0,05	1,68	0,00	0,05	0,07	2,34	0,10	3,16
Sérum	162	4,04	0,01	0,14	0,01	0,31	0,04	0,94	0,00	0,12	0,05	1,30	0,07	1,64
Sérum	162	5,69	0,01	0,16	0,02	0,36	0,05	0,88	0,01	0,13	0,09	1,50	0,10	1,78
Sérum	162	6,32	0,04	0,64	0,03	0,45	0,04	0,66	0,01	0,14	0,10	1,57	0,12	1,87
Sérum	162	7,23	0,04	0,55	0,02	0,25	0,05	0,68	0,01	0,13	0,10	1,42	0,12	1,69

CV = koeficient variability, SD = směrodatná odchylka

Poznámka: Variabilita některých faktorů může být číselně negativní, což může nastat, pokud je variabilita způsobená těmito faktory velmi malá. Když k tomu dojde, hodnota SD a CV je uvedena jako 0.

Potenciálně rušivé látky

Byla vyhodnocena citlivost testu Aptima HBV Quant Assay na interferenci se zvýšenými hladinami endogenních látek nebo léky běžně předepisovanými jedincům infikovaným HBV. Byly testovány HBV negativní plazmové vzorky a vzorky obohacené HBV na koncentraci 4,3 log IU/ml DNA HBV.

Nebyla pozorována žádná interference ve výkonu testu v přítomnosti albuminu (90 mg/ml), hemoglobinu (5 mg/ml), triglyceridů (30 mg/ml) nebo nekonjugovaného bilirubinu (0,2 mg/ml).

Klinické vzorky plazmy od pacientů se zvýšenými hladinami definovaných látek nebo od pacientů s chorobami, které uvádí Tabulka 12, byly testovány pomocí testu Aptima HBV Quant Assay. Během provádění testu nebyla pozorována žádná interference.

Tabulka 12: Testované typy klinických vzorků

Typy klinických vzorků	
1	Antinukleární protilátka (ANA)
2	Revmatoidní faktor (RF)
3	Alkoholická cirhóza (AC)
4	Alkoholická hepatitida
5	Nealkoholická hepatitida
6	Autoimunitní hepatitida
7	Zvýšená alaninaminotransferáza (ALT)
8	Hepatocelulární karcinom (HCC)
9	Roztroušená skleróza (MS)
10	Systémový lupus erythematoses (SLE)
11	Hyperglobulinémie
12	Revmatoidní artritida (RA)
13	Anti-Jo1 protilátka (JO-1)
14	Mnohočetný myelom (MM)
15	Hemolyzovaný (zvýšená hladina hemoglobinu)
16	Ikterický (zvýšená hladina bilirubinu)
17	Lipemický (zvýšená hladina lipidů)
18	Zvýšený protein
19	HBV protilátky (očkování)
20	HCV protilátky
21	Protilátky proti HIV-1 a HIV-2

V přítomnosti exogenních látek, které uvádí Tabulka 13, nebyla při koncentracích alespoň trojnásobku C_{max} (lidská plazma) během provádění testu pozorována žádná interference.

Tabulka 13: Exogenní látky

Fond exogenních látek	Testované exogenní látky
1	Saquinavir, ritonavir, amprenavir, indinavir, lopinavir, nelfinavir mesylát
2	Klarithromycin, valganciklovir hydrochlorid, efavirenz, nevirapin
3	Paroxetin HCl, enfuvirtid, zidovudin, didanosin, abakavir sulfát
4	Ribavirin, entekavir, adefovir-dipivoxil, tenofovir-disoproxyl-fumarát, lamivudin, ganciclovir, acyklovir
5	Stavudin, ciprofloxacín, fluoxetin, azithromycin, valacyclovir, sertralin, zalcitabin
6	Interferon alfa -2a, interferon alfa -2b, pegylovaný interferon alfa-2b

Specifická

Specifická byla stanovena pomocí 292 čerstvých a 747 zmrazených HBV negativních klinických vzorků. Celkem bylo testováno 521 vzorků plazmy a 518 vzorků séra. Specifická byla vypočtena jako procento HBV negativních vzorků s výsledky „Nedetkováno.“ DNA HBV nebyla detekována v 1038 vzorcích. Specifická byla 99,9 % (1038/1039, 95 % CI: 99,5-100 %).

Tabulka 14: Specifická v klinických vzorcích plazmy a séra

	Čerstvá plazma	Zmrazená plazma	Plazma celkem	Čerstvé sérum	Zmrazené sérum	Sérum celkem	Kombinované
Platné replikáty (n)	145	376	521	147	371	518	1 039
Nedetkováno	145	376	521	147	370	517	1 038
Specifická (95 % CI)	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)

CI = interval spolehlivosti

Analytická specifita

Potenciální zkřížená reaktivita na patogeny, které uvádí Tabulka 15, byla vyhodnocená v HBV negativní lidské plazmě v přítomnosti nebo nepřítomnosti 4,3 log IU/ml HBV. V bakteriálně kontaminované plazmě nebo ve vzorcích subjektů infikovaných jinými krevními patogeny nebo těch, kteří obdrželi vakcíny proti HBV a chřipce, nebyla pozorována žádná zkřížená reaktivita nebo interference.

Tabulka 15: Patogeny testované na analytickou specifitu

Mikroorganismus / patogen	Zdroj	Mikroorganismus / patogen	Zdroj
Virus hepatitidy C	Klinický vzorek	Lidský herpesvirus typu 8	Kultivační tekutina
Virus hepatitidy A	Klinický vzorek	Virus japonské encefalitidy	Ascitická tekutina
Očkován proti HBV	Klinický vzorek	Virus encefalitidy Murray Valley	Buněčný lyzát
HIV-1 a -2	Klinický vzorek	Virus encefalitidy St. Louis	Kultivační tekutina
Lidský T-buněčný lymfotropický virus typu 1 a 2	Klinický vzorek	Virus vakcínie	Buněčný lyzát
Parvovirus B19	Klinický vzorek	Virus žluté zimnice	Kultivační tekutina
Cytomegalovirus	Klinický vzorek	<i>Candida albicans</i>	Kultivace
Virus horečky dengue typu 1-4	Klinický vzorek	<i>Chlamydia trachomatis</i>	Kultivace
Epstein-Barr virus	Klinický vzorek	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Kultivace
Očkován proti chřipce	Klinický vzorek	<i>Mycobacterium gordonae</i>	Kultivace
Lidský papillomavirus	Klinický vzorek	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	Kultivace
Virus herpes simplex 1 a 2	Klinický vzorek	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Kultivace
Virus zarděnek	Klinický vzorek	<i>Propionibacterium acnes</i>	Kultivace
Virus varicella zoster	Klinický vzorek	<i>Staphylococcus aureus</i>	Kultivace
Virus západonilské horečky	Klinický vzorek	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Kultivace
BK lidský polyomavirus	Buněčný lyzát	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Kultivace
Lidský herpesvirus 6B	Kultivační tekutina	<i>Trichomonas vaginalis</i>	Kultivace

Opakovatelnost klinických vzorků

Opakovatelnost byla vyhodnocena testováním tří replikátů přirozeně infikovaných HBV pozitivních klinických vzorků plazmy a séra. Průměrnou koncentraci a směrodatnou odchylku pro testované vzorky plazmy a séra uvádí Tabulky 16 a 17.

Tabulka 16: Opakovatelnost klinických vzorků plazmy

Vzorek plazmy	Průměrná koncentrace (log IU/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= směrodatná odchylka

Tabulka 17: Opakovatelnost klinických vzorků séra

Vzorek séra	Průměrná koncentrace (log IU/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= směrodatná odchylka

Ředění vzorku pomocí ředícího roztoku na vzorky

Pro vyhodnocení regenerace DNA HBV ve vzorcích naředěných ředícím roztokem na vzorky Aptima byly vzorky plazmy a séra, které přesáhly lineární rozsah, ředícím roztokem na vzorky Aptima zředěny v poměru 1:3. Kromě toho byly přirozeně infikované klinické vzorky s vysokým titrem a obohacené vzorky DNA HBV s koncentracemi nad ULoQ zředěny ředícím roztokem na vzorky Aptima v poměru 1:100. Každý vzorek byl třikrát testován čistý a zředěný (1:3 nebo 1:100). Rozdíly mezi průměrnou hlášenou koncentrací (faktor ředění aplikován na výsledek zředěného vzorku) a průměrnou čistou koncentrací uvádí Tabulka 18 pro plazmu a Tabulka 19 pro sérum. Koncentrace vzorků byly ve zředěných vzorcích přesně obnoveny.

Tabulka 18: Zředění vzorku pomocí ředícího roztoku na vzorky Aptima v plazmě

Ředění	Průměrná čistá koncentrace (log IU/ml)	Průměrná hlášená koncentrace ^a (log IU/ml)	Rozdíl (log IU/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 ^b (10,20 ^c)	10,40	0,20

^a Hlášená koncentrace je hodnota vypočtená po použití faktoru ředění.

^b Obohacený vzorek.

^c Cílová hodnota koncentrace, která je nad ULoQ.

Tabulka 19: Zředění vzorku pomocí ředícího roztoku na vzorky Aptima v séru

Ředění	Průměrná čistá koncentrace (log IU/ml)	Průměrná hlášená koncentrace ^a (log IU/ml)	Rozdíl (log IU/ml)
1:3	1,93	1,50	-0,43
	2,29	2,00	-0,29
	2,78	2,45	-0,33
	1,98	1,50	-0,48
	2,53	2,23	-0,30
	3,53	3,59	0,06
	3,38	3,21	-0,17
	3,77	3,68	-0,09
	3,45	3,35	-0,10
	4,26	4,16	-0,10
	6,31	5,98	-0,33
	5,45	5,24	-0,21
	5,74	5,62	-0,12
	7,44	7,19	-0,25
8,47	8,31	-0,16	
1:100	8,47	8,19	-0,28
	>9,00 ^b (10,20 ^c)	10,43	0,23

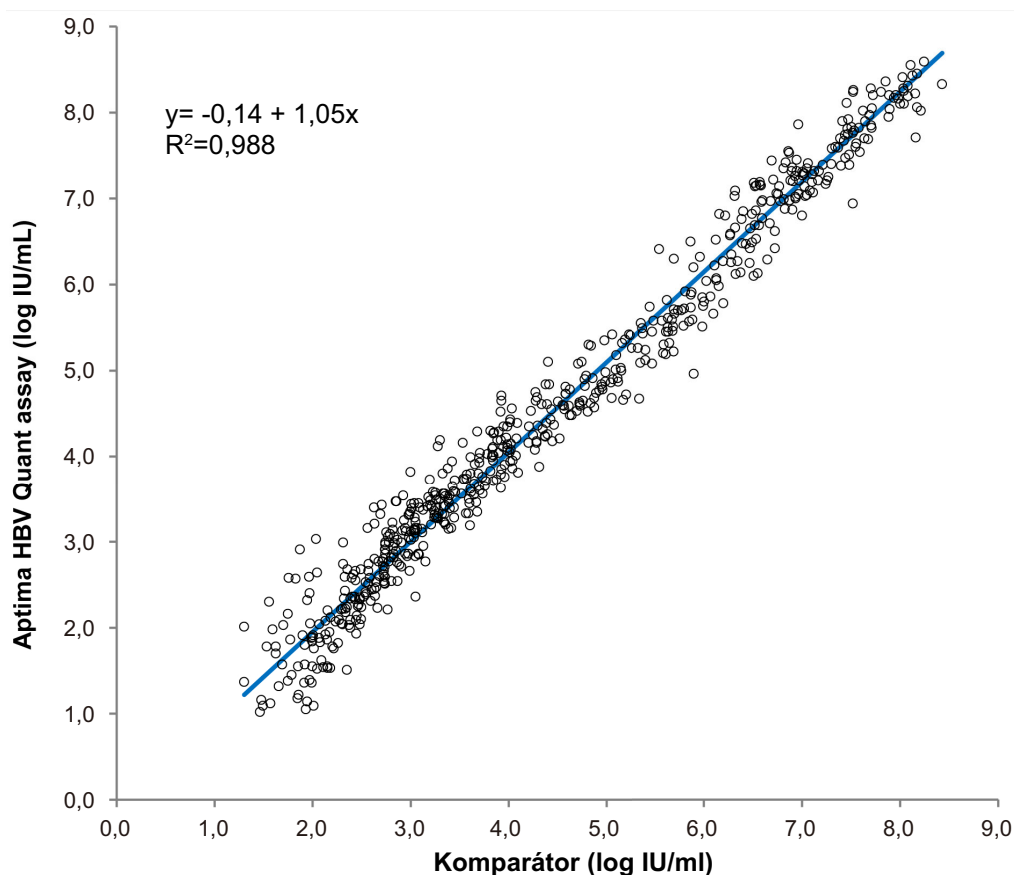
^a Hlášená koncentrace je hodnota vypočtená po použití faktoru ředění.

^b Obohacený vzorek.

^c Cílová hodnota koncentrace, která je nad ULoQ.

Metoda korelace

Provedení testu Aptima HBV Quant Assay bylo hodnoceno na základě licencovaného srovnávacího testu s označením CE a Health Canada testováním neřaděných klinických vzorků od pacientů infikovaných HBV. Pro lineární regresi bylo použito celkem 614 klinických vzorků v lineárním rozsahu společném pro oba testy, jak je znázorňuje Obrázek 8.



Obrázek 8. Korelace mezi testem Aptima HBV Quant Assay a srovnávacím testem

Křížová kontaminace

Aby se prokázalo, zda systém Panther minimalizuje riziko falešně pozitivních výsledků vyplývajících z křížové kontaminace, byla provedena studie s použitím obohacených panelů na třech systémech Panther. Křížová kontaminace byla hodnocena pomocí vzorků plazmy obohacené o DNA s vysokým titrem HBV (8 log IU/ml) rozptýlených mezi HBV negativními vzorky v šachovnicovém vzoru. Testování proběhlo v patnácti cyklech. Celková míra křížové kontaminace byla 0,0 % (0/705).

Literatura

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 USA

Zákaznická podpora: +1 800 442 9892
customersupport@hologic.com

Technická podpora: +1 888 484 4747
molecularsupport@hologic.com

Další kontaktní informace najdete na webu www.hologic.com.



Hologic BV
Da Vinciiaan 5
1930 Zaventem
Belgium

Hologic, Aptima, a Panther jsou ochranné známky nebo registrované ochranné známky společnosti Hologic, Inc. nebo jejích dceřiných společností ve Spojených státech amerických nebo v jiných zemích. Veškeré ostatní ochranné známky, které se mohou objevit v této příbalové informaci, jsou majetkem příslušných vlastníků.

Tento produkt může být krytý jedním či více patenty USA uvedenými na webové stránce www.hologic.com/patents.

© 2016-2020 Hologic, Inc. Všechna práva vyhrazena.
AW-13182-2601 Rev. 007
Prosinec 2020