

Test Aptima™ HCV Quant Dx

Do diagnostyki *in vitro*.
Tylko na eksport poza USA.

Informacje ogólne	2
Przeznaczenie	2
Podsumowanie i objaśnienie testu	2
Zasady procedury	3
Ostrzeżenia i środki ostrożności	4
Wymagania dotyczące przechowywania odczynników i postępowania z nimi	7
Pobieranie i przechowywanie próbek	8
Próbki w Panther System	11
Transport próbek	11
Panther System	12
Dostarczone odczynniki i materiały	12
Materiały wymagane, ale dostępne osobno	14
Materiały opcjonalne	15
Procedura testu w Panther System	15
Uwagi dotyczące procedury	19
Kontrola jakości	20
Kalibracja testu	20
Kontrole ujemne i dodatnie	20
Kalibrator wewnętrzny / kontrola wewnętrzna	20
Interpretacja wyników	21
Ograniczenia	21
Skuteczność	22
Granica wykrywalności (LoD) przy zastosowaniu 2. Międzynarodowego Standardu WHO	22
Granica wykrywalności dla różnych genotypów HCV	23
Zakres liniowy	24
Liniowość według genotypów HCV	25
Dolna granica oznaczalności przy zastosowaniu 2. Międzynarodowego Standardu WHO	25
Określenie dolnej granicy oznaczalności (LLoQ) dla różnych genotypów HCV	27
Precyzja	29
Potencjalne substancje zakłócające	30
Swoistość	31
Swoistość analityczna	32
Próbki kliniczne zawierające wirusy inne niż HCV	33
Powtarzalność próbek klinicznych	33
Rozcieńczanie próbek przy użyciu rozcieńczalnika do próbek	34
Korelacja metod	36
Zgodność diagnostyczna	37
Przenoszenie	37
Panel serokonwersji	38
Bibliografia	39

Informacje ogólne

Przeznaczenie

Test Aptima HCV Quant Dx to test, który wykorzystuje technologię amplifikacji z mediacją transkrypcji w czasie rzeczywistym. Test ten jest stosowany zarówno do wykrywania, jak i ilościowego oznaczania RNA wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV) w świeżej i zamrożonej surowicy ludzkiej oraz osoczu osób zakażonych wirusem HCV.

Osocze można przygotować w kwasie etylenodiaminotetraoctowym (EDTA), w roztworze antykoagulantu cytrynianu dekstrozy (ACD) oraz w probówkach do przygotowania osocza (PPT). Surowicę można przygotować w probówkach do surowicy lub w probówkach do separacji surowicy (SST). Próbkę są badane przy użyciu Panther System do automatycznego przetwarzania próbek, amplifikacji, detekcji i oznaczania ilościowego. Próbki zawierające genotypy HCV od 1 do 6 zostały zweryfikowane pod kątem wykrywania i ilościowego oznaczania w teście.

Test Aptima HCV Quant Dx jest wskazany do stosowania jako pomoc w diagnostyce zakażenia wirusem HCV. Test może być stosowany do potwierdzenia aktywnego zakażenia HCV u pacjentów z dodatnim wynikiem badania przeciwciał HCV. Wykrycie RNA wirusa HCV wskazuje, że wirus się replikuje i dlatego stanowi dowód aktywnego zakażenia.

Test Aptima HCV Quant Dx jest wskazany do stosowania jako pomoc w prowadzeniu pacjentów zakażonych HCV poddawanych terapii lekami przeciwwirusowymi na HCV. Test mierzy poziom RNA wirusa HCV na początku, podczas leczenia i po zakończeniu leczenia w celu określenia trwałej odpowiedzi wirusologicznej (SVR). Wyniki testu Aptima HCV Quant Dx należy interpretować w kontekście wszystkich istotnych wyników badań klinicznych i laboratoryjnych.

Test Aptima HCV Quant Dx nie jest przeznaczony do stosowania jako test przesiewowy na obecność wirusa HCV we krwi lub produktach krwiopochodnych.

Podsumowanie i objaśnienie testu

HCV jest patogenem przenoszonym przez krew i stanowi obciążenie dla zdrowia publicznego na całym świecie, przy czym na świecie zakażonych jest do 170 milionów osób, a rocznie z powodu schorzeń związanych z HCV, w tym marskości i raka wątroby, umiera 350 000 osób.^{1,2} HCV przenosi się poprzez kontakt z krwią, produktami krwiopochodnymi lub czynności potencjalnie związane z narażeniem przezskórnym.^{3,4} Pod względem genetycznym HCV zawiera genom RNA o dodatniej nici, składający się z około 9500 nukleotydów, kodujący białka strukturalne (core, glikoproteiny E1 i E2, białko kanału jonowego p7) oraz białka niestrukturalne (NS2, NS3, NS4A/B, NS5A/B), przy czym te ostatnie są kluczowymi białkami replikacyjnymi wirusa i stanowią obiekty bezpośredniego działania leków przeciwwirusowych.^{4,5} Dwa nieulegające translacji regiony (UTR) genomu, 5'UTR i 3'UTR, pełnią odpowiednio funkcje translacji genomu i replikacji/pakowania.⁵ 5'UTR jest najbardziej konserwatywnym regionem genomowym we wszystkich sześciu głównych genotypach HCV.⁶

Klinicznie istnieje duża częstość występowania bezobjawowego zakażenia HCV i pomimo wykrywalności przeciwciał (zazwyczaj w ciągu 5-12 tygodni) przewlekłe zakażenie HCV występuje nawet u 75% pacjentów.² Algorytmy badań laboratoryjnych na obecność HCV wymagają diagnozowania aktywnego zakażenia HCV u osób z dodatnimi przeciwciałami poprzez wykrywanie RNA wirusa HCV w osoczu lub surowicy, co pozwala na odpowiednie skierowanie do opieki.^{7,8,9}

Ilościowe oznaczanie RNA wirusa HCV (wiremii) odgrywa kluczową rolę w określaniu i monitorowaniu skuteczności leczenia HCV. Przetrwiała odpowiedź wirusologiczna (SVR), definiowana jako niewykrywalne RNA wirusa HCV po skutecznej terapii, jest kluczowym markerem wyleczenia HCV.^{10,11} W terapii opartej na interferonie, wczesna odpowiedź wirusologiczna (EVR), definiowana jako spadek wiremii HCV o 2 log lub więcej po 12 tygodniach terapii oraz szybka odpowiedź wirusologiczna (RVR), definiowana jako niewykrywalne poziomy RNA wirusa HCV po 4 tygodniach terapii, okazały się być pozytywnymi wskaźnikami predykcyjnymi SVR.^{10,12,13} Te markery kinetyki wirusa są wykorzystywane w podejściu ukierunkowanym na odpowiedź, dostosowującym opcje leczenia do przerwania lub przedłużenia terapii w celu osiągnięcia SVR.¹⁴ Ponadto, długoterminowe badania wykazały trwałość SVR po skutecznym leczeniu, a eradykacja wirusa zapobiega progresji choroby wątroby.¹⁰

W erze leków przeciwwirusowych o bezpośrednim działaniu (DAA), pomiary wiremii HCV są wykonywane przed rozpoczęciem terapii w celu ustalenia wyjściowej wiremii, w trakcie leczenia w celu określenia odpowiedzi na leczenie oraz po zakończeniu terapii w celu oceny SVR (lub nawrotu choroby). Prawie wszyscy pacjenci uzyskują odpowiedź wirusologiczną w trakcie leczenia DAA, definiowaną jako poniżej dolnej granicy oznaczalności (<LLOQ) dla danego testu, a następnie ponad 90% SVR w 12 tygodniu po terapii większością programów.^{8,11} Wykrywanie i oznaczanie ilościowe RNA wirusa HCV będzie nadal odgrywać kluczową rolę w diagnostyce HCV i prowadzeniu pacjentów w trakcie terapii przeciwwirusowej.

Zasady procedury

Test Aptima HCV Quant Dx jest testem amplifikacji kwasów nukleinowych, który wykorzystuje technologię amplifikacji z mediacją transkrypcji (TMA) w czasie rzeczywistym do wykrywania i ilościowego oznaczania RNA wirusa HCV przed terapią w celu ułatwienia diagnozy lub ustalenia podstawowej wiremii, jak również do pomiaru odpowiedzi na leczenie i po leczeniu. Test celuje w konserwatywny region genomu HCV, wykrywając i oznaczając ilościowo genotypy 1, 2, 3, 4, 5 i 6. Test jest standaryzowany względem 2. Międzynarodowego Standardu WHO dla wirusa zapalenia wątroby typu C (kod NIBSC 96/798).¹²

Test Aptima HCV Quant Dx można podzielić na trzy podstawowe etapy, przy czym wszystkie odbywają się w pojedynczej probówce w aparacie Panther System: wychwytywanie cząsteczek szukanых, amplifikacja cząsteczek szukanых metodą TMA oraz detekcja produktów amplifikacji (amplikonów) wyznakowanymi fluorescencyjnie sondami (typu torch).

Podczas wychwytywania cząsteczek szukanых, z próbek izolowane jest RNA wirusa. Próbka jest poddawana działaniu detergentu w celu solubilizacji otoczki wirusowej, denaturacji białek i uwolnienia genomowego RNA wirusa. Oligonukleotydy wychwytyujące hybrydują do wysoce konserwatywnych regionów RNA wirusa HCV, jeśli są one obecne w badanej próbce. Po hybrydyzacji cząsteczka szukana jest wychwytywana przez mikrocząstki magnetyczne, które następnie są oddzielane od próbki w polu magnetycznym. W celu usunięcia zbędnych składników z próbki reakcyjnej wykonywane są etapy płukania.

Amplifikacja cząsteczek szukanых jest wykonywana metodą TMA. Jest to metoda amplifikacji kwasów nukleinowych z mediacją transkrypcji, w której wykorzystywane są dwa enzymy – odwrotna transkryptaza wirusa białaczki mysiej Moloneya (Moloney murine leukemia virus, MMLV) oraz polimeraza RNA bakteriofaga T7. Odwrotna transkryptaza jest wykorzystywana do produkcji kopii DNA (zawierającej sekwencję promotora dla polimerazy RNA bakteriofaga T7) sekwencji szukanej. Polimeraza RNA bakteriofaga T7 produkuje liczne kopie amplikonu RNA na podstawie matrycy kopii DNA. Test Aptima HCV Quant Dx wykorzystuje metodę TMA do amplifikacji fragmentu 5'UTR genomu HCV. Amplifikacja tego regionu jest osiągana przy użyciu specyficznych starterów, które są zaprojektowane do amplifikacji genotypów HCV 1, 2, 3, 4, 5 i 6.

Detekcja następuje dzięki zastosowaniu sond jednoniciowego kwasu nukleinowego, które są obecne w czasie amplifikacji cząstki szukanej i ulegają swoistej hybrydyzacji z amplikonem w czasie rzeczywistym. Każda sonda typu torch składa się z fluoroforu i wygaszacza. Gdy sonda typu torch nie hybrydyzuje do amplikonu, wygaszacz znajduje się w pobliżu fluoroforu i tłumi fluorescencję. Gdy sonda wiąże się z amplikonem, wygaszacz jest odsuwany dalej od fluoroforu i po wzbudzeniu przez źródło światła emituje sygnał o swoistej długości fali. Gdy więcej sond typu torch hybrydyzuje do amplikonu, generowany jest wyższy sygnał fluorescencyjny. Czas potrzebny do osiągnięcia przez sygnał fluorescencyjny określonego progu jest proporcjonalny do wyjściowego stężenia wirusa HCV. Każda reakcja posiada wewnętrzny kalibrator / kontrolę wewnętrzną (IC), która kontroluje zmiany w przetwarzaniu próbki, amplifikacji i wykrywaniu. Stężenie próbki jest określane przez oprogramowanie Panther System przy użyciu sygnałów wirusa HCV i IC dla każdej reakcji i porównanie ich z informacjami o kalibracji.

Ostrzeżenia i środki ostrożności

- A. Aby zmniejszyć ryzyko uzyskania nieważnych wyników, przed wykonaniem tego testu należy uważnie przeczytać całą ulotkę załączoną do opakowania oraz *Instrukcję obsługi Panther System*.

Kwestie związane z laboratorium



- B. PRZESTROGA: Kontrole dla tego testu zawierają ludzkie osocze. Osocze jest ujemne w kierunku antygeny powierzchniowego zapalenia wątroby typu B (HBsAg), przeciwciał HCV, przeciwciał HIV-1 i HIV-2 oraz antygeny HIV podczas testowania zgodnie z procedurami zatwierdzonymi przez US Food and Drug Administration. Ponadto, osocze jest niereaktywne dla RNA wirusa HCV i RNA wirusa HIV-1 podczas testowania licencjonowanymi testami kwasów nukleinowych z wykorzystaniem pul próbek. Wszystkie materiały pochodzące z krwi ludzkiej powinny być uważane za potencjalnie zakaźne i powinny być traktowane z zastosowaniem uniwersalnych środków ostrożności.^{15,16,17}
- C. Procedurę tę powinien wykonywać wyłącznie personel odpowiednio przeszkolony w zakresie stosowania testu Aptima HCV Quant Dx oraz postępowania z materiałami potencjalnie zakaźnymi. Jeśli dojdzie do rozlania, natychmiast zdezynfekować zgodnie z odpowiednimi procedurami w miejscu pracy.
- D. Stosować wyłącznie dostarczone lub określone jednorazowe wyposażenie laboratoryjne.
- E. Przestrzegać rutynowych środków ostrożności stosowanych w laboratorium. Nie pipetować ustami. Nie jeść, nie pić i nie palić w wyznaczonych obszarach pracy. W czasie pracy z próbkami i odczynnikami zestawu nosić jednorazowe rękawiczki bezpudrowe, osłonę oczu oraz odzież laboratoryjną. Dokładnie umyć ręce po pracy z próbkami i odczynnikami zestawu.
- F. Powierzchnie robocze, pipety i inne wyposażenie należy regularnie odkażać, stosując roztwór podchlorynu sodu w stężeniu od 2,5% do 3,5% (od 0,35 M do 0,5 M).
- G. Usunąć wszystkie materiały, które miały kontakt z próbkami i odczynnikami zgodnie z lokalnymi, stanowymi i federalnymi przepisami.^{15,16,17,18} Dokładnie oczyścić i zdezynfekować wszystkie powierzchnie robocze.
- H. Kontrole zawierają azydek sodu jako środek konserwujący. Nie należy używać metalowych przewodów rurowych do przenoszenia odczynników. Jeżeli roztwory zawierające związki azynu sodu są usuwane do instalacji wodociągowej, należy je rozcieńczyć i spłukać dużą ilością bieżącej wody. Te środki ostrożności są zalecane w celu uniknięcia gromadzenia się osadów w metalowych przewodach rurowych, w których mogłyby powstać warunki wybuchowe.

- I. Dobre standardowe praktyki dla laboratoriów molekularnych obejmują monitorowanie środowiska. Aby monitorować środowisko laboratorium, sugeruje się następującą procedurę:
 1. Przygotować wymazówkę z końcówką bawełnianą i dołączyć do próbki do porcjowania próbek Aptima (SAT).
 2. Odpowiednio oznakować każdą SAT.
 3. Napełnić każdą SAT 1 mL rozcieńczalnika do próbek Aptima.
 4. Aby pobrać próbki powierzchniowe, należy lekko zwilżyć wymazówkę wolną od nukleaz dejonizowaną wodą.
 5. Wymazać powierzchnię zainteresowania, wykonując pionowe ruchy z góry na dół. Obrócić wymazówkę o około pół obrotu podczas wymazywania miejsca.
 6. Natychmiast umieścić próbkę wymazu w próbówce i delikatnie odwirować wymazówkę w rozcieńczalniku w celu wyodrębnienia potencjalnych materiałów wymazowych. Przycisnąć wymazówkę do boku próbki transportowej, aby wydobyć jak najwięcej płynu. Wyrzucić wymazówkę i zakręcić próbkę.
 7. Powtórzyć czynności dla pozostałych próbek wymazu.
 8. Zbadać wymaz przy pomocy testu molekularnego.

Kwestie dotyczące próbek

- J. Próbki mogą być zakaźne. W czasie wykonywania tego testu przestrzegać uniwersalnych środków ostrożności^{15,16,17}. Właściwe metody postępowania oraz metody usuwania należy określić na podstawie lokalnych przepisów.¹⁸ Procedurę tę powinien wykonywać wyłącznie personel odpowiednio przeszkolony w zakresie stosowania testu Aptima HCV Quant Dx i przeszkolony w zakresie postępowania z materiałami zakaźnymi.
- K. W trakcie transportu próbek zapewnić prawidłowe warunki przechowywania, pozwoli to zachować ich prawidłowy stan. Nie oceniono stabilności próbek w warunkach transportu innych niż zalecane.
- L. W czasie etapów pracy z próbkami unikać zanieczyszczenia krzyżowego. Zachować szczególną ostrożność, aby uniknąć kontaminacji poprzez rozprzestrzenienie się aerozolu w czasie luzowania lub zdejmowania zakrętek z próbek. W próbkach może występować niezwykle wysokie stężenie mikroorganizmów. Należy dopilnować, aby pojemniki na próbki nie stykały się ze sobą, a zużyte materiały wyrzucić bez przesuwania ich nad jakimikolwiek otwartymi pojemnikami. Zmienić rękawiczki, jeżeli miały kontakt z próbką.

Kwestie dotyczące testu

- M. Nie używać zestawu odczynników, kalibratora lub kontroli po upływie ich terminu ważności.
- N. Nie wymieniać, nie mieszać ani nie łączyć odczynników analitycznych pochodzących z zestawów o różnych numerach serii głównej. Płyny do testu mogą pochodzić z partii o różnych numerach. Kontrole i kalibrator mogą pochodzić z partii o różnych numerach.
- O. Unikać kontaminacji odczynników przez drobnoustroje i nukleazy.
- P. Wszystkie odczynniki analityczne należy przechowywać zamknięte i w określonych temperaturach. W przypadku użycia odczynników analitycznych przechowywanych w niewłaściwych warunkach skuteczność testu może ulec zmianie. Zobacz *Wymagania dotyczące przechowywania odczynników i postępowania z nimi* oraz *Procedura testu w Panther System*, aby uzyskać więcej informacji.

- Q. Nie łączyć odczynników analitycznych ani płynów bez konkretnej instrukcji. Nie wolno dopełniać butelek z odczynnikami lub płynami. Aparat Panther System weryfikuje poziom odczynników.
- R. Niektóre odczynniki w tym zestawie są oznakowane symbolami zagrożenia i bezpieczeństwa.

Uwaga: Stosowane informacje dotyczące zagrożeń są określone przez klasyfikacje kart charakterystyki substancji (Safety Data Sheets, SDS) obowiązujące w UE. Informacje dotyczące zagrożeń występujących w konkretnym regionie opisano w kartach SDS właściwych dla regionów. Dokumenty te znajdują się w bibliotece kart charakterystyki pod adresem www.hologicsds.com.

**Kontrole z zestawu HCV VL**

Azydek sodu 0,2%
Surowica ludzka 95-100%

**OSTRZEŻENIE**


H312 – Działa szkodliwie w kontakcie ze skórą
H412 – Działa szkodliwie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki
P273 – Unikać uwolnienia do środowiska
P280 – Stosować rękawice ochronne / odzież ochronną / ochronę oczu / ochronę twarzy

Wymagania dotyczące przechowywania odczynników i postępowania z nimi

- A. W poniższej tabeli przedstawiono warunki przechowywania i stabilność odczynników, kontroli i kalibratora.

Odczynnik	Przechowywanie nieotwartych odczynników	Zestaw po otwarciu (po przygotowaniu odczynników)	
		Przechowywanie	Stabilność
Odczynnik amplifikacji qHCV	2°C do 8°C		
Roztwór do przygotowania odczynnika amplifikacji qHCV	2°C do 8°C	2°C do 8°C	30 dni ^a
Odczynnik enzymatyczny qHCV	2°C do 8°C		
Roztwór do przygotowania odczynnika enzymatycznego qHCV	2°C do 8°C	2°C do 8°C	30 dni ^a
Odczynnik promotora qHCV	2°C do 8°C		
Roztwór do przygotowania odczynnika promotora qHCV	2°C do 8°C	2°C do 8°C	30 dni ^a
Odczynnik do wychwytywania cząsteczek szukanych qHCV	2°C do 8°C	2°C do 8°C	30 dni ^a
NC CONTROL – (kontrola ujemna) qHCV	-15°C do -35°C	15°C do 30°C	Fiolka jednorazowego użytku Zużyć w ciągu 24 godzin
LPC CONTROL + (kontrola niskododatnia) qHCV	-15°C do -35°C	15°C do 30°C	Fiolka jednorazowego użytku Zużyć w ciągu 24 godzin
HPC CONTROL + (kontrola wysokodatnia) qHCV	-15°C do -35°C	15°C do 30°C	Fiolka jednorazowego użytku Zużyć w ciągu 24 godzin
PCAL (kalibrator dodatni) qHCV	-15°C do -35°C	15°C do 30°C	Fiolka jednorazowego użytku Zużyć w ciągu 24 godzin

^a Po wyjęciu odczynników z aparatu Panther System należy je niezwłocznie przenieść do miejsca o odpowiedniej temperaturze przechowywania.

- B. Wyrzucić pozostałości odczynników po przygotowaniu, których nie wykorzystano, oraz odczynnik do wychwytywania cząstek szukanych (TCR) po 30 dniach lub po upływie daty ważności serii głównej, w zależności od tego, co nastąpi wcześniej.
- C. Odczynniki przechowywane w aparacie Panther System charakteryzują się stabilnością wewnętrzną wynoszącą 72 godzin. Odczynniki można ładować do Panther System do 5 razy. Panther System rejestruje każde załadowanie odczynników.
- D. Po rozmrożeniu kalibratora roztwór musi być klarowny, tzn. nie może być mętny ani nie mogą się w nim wytrącać osady.
-  E. Odczynnik promotora i przygotowany odczynnik promotora są wrażliwe na światło. Te odczynniki należy chronić przed światłem w trakcie przechowywania i przygotowania do stosowania.

Pobieranie i przechowywanie próbek

Uwaga: Z wszystkimi próbkami należy obchodzić się tak, jak gdyby zawierały czynniki potencjalnie zakaźne. Przestrzegać uniwersalnych środków ostrożności.

Uwaga: Należy dopilnować, aby w czasie etapów pracy z próbkami unikać zanieczyszczenia krzyżowego. Należy na przykład wyrzucać zużyty materiał bez przemieszczania go nad otwartymi probówkami.

Uwaga: Do przechowywania zalecane są wyłącznie plastikowe probówki wtórne.

Można użyć próbek krwi pełnej zebranych w poniższych szklanych lub plastikowych probówkach:

- Probówki zawierające kwas etylenodiaminotetraoctowy (EDTA) lub antykoagulant cytrynianu dekstrozy (ACD) lub
- Probówki do przygotowania osocza (PPT)
- Probówki z surowicą
- Probówki do separacji surowicy (SST)

W przypadku surowicy, należy pozwolić na utworzenie się skrzepu przed dalszą obróbką.

A. Pobieranie próbek

Krew pełna może być przechowywana w temperaturze od 2°C do 30°C i musi być odwirowana w ciągu 6 godzin od pobrania próbki. Oddzielić osocze lub surowicę od granulowanych krwinek czerwonych, postępując zgodnie z instrukcjami producenta używanej probówki. Osocze lub surowica mogą być badane w Panther System w probówce pierwotnej lub przeniesione do probówki dodatkowej, takiej jak probówka do porcjowania próbek Aptima. Aby uzyskać objętość reakcji 500 µL, minimalna objętość osocza lub surowicy w pierwotnych probówkach do pobierania próbek wynosi do 1200 µL, a w przypadku probówek dodatkowych minimalna objętość wynosi 700 µL. W poniższej tabeli określono wymagania dotyczące objętości martwej dla każdego typu probówki głównej i dodatkowej.

Probówka (rozmiar i typ)	Objętość martwa w Panther System
Probówka do porcjowania próbek Aptima (SAT)	0,2 mL
12x75 mm	0,5 mL
13x100 mm	0,5 mL
13x100 mm z żelem	0,3 mL
16x100 mm z żelem	0,7 mL

Jeżeli nie są testowane natychmiast, osocze i surowica mogą być przechowywane zgodnie z poniższymi specyfikacjami. Po przeniesieniu do probówki dodatkowej, osocze lub surowicę można zamrozić w temperaturze -20°C. Nie należy przekraczać 3 cykli zamrażania i rozmrażania. Nie zamrażać próbek w roztworach EDTA, ACD lub w pierwotnych probówkach do pobierania surowicy.

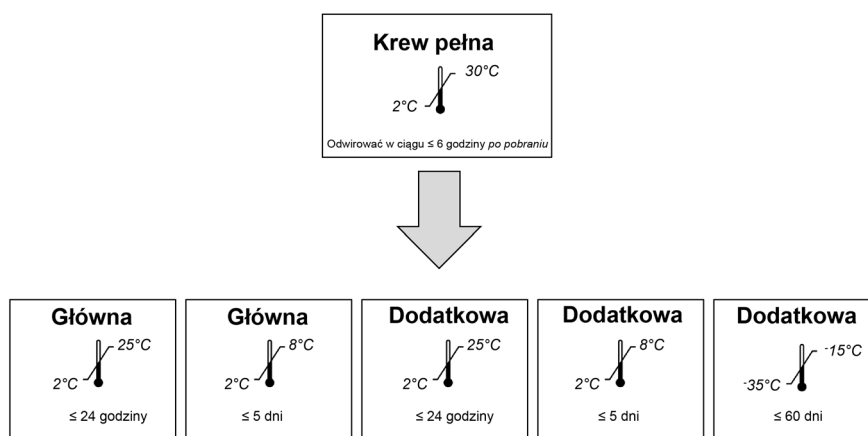
B. Warunki przechowywania próbek

1. Próbkę osocza w EDTA i ACD

Krew pełna może być przechowywana w temperaturze od 2°C do 30°C i musi być odwirowana w ciągu 6 godzin od pobrania próbki. Osocze można następnie przechowywać w jednym z następujących warunków:

- W pierwotnej lub dodatkowej probówce do pobierania w temperaturze od 2°C do 25°C przez okres do 24 godzin,

- W pierwotnej lub dodatkowej probówce do pobierania w temperaturze od 2°C do 8°C przez okres do 5 dni, lub
- W probówce dodatkowej w temperaturze -20°C do 60 dni.

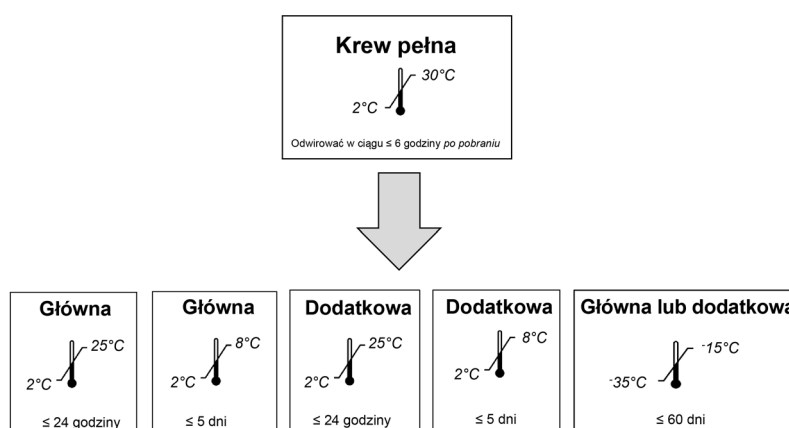


Rysunek 1. Warunki przechowywania próbek z EDTA/ACD

2. Próbkę w probówkach PPT

Krew pełna może być przechowywana w temperaturze od 2°C do 30°C i musi być odwirowana w ciągu 6 godzin od pobrania próbki. Osocze można następnie przechowywać w jednym z następujących warunków:

- W pierwotnej lub dodatkowej probówce do pobierania w temperaturze od 2°C do 25°C przez okres do 24 godzin,
- W pierwotnej lub dodatkowej probówce do pobierania w temperaturze od 2°C do 8°C przez okres do 5 dni, lub
- W pierwotnej lub dodatkowej probówce do pobierania w temperaturze -20°C przez okres do 60 dni.

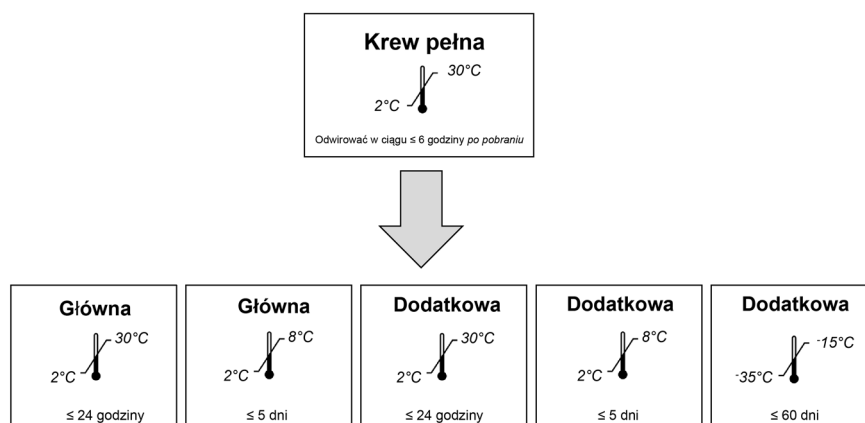


Rysunek 2. Warunki przechowywania dla próbek PPT

3. Próbkę w probówkach z surowicą

Krew pełna może być przechowywana w temperaturze od 2°C do 30°C i musi być odwirowana w ciągu 6 godzin od pobrania próbki. Surowicę można następnie przechowywać w jednym z następujących warunków:

- W pierwotnej lub dodatkowej probówce do pobierania w temperaturze od 2°C do 30°C przez okres do 24 godzin,
- W pierwotnej lub dodatkowej probówce do pobierania w temperaturze od 2°C do 8°C przez okres do 5 dni, lub
- W probówce dodatkowej w temperaturze -20°C do 60 dni.

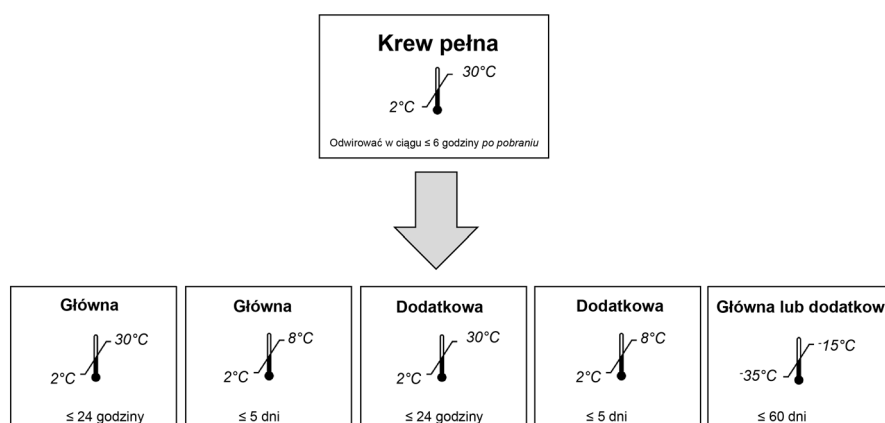


Rysunek 3. Warunki przechowywania probówek z surowicą

4. Próbkę w probówkach SST

Krew pełna może być przechowywana w temperaturze od 2°C do 30°C i musi być odwirowana w ciągu 6 godzin od pobrania próbki. Surowicę można następnie przechowywać w jednym z następujących warunków:

- W pierwotnej lub dodatkowej probówce do pobierania w temperaturze od 2°C do 30°C przez okres do 24 godzin,
- W pierwotnej lub dodatkowej probówce do pobierania w temperaturze od 2°C do 8°C przez okres do 5 dni, lub
- W pierwotnej lub dodatkowej probówce do pobierania w temperaturze -20°C przez okres do 60 dni.



Rysunek 4. Warunki przechowywania SST

C. Przechowywanie długotrwałe w zamrożeniu

Próbki osocza lub surowicy można przechowywać w temperaturze -70°C przez okres do 60 dni w probówkach SAT.

D. Rozcieńczanie próbek osocza i surowicy

Próbki osocza i surowicy można rozcieńczać w probówce SAT lub dodatkowej w celu wykonania testu w Panther System. Patrz *Procedura testu w Panther System*, etap E.6 poniżej, aby uzyskać więcej informacji.

⚠ *Rozcieńczenie próbek osocza i surowicy może być stosowane tylko do wyników ilościowych. Nie należy rozcieńczać próbek osocza lub surowicy w celu uzyskania wyników diagnostycznych.*

Uwaga: *Jeżeli próbka zostanie rozcieńczona, powinna być badana natychmiast po rozcieńczeniu. Nie należy zamrażać rozcieńczonej próbki.*

Próbki w Panther System

Próbki można pozostawiać w Panther System bez zamknięcia na okres do 8 godzin. Próbki można wyjąć z Panther System i poddać badaniu, o ile całkowity czas przebywania w systemie nie przekracza 8 godzin przed pipetowaniem próbki przez Panther System.

Transport próbek

Zachować warunki przechowywania próbek zgodnie z opisem w *Pobieranie i przechowywanie próbek*.

Uwaga: *Próbki należy przesyłać zgodnie z odpowiednimi krajowymi, międzynarodowymi i regionalnymi przepisami transportowymi.*

Panther System

Odczynniki do testu Aptima HCV Quant Dx dla Panther System zostały wymienione poniżej. Obok nazwy odczynnika wymieniono także symbole identyfikujące odczynniki.

Dostarczone odczynniki i materiały

Uwaga: Informacje dotyczące zwrotów wskazujących zagrożenia i środki ostrożności, które mogą się wiązać z odczynnikiem, przedstawiono w bibliotece kart charakterystyki produktów na stronie www.hologic.com/sds.

Zestaw testów Aptima HCV Quant Dx, 100 testów, kat. nr PRD-03506

(1 pudełko testów, 1 zestaw kalibratorów i 1 zestaw kontroli)

Dodatkowe kalibratory i kontrole można zamówić oddzielnie. Poniżej przedstawiono odpowiednie numery katalogowe.

Pudełko z testami Aptima HCV Quant Dx

(po odbiorze przechowywać w temperaturze od 2°C do 8°C)

Symbol	Element	Liczba sztuk
A	Odczynnik amplifikacji qHCV <i>Liofilizowane, niezakaźne kwasy nukleinowe w roztworze buforowanym.</i>	1 fiolka
E	Odczynnik enzymatyczny qHCV <i>Liofilizowana odwrotna transkryptaza i polimeraza RNA w roztworze buforowanym HEPES.</i>	1 fiolka
PRO	Odczynnik promotora qHCV <i>Liofilizowane, niezakaźne kwasy nukleinowe w roztworze buforowanym.</i>	1 fiolka
AR	Roztwór do przygotowania odczynnika amplifikacji qHCV <i>Wodny roztwór zawierający glicerol i środki konserwujące.</i>	1 x 7,2 mL
ER	Roztwór do przygotowania odczynnika enzymatycznego qHCV <i>Roztwór buforowany HEPES zawierający środek powierzchniowo czynny i glicerol.</i>	1 x 5,8 mL
PROR	Roztwór do przygotowania odczynnika promotora qHCV <i>Wodny roztwór zawierający glicerol i środki konserwujące.</i>	1 x 4,5 mL
TCR	Odczynnik do wychwytywania cząsteczek szukanych qHCV <i>Kwasy nukleinowe w buforowanym roztworze soli z fazą stałą, niezakaźne kwasy nukleinowe oraz kalibrator wewnętrzny.</i>	1 x 72,0 mL
	Kołnierze do przygotowania odczynników	3
	Karta z kodami kreskowymi partii głównych	1 karta

Zestaw kalibratorów Aptima HCV Quant Dx (kat. nr PRD-03507)
(po odbiorze przechowywać w temperaturze od -15°C do -35°C)

Symbol	Element	Liczba sztuk
PCAL	Kalibrator dodatni qHCV <i>Transkrypt w roztworze buforowanym.</i>	5 x 2,5 mL
	Etykieta z kodem kreskowym kalibratora	—

Zestaw kontroli Aptima HCV Quant Dx (kat. nr PRD-03508)
(po odbiorze przechowywać w temperaturze od -15°C do -35°C)

Symbol	Element	Liczba sztuk
NC	Kontrola ujemna qHCV <i>HCV-ujemne defibrynowane osocze ludzkie zawierające gentamycynę i 0,2% azydku sodu jako środki konserwujące.</i>	5 x 0,8 mL
LPC	Kontrola niskododatnia qHCV <i>Niezakaźna kontrola wewnętrzna Armored RNA pod kątem wirusa HCV w defibrynowanym osoczu ludzkim zawierającym gentamycynę i 0,2% azydku sodu jako środki konserwujące.</i>	5 x 0,8 mL
HPC	Kontrola wysokodatnia qHCV <i>Niezakaźna kontrola wewnętrzna Armored RNA pod kątem wirusa HCV w defibrynowanym osoczu ludzkim zawierającym gentamycynę i 0,2% azydku sodu jako środki konserwujące.</i>	5 x 0,8 mL
	Etykieta z kodem kreskowym kontroli	—

Materiały wymagane, ale dostępne osobno

Uwaga: Materiały dostarczane przez Hologic są zaopatrzone w numery katalogowe, chyba że podano inaczej.

Materiał	Kat. Nr
Panther System	—
Zestaw wstępny Panther do testów w czasie rzeczywistym (tylko do testów w czasie rzeczywistym)	PRD-03455 (5000 testów)
<i>Zestaw płynów do testu Aptima (znany także jako zestaw uniwersalnych płynów) zawiera roztwór do płukania Aptima, bufor do płynu dezaktywującego Aptima oraz odczynnik olejowy Aptima</i>	303014 (1000 testów)
<i>Zestawy wieloprobówkowe (MTU)</i>	104772-02
<i>Zestaw torby na odpady Panther</i>	902731
<i>Ośłona pojemnika na odpady Panther</i>	504405
Albo zestaw wstępny do aparatu Panther System (w przypadku wykonywania testów TMA nie w czasie rzeczywistym równoległe z testami TMA w czasie rzeczywistym) zawiera MTU, worki na odpady, pokrywy pojemników na odpady, odczynniki Auto Detect oraz płyny testowe	303096 (5000 testów)
Końcówki, 1000 µL, przewodzące, z detekcją cieczy	10612513 (Tecan)
Wybielacz, roztwór podchlorynu sodu w stężeniu od 5% do 7% (od 0,7 M do 1,0 M)	—
Rękawiczki jednorazowe, bezpudrowe	—
Zamienne zakrętki nieprzepuszczalne	103036A
Zakrętki zamienne na odczynniki <i>Butelki do przygotowania odczynników amplifikacji, enzymatycznego i promotora CL0041 (100 zakrętek) Butelka TCRCL0040 (100 zakrętek)</i>	
Wzmocnione plastikiem osłony stołu laboratoryjnego	—
Ściereczki bezpyłowe	—
Pipetor	—
Końcówki	—
Opcje pierwotnej probówki do pobierania próbek:	
<i>13 mm x 100 mm</i>	—
<i>13 mm x 75 mm</i>	—
<i>16 mm x 100 mm</i>	—
Wirówka	—
Wstrząsarka	—

Materiały opcjonalne

Materiał	Kat. Nr
Probówki dodatkowe w opcjach:	
12 mm x 75 mm	—
13 mm x 100 mm	—
16 mm x 100 mm	—
<i>Probówki do porcjowania próbek Aptima (SAT) (opakowanie 100 szt.)</i>	503762
Zakrętki probówek transportowych (opakowanie 100 szt.)	504415
<i>zakrętka do SAT</i>	
Rozcieńczalnik do próbek Aptima	PRD-03003
Zestaw rozcieńczalnika do próbek Aptima	PRD-03478
<i>zawiera rozcieńczalnik do próbek, 100 probówek SAT i 100 zakrętek</i>	
Pipety transportowe	—
Dostępne komercyjnie panele, na przykład:	—
<i>Panele HCV uzyskane z organizacji Quality Control for Molecular Diagnostics (QCMD) lub Panele HCV SeraCare ACCURUN</i>	
Wymazówki z bawełnianą końcówką	—
Wytrząsarka probówek	—

Procedura testu w Panther System

Uwaga: Dodatkowe informacje na temat procedury przedstawiono w Instrukcji obsługi Panther System.

A. Przygotowanie obszaru roboczego

- Oczyścić powierzchnie robocze, na których będą przygotowywane odczynniki. Przetrzeć powierzchnie robocze roztworem podchlorynu sodu w stężeniu od 2,5% do 3,5% (od 0,35 M do 0,5 M). Roztwór podchlorynu sodu powinien mieć kontakt z powierzchniami przez co najmniej 1 minutę, a następnie należy je spłukać wodą dejonizowaną (DI). Nie wolno dopuszczać do wyschnięcia roztworu podchlorynu sodu. Zakryć powierzchnię stołu czystymi, wzmocnionymi plastikiem, chłonnymi osłonami stołu laboratoryjnego.
- Oczyścić odrębną powierzchnię roboczą jako miejsce do przygotowania próbek. Postępować zgodnie z procedurą opisaną powyżej (etap A.1).
- Wyczyścić wszystkie pipety. Postępować zgodnie z procedurą czyszczenia opisaną powyżej (etap A.1).

B. Przygotowanie kalibratora i kontroli

Przed przystąpieniem do przetwarzania kalibrator i kontrole powinny osiągnąć temperaturę od 15°C do 30°C w sposób opisany poniżej:

- Wyjąć kalibrator i kontrole z miejsca przechowywania (-15°C do -35°C) i umieścić w temperaturze 15°C do 30°C. Podczas całego procesu rozmrażania delikatnie odwracać każdą probówkę, aby dokładnie wymieszać próbki. Przed użyciem należy upewnić się, że zawartość próbki jest całkowicie rozmrożona.

Opcja. Probówki z kalibratorem i kontrolą można umieścić na wytrząsarce do probówek w celu dokładnego wymieszania. Przed użyciem należy upewnić się, że zawartość próbki jest całkowicie rozmrożona.

Uwaga: Unikać tworzenia nadmiernej piany podczas odwracania kalibratora i kontroli. Piana negatywnie wpływa na wykrywanie poziomu przez Panther System.

2. Po rozmrożeniu zawartości próbówki osuszyć jej zewnętrzną część czystą, suchą ściereczką jednorazowego użytku.
3. Aby zapobiec kontaminacji, nie należy w tym momencie otwierać próbówek.

C. Przygotowanie odczynników / przygotowanie nowego zestawu

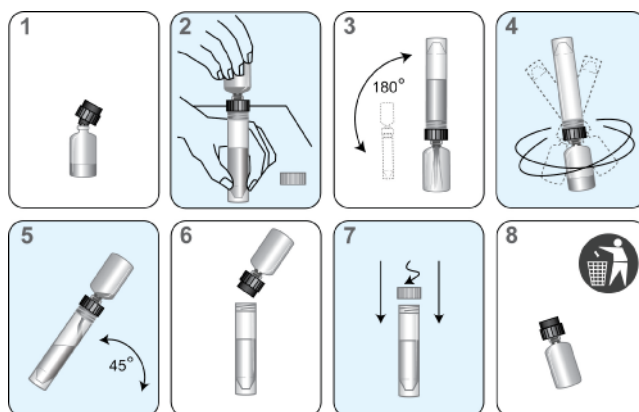
Uwaga: Przygotowanie odczynników należy przeprowadzić przed rozpoczęciem jakichkolwiek prac w aparacie Panther System.

1. Aby przygotować odczynnik do wychwywania cząsteczek szukanych (TCR), należy wykonać poniższe czynności:
 - a. Wyjąć TCR z miejsca przechowywania (2°C do 8°C). Sprawdź numer partii na butelce z TCR, aby upewnić się, że zgadza się on z numerem partii na Karcie kodów kreskowych głównej partii.
 - b. Natychmiast 10 razy energicznie wstrząsnąć butelką TCR. Pozostawić butelkę TCR w temperaturze od 15°C do 30°C do ogrzania przez co najmniej 45 minut. W tym czasie należy odwirować i odwrócić butelkę TCR co najmniej co 10 minut.

Opcja. Butelkę TCR można przygotować na wytrząsarce próbówek, postępując zgodnie z poniższymi instrukcjami: Wyjąć TCR z miejsca przechowywania (2°C do 8°C) oraz natychmiast energicznie wstrząsnąć 10 razy. Umieścić butelkę TCR na wytrząsarce próbówek i pozostawić TCR w temperaturze 15°C do 30°C do ogrzania przez co najmniej 45 minut.
 - c. Przed użyciem należy upewnić się, że cały osad znajduje się w roztworze, a cząstki magnetyczne są zawieszane.
2. W celu odtworzenia odczynników amplifikacji, enzymatycznych i promotorów należy wykonać następujące czynności:
 - a. Wyjąć liofilizowane odczynniki i odpowiednie roztwory do przygotowania z miejsca przechowywania (2°C do 8°C). Dopasować odpowiedni roztwór do każdego liofilizowanego odczynnika.
 - b. Upewnić się, że roztwór do przygotowania i liofilizowany odczynnik mają etykiety w tym samym kolorze. Sprawdzić numery partii na karcie z kodami kreskowymi partii głównych, aby mieć pewność, że połączono odpowiednie odczynniki.
 - i. Otworzyć fiolkę z liofilizowanym odczynnikiem, zdejmując metalową uszczelkę i gumowy korek.
 - ii. Mocno włożyć karbowany koniec kołnierza do przygotowania odczynników (czarnego) na fiolkę (Rysunek 5, etap 1).
 - iii. Otworzyć buteleczkę zawierającą odpowiedni roztwór do przygotowania i odłożyć zakrętkę na czystą, przykrytą powierzchnię roboczą.
 - iv. Umieścić butelkę z roztworem do przygotowania na stabilnej powierzchni (np. na stole). Następnie odwrócić fiolkę z liofilizowanym odczynnikiem nad butelką z roztworem do przygotowania i mocno przymocować kołnierz do butelki z roztworem do przygotowania (Rysunek 5, etap 2).
 - v. Powoli odwrócić połączone butelki (fiolka dołączona do butelki z roztworem), aby umożliwić spływanie roztworu do szklanej fiołki (Rysunek 5, etap 3).
 - vi. Podnieść połączone butelki i odwirować je przez co najmniej 10 sekund (Rysunek 5, etap 4).
 - vii. Odczekać co najmniej 30 minut, aby liofilizowany odczynnik przeszedł do roztworu.
 - viii. Po przejściu liofilizowanego odczynnika do roztworu odwirować połączone butelki przez co najmniej 10 sekund, a następnie lekko wstrząsać roztworem w szklanej fiołce w przód i w tył w celu dokładnego wymieszania.

- c. Ponownie powoli przechylić połączone butelki, aby umożliwić spłynięcie całego roztworu z powrotem do butelki z roztworem do przygotowywania odczynników (Rysunek 5, etap 5).
- d. Ostrożnie zdjąć kołnierz do przygotowywania i szklaną fiolkę (Rysunek 5, etap 6).
- e. Nałożyć zakrętkę na buteleczkę. Na etykiecie wpisać inicjały operatora i datę przygotowania odczynników (Rysunek 5, etap 7).
- f. Wyrzucić kołnierz do przygotowania odczynników i szklaną fiolkę (Rysunek 5, etap 8).

Ostrzeżenie: *Unikać tworzenia nadmiernej piany podczas przygotowywania odczynników. Piana negatywnie wpływa na wykrywanie poziomu przez Panther System.*



Rysunek 5. Proces przygotowania odczynników

- D. Przygotowanie odczynników dla odczynników przygotowanych wcześniej
 1. Wyjąć wcześniej przygotowane odczynniki z miejsca przechowywania (2°C do 8°C).
 2. Przed rozpoczęciem testu uprzednio przygotowane odczynniki amplifikacji, enzymatyczny, promotor i TCR muszą osiągnąć temperaturę pokojową od 15°C do 30°C.
 3. W przypadku wcześniej przygotowanego TCR, przed załadowaniem do systemu należy wykonać etap C.1 powyżej.
 4. Odwirować i odwrócić odczynniki amplifikacji, enzymatyczny i promotora, aby dokładnie wymieszać przed załadowaniem do systemu. Unikać tworzenia nadmiernej piany podczas odwracania odczynników.
 5. Nie wolno dopełniać butelek z odczynnikami. Panther System rozpozna butelki po dopełnieniu i odrzuci je.
- E. Obchodzenie się z próbkami
 1. Należy upewnić się, że przetworzone próbki w probówkach pierwotnych lub nierozcieńczone próbki w probówkach dodatkowych były odpowiednio przechowywane, zgodnie z „Pobieranie i przechowywanie próbek” na stronie 8.
 2. Upewnić się, że zamrożone próbki są dokładnie rozmrożone. Rozmrożone próbki należy wirować przez 3 do 5 sekund w celu dokładnego wymieszania.
 3. Przed rozpoczęciem obróbki próbki powinny osiągnąć temperaturę od 15°C do 30°C. Dodatkowe informacje dotyczące systemu znajdują się w *Próbki w Panther System*.
 4. Należy upewnić się, że każda pierwotna probówka do pobierania próbek zawiera do 1200 µL próbki lub każdy SAT zawiera co najmniej 700 µL próbki. W tabeli znajdującej się w sekcji *Pobieranie próbek* na stronie 8 określono wymagania dotyczące objętości martwej dla każdego typu probówki pierwotnej i dodatkowej. Jeśli konieczne jest rozcieńczenie próbki, patrz etap E.6 poniżej, aby uzyskać więcej informacji.

5. Tuż przed umieszczeniem próbek w statywie na próbki, odwirować każdą próbkę przy 1000-3000g przez 10 minut. Nie zdejmować zakrętek. Pęcherzyki powietrza w probówce mogą wpłynąć negatywnie na wykrywanie poziomu przez Panther System.

Zobacz *Przygotowanie systemu*, etap F.2 poniżej, aby uzyskać informacje dotyczące ładowania statywu i zdjęcia zakrętki.

6. Rozcieńczyć próbkę osocza lub surowicy w stosunku 1:3 w SAT lub 1:100 w probówce dodatkowej.

Próbka może zostać rozcieńczona w probówce dodatkowej w celu wykonania testu w Panther System.

- ⚠ Rozcieńczenie próbek może być stosowane tylko do wyników ilościowych. Nie należy rozcieńczać próbek w celu uzyskania wyników diagnostycznych.

Uwaga: *Jeżeli próbka zostanie rozcieńczona, musi zostać zbadana natychmiast po rozcieńczeniu.*

- a. Rozcieńczanie próbek o małej objętości

Objętość próbek może zostać zwiększona do minimalnej wymaganej objętości (700 µL) przy użyciu rozcieńczalnika do próbek Aptima. Próbki o objętości co najmniej 240 µL można rozcieńczyć w dwóch częściach rozcieńczalnika do próbek (1:3) w następujący sposób:

- i. Umieścić 240 µL próbki w SAT.
- ii. Dodać 480 µL rozcieńczalnika do próbek Aptima.
- iii. Zakręcić probówkę.
- iv. Delikatnie odwrócić 5 razy, aby wymieszać.

Próbki rozcieńczone w stosunku 1:3 mogą być badane przy użyciu opcji 1:3 Panther System (więcej informacji na ten temat znajduje się w *Instrukcji obsługi Panther System*). Oprogramowanie automatycznie poda dokładny wynik po zastosowaniu współczynnika rozcieńczenia. Próbki te zostaną oznaczone jako próbki rozcieńczone.

- b. Rozcieńczanie próbek o wysokim mianie

Jeżeli wynik próbki jest powyżej górnej granicy oznaczalności, można ją rozcieńczyć 99 częściami rozcieńczalnika do próbek Aptima (1:100) w następujący sposób:

- i. Umieścić 30 µL próbki w SAT lub w probówce dodatkowej.
- ii. Dodać 2970 µL rozcieńczalnika do próbek Aptima.
- iii. Zakręcić probówkę.
- iv. Delikatnie odwrócić 5 razy, aby wymieszać.

Próbki rozcieńczone w stosunku 1:100 mogą być badane przy użyciu opcji 1:100 Panther System (więcej informacji na ten temat znajduje się w *Instrukcji obsługi Panther System*). Oprogramowanie automatycznie poda dokładny wynik po zastosowaniu współczynnika rozcieńczenia. Próbki te zostaną oznaczone jako próbki rozcieńczone.

Uwaga: *W przypadku rozcieńczonych próbek o stężeniach czystych większych niż ULoQ, wyniki będą podawane w notacji naukowej.*

F. Przygotowanie systemu

1. Skonfigurować system zgodnie z instrukcjami, które zawiera *Instrukcja obsługi Panther System* i „*Uwagi dotyczące procedury*”. Sprawdzić, czy stosowane są statywy na odczytniki o odpowiedniej wielkości oraz adaptory TCR.

2. Załadowanie próbek do statywów na próbki. Wykonać następujące czynności dla każdej probówki z próbką (próbka oraz, jeśli to konieczne, kalibrator i kontrole):
 - a. Poluzować jedną zakrętkę probówki, ale jeszcze jej nie zdejmować.

***Uwaga:** Zachować szczególną ostrożność, aby uniknąć kontaminacji poprzez rozprzestrzenienie się aerozolu. Delikatnie poluzować zakrętki na próbkach.*
 - b. Załadować probówki z próbkami do statywów na próbki.
 - c. Powtórzyć etapy 2.a i 2.b dla każdej pozostałej próbki.
 - d. Po załadowaniu próbek do statywu na próbki, zdjąć i wyrzucić każdą zakrętkę probówki z próbką z jednego statywu na próbki. Aby uniknąć kontaminacji, nie przenosić zakrętki nad innymi statywami na próbki lub probówkami na próbki.
 - e. W razie potrzeby użyć nowej, jednorazowej pipety do usuwania pęcherzyków powietrza lub piany.
 - f. Po zdjęciu ostatniej zakrętki, załadować statyw z próbkami do wnęki na próbki.

***Uwaga:** Jeśli jednocześnie przeprowadzane są inne testy i typy próbek, należy zabezpieczyć mocowniki próbek przed załadowaniem statywu na próbki do wnęki na próbki.*
 - g. Potworzyć etapy 2.a do 2.f dla kolejnego statywu na próbki.

Uwagi dotyczące procedury

A. Kalibrator i kontrole

1. Probówki z kalibratorem dodatnim qHCV, kontrolą niskododatnią qHCV, kontrolą wysokododatnią qHCV i kontrolą ujemną qHCV można umieścić na dowolnej pozycji w statywie na próbki i w dowolnym torze wnęki na próbki w Panther System. Pipetowanie próbek pobranych od pacjentów rozpocznie się po spełnieniu jednego z dwóch następujących warunków:
 - a. Kalibrator i kontrole są w trakcie przetwarzania przez system.
 - b. Zarejestrowano w systemie ważne wyniki dla kalibratora i kontroli.
2. Po odpipetowaniu próbek z kalibratorem i kontrolami oraz obróbce pod kątem zestawu odczynników analitycznych Aptima HCV Quant Dx próbki można badać powiązaniem, przygotowanym zestawem w okresie do 24 godzin, **o ile nie wystąpiły następujące sytuacje:**
 - a. Wyniki kalibratora lub kontroli są nieważne.
 - b. Usunięto z systemu powiązany zestaw odczynników analitycznych.
 - c. Przekroczono granice stabilności powiązanego zestawu odczynników analitycznych.
3. Kalibrator i każda probówka kontrolna mogą być użyte tylko raz. Próby użycia probówki więcej niż jeden raz mogą prowadzić do błędów przetwarzania.

B. Puder z rękawiczek

Podobnie jak w przypadku każdego systemu odczynników, nadmiar pudru na niektórych rękawiczkach może spowodować kontaminację otwartych próbek. Zaleca się stosować rękawiczki bezpudrowe.

Kontrola jakości

Operator może unieważnić wyniki serii lub próbki w przypadku zaobserwowania i udokumentowania problemów technicznych, związanych z operatorem lub aparatem w trakcie testu. W takim przypadku próbki należy ponownie przebadać.

Kalibracja testu

Aby wygenerować ważne wyniki, należy wykonać kalibrację testu. Pojedynczy kalibrator dodatni jest wykonywany w trzech seriach za każdym razem, gdy do Panther System ładowany jest zestaw odczytników. Raz ustalona kalibracja jest ważna przez okres do 24 godzin. Oprogramowanie Panther System alarmuje operatora, gdy wymagana jest kalibracja. Operator skanuje współczynnik kalibracji znajdujący się na arkuszu kodów kreskowych partii głównej dostarczonym z każdym zestawem odczytników.

Podczas przetwarzania kryteria akceptacji kalibratora są automatycznie weryfikowane przez Panther System. Jeśli ważny jest wynik mniej niż dwóch replikatów kalibratora, oprogramowanie automatycznie unieważnia badanie. Próbki w unieważnionej serii muszą być ponownie przebadane przy użyciu świeżo przygotowanego kalibratora i świeżo przygotowanych kontroli.

Kontrole ujemne i dodatnie

Aby wygenerować ważne wyniki, należy przetestować zestaw kontroli testu. Należy przetestować jeden replikat kontroli ujemnej, kontroli niskododatniej i kontroli wysokododatniej za każdym razem, gdy do Panther System ładowany jest zestaw odczytników. Raz ustalone kontrole są ważne przez okres do 24 godzin. Oprogramowanie Panther System alarmuje operatora, gdy wymagane są kontrole.

Podczas przetwarzania kryteria akceptacji kontroli są automatycznie weryfikowane przez Panther System. Aby wygenerować ważne wyniki, kontrola ujemna musi dawać wynik „Nie wykryto”, a kontrole dodatnie muszą dawać wyniki mieszczące się we wcześniej zdefiniowanych parametrach. Jeśli którakolwiek z kontroli ma nieważny wynik, oprogramowanie automatycznie unieważnia badanie. Próbki w unieważnionej serii muszą być ponownie przebadane przy użyciu świeżo przygotowanego kalibratora i świeżo przygotowanych kontroli.

Kalibrator wewnętrzny / kontrola wewnętrzna

Każda próbka zawiera wewnętrzny kalibrator / kontrolę wewnętrzną (IC). W trakcie przetwarzania kryteria akceptacji IC są automatycznie weryfikowane przez oprogramowanie Panther System. Jeżeli wynik IC jest nieważny, wynik próbki jest unieważniony. Każda próbka z nieważnym wynikiem IC musi zostać ponownie przebadana w celu uzyskania ważnego wyniku.

Oprogramowanie Panther System zostało zaprojektowane w celu dokładnej weryfikacji procesów, gdy procedury są wykonywane zgodnie z instrukcjami zawartymi w niniejszej ulotce dołączonej do opakowania oraz *Instrukcją obsługi Panther System*.

Interpretacja wyników

Panther System automatycznie określa stężenie RNA wirusa HCV dla próbek i kontroli poprzez porównanie wyników z krzywą kalibracyjną. Stężenia RNA wirusa HCV podawane są w j.m./mL i \log_{10} j.m./mL. Interpretacja wyników przedstawiona jest w Tabeli 1. Jeżeli dla rozcieńczonych próbek stosowane jest rozcieńczenie 1:3 lub 1:100, Panther System automatycznie oblicza stężenie HCV dla czystej próbki poprzez pomnożenie rozcieńczonego stężenia przez współczynnik rozcieńczenia, a rozcieńczone próbki są oznaczane jako rozcieńczone.

Uwaga: W przypadku rozcieńczonych próbek, wyniki oznaczone jako „Nie wykryto” lub „wykryto < 10” mogą być generowane przez rozcieńczenie próbki o stężeniu powyżej, ale blisko LoD (granicy wykrywalności) lub LLoQ (dolnej granicy oznaczalności). Zaleca się pobranie i przebadanie innej czystej próbki, jeśli nie uzyskano wyniku ilościowego.

Panther System nie dostarcza wyników jakościowych (tj. „Reaktywny” lub „Niereaktywny”) do użytku diagnostycznego. Operator musi zinterpretować zgłoszone stężenie RNA wirusa HCV na wynik jakościowy (Tabela 1). Próbki z wynikami „Nie wykryto” są niereaktywne dla RNA wirusa HCV. Próbki z wynikami oznaczonymi jako „Wykryto < 10” z wynikami oznaczonymi w zakresie liniowym oraz > 100 000 000 (górną granicą oznaczalności) wskazują, że wykryto RNA wirusa HCV i te próbki są reaktywne dla RNA wirusa HCV.

Tabela 1: Interpretacja wyniku.

Zgłoszony wynik testu Aptima HCV Quant Dx		Interpretacja stężenia RNA wirusa HCV	Interpretacja jakościowa diagnostyki użytkownika ^a
j.m./mL	Wartość \log_{10} ^b		
Nie wykryto	Nie wykryto	Nie wykryto RNA wirusa HCV.	Niereaktywna w kierunku RNA wirusa HCV
Wykryto < 10	> 1,00	Wykryto RNA wirusa HCV, ale poziom poniżej LLoQ	Reaktywna w kierunku RNA wirusa HCV
od 10 do 100 000 000	od 1,00 do 8,00	Stężenie RNA wirusa HCV mieści się w zakresie liniowym od 10 do 100 000 000 j.m./mL	Reaktywna w kierunku RNA wirusa HCV
> 100 000 000	> 8,00	Stężenie RNA wirusa HCV jest powyżej ULoQ	Reaktywna w kierunku RNA wirusa HCV
Nieważny ^c	Nieważny ^c	Wystąpił błąd w czasie tworzenia wyniku. Należy ponownie przetestować próbki	Nieważny

^a Interpretacja diagnostyczna może być dokonana na podstawie próbek surowicy lub osocza, które nie zostały rozcieńczone.

^b Wartość jest obcięta do dwóch miejsc po przecinku.

^c Nieważne wyniki są wyświetlane niebieską czcionką.

Ograniczenia

- Niniejszy test powinien być wykonywany wyłącznie przez osoby przeszkolone w zakresie procedury testowej. Nieprzestrzeganie instrukcji przedstawionych w niniejszej ulotce załączonej do opakowania może spowodować uzyskanie błędnych wyników.
- Wiarygodne wyniki zależą od właściwego pobrania próbek, ich transportu, przechowywania i przetwarzania.

Skuteczność**Granica wykrywalności (LoD) przy zastosowaniu 2. Międzynarodowego Standardu WHO**

Granica wykrywalności (LoD) testu jest definiowana jako stężenie RNA wirusa HCV, które jest wykrywane z 95% lub większym prawdopodobieństwem zgodnie z CLSI EP17-A2.¹⁹

LoD określono poprzez badanie paneli 2. Międzynarodowego Standardu WHO RNA wirusa zapalenia wątroby typu C (NIBSC 96/798 genotyp 1) rozcieńczonego w osoczu i surowicy ludzkiej ujemnych w kierunku wirusa HCV. Zbadano co najmniej 36 replikatów każdego rozcieńczenia z każdą z trzech partii odczynników, co daje co najmniej 108 replikatów na rozcieńczenie. Przeprowadzono analizę probitową w celu wygenerowania przewidywanych granic wykrywalności. Wartości LoD przedstawione w Tabeli 2 to wyniki z partii odczynnika o najwyższej przewidywanej granicy wykrywalności. LoD dla testu Aptima HCV Quant Dx wykorzystującego 2. Międzynarodowy Standard WHO wynosi 4,3 j.m./mL dla osocza i 3,9 j.m./mL dla surowicy.

Tabela 2: Granica wykrywalności przy zastosowaniu 2. Międzynarodowego Standardu WHO dla HCV

Przewidywana granica wykrywalności	Stężenie (j.m./mL)	
	Osocze	Surowica
10%	0,3	0,3
20%	0,4	0,5
30%	0,5	0,6
40%	0,7	0,8
50%	0,9	1,0
60%	1,1	1,2
70%	1,5	1,5
80%	2,0	2,0
90%	3,0	2,9
95%	4,3	3,9

Granica wykrywalności dla różnych genotypów HCV

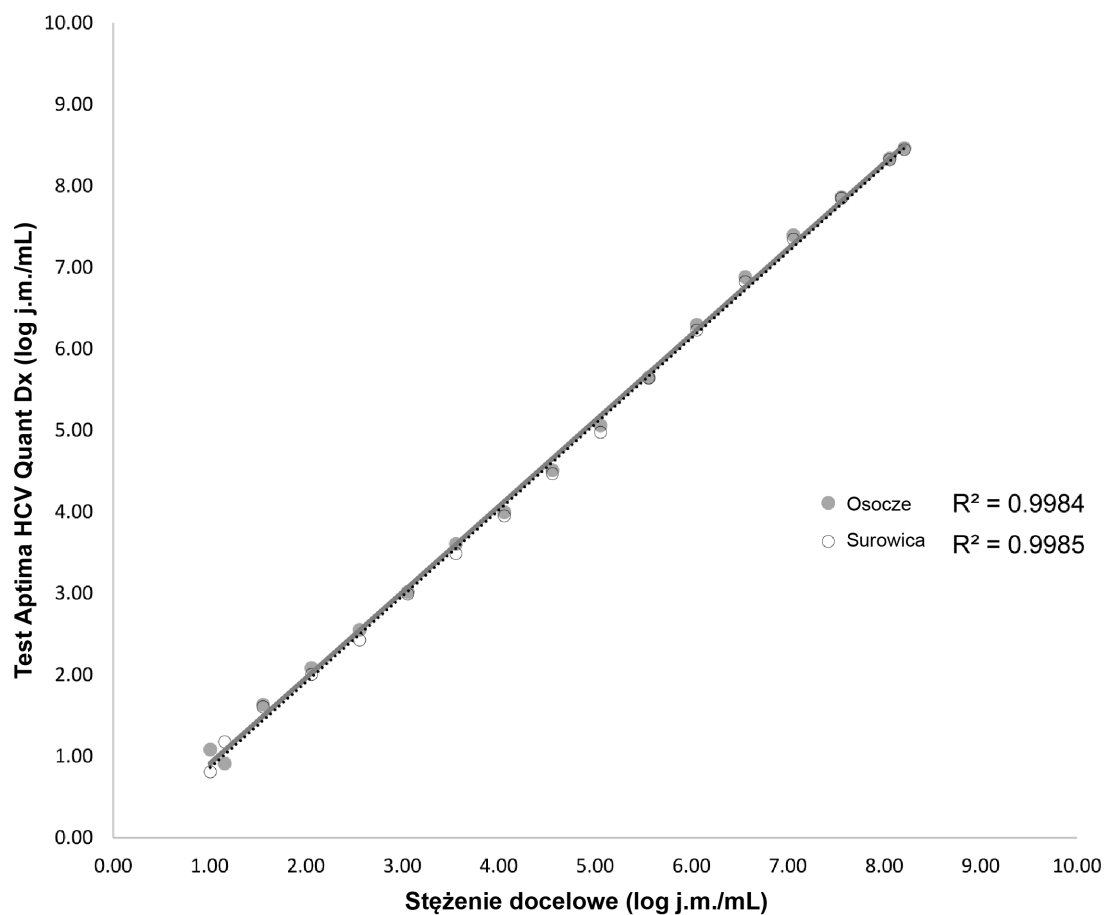
LoD została określona poprzez badanie rozcieńczeń próbek klinicznych HCV-dodatnich dla genotypów 1, 2, 3, 4, 5 i 6 w ludzkim osoczu i surowicy ujemnych w kierunku HCV. Stężenia oznaczono przy użyciu testu porównawczego posiadającego znak CE. Przebadano co najmniej 20 replikatów każdego elementu panelu przy użyciu każdej z trzech serii odczynników, co daje co najmniej 60 replikatów dla każdego elementu panelu. Przeprowadzono analizę probitową w celu wygenerowania przewidywanych granic wykrywalności 50% i 95%. Wartości LoD przedstawione w Tabeli 3 to wyniki z partii odczynnika o najwyższej przewidywanej granicy wykrywalności.

Tabela 3: Granica wykrywalności dla różnych genotypów HCV przy użyciu próbek klinicznych

Genotyp	Przewidywana granica wykrywalności	Stężenie (j.m./mL)	
		Osocze	Surowica
1	50%	0,8	1,3
	95%	3,8	5,1
2	50%	1,0	1,1
	95%	2,8	4,0
3	50%	1,1	1,0
	95%	4,3	3,4
4	50%	1,3	0,7
	95%	4,8	2,3
5	50%	0,8	0,9
	95%	2,1	3,2
6	50%	0,6	0,9
	95%	3,9	3,9

Zakres liniowy

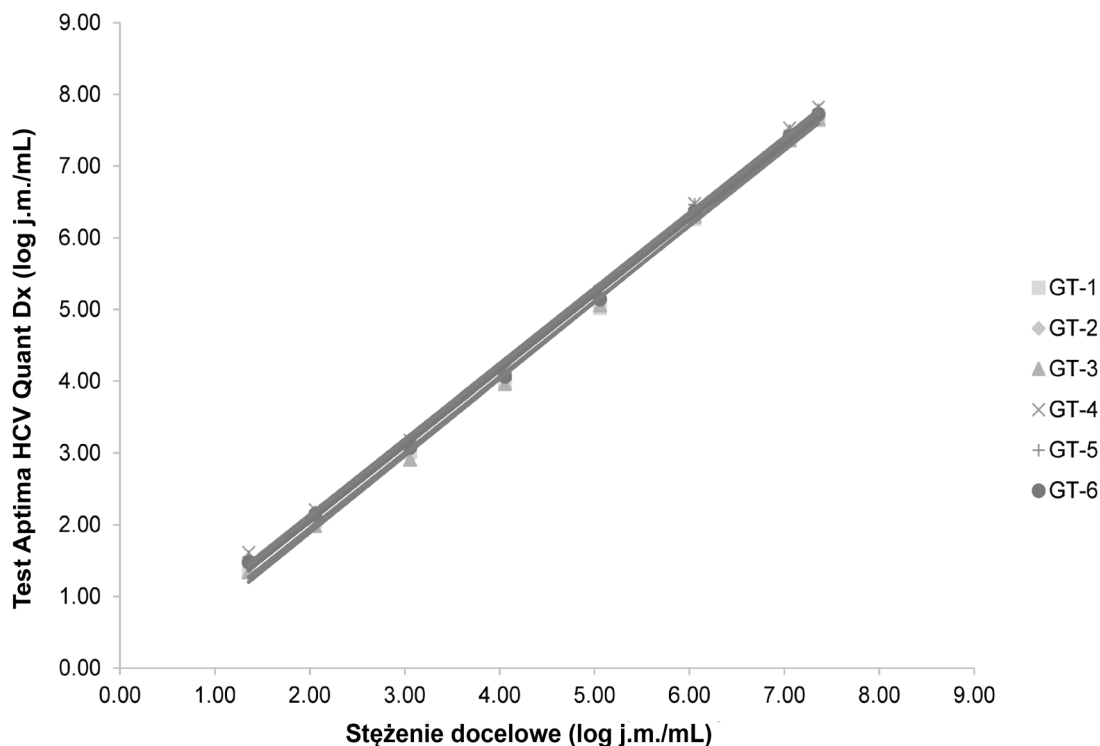
Zakres liniowy został ustalony poprzez badanie paneli Armored RNA wirusa HCV rozcieńczonego w ludzkim osoczu i surowicy ujemnych w kierunku HCV zgodnie z CLSI EP06-A.²⁰ Panele miały stężenie od 1,0 log j.m./mL do 8,2 log j.m./mL. Test Aptima HCV Quant Dx wykazał liniowość w całym badanym zakresie, z górną granicą oznaczalności (ULoQ) wynoszącą 8,0 log j.m./mL, jak pokazano na Rysunek 6.



Rysunek 6. Liniowość w osoczu i surowicy

Liniowość według genotypów HCV

Odpowiedź liniowa dla genotypów 1, 2, 3, 4, 5 i 6 została potwierdzona przez badanie paneli transkryptu wirusa HCV rozcieńczonego w buforze w stężeniach od 1,36 log j.m./mL do 7,36 log j.m./mL. Badania przeprowadzono na trzech aparatach Panther System z użyciem trzech serii odczynników. Liniowość została wykazana w całym badanym zakresie dla wszystkich badanych genotypów, jak pokazano na Rysunek 7.



Rysunek 7. Liniowość dla genotypów HCV od 1 do 6

Dolna granica oznaczalności przy zastosowaniu 2. Międzynarodowego Standardu WHO

Dolna granica oznaczalności (LLoQ) jest definiowana jako najniższe stężenie, przy którym RNA wirusa HCV jest wiarygodnie oznaczane ilościowo w ramach błędu całkowitego (TE), zgodnie z CLSI EP17-A2.¹⁹ Błąd całkowity oszacowano dwiema metodami: Całkowity błąd analityczny (TAE) = |obciążenie| + 2SD, a Całkowity błąd (TE) = SQRT(2) x 2SD. Aby zapewnić dokładność i precyzję pomiarów, błąd całkowity testu Aptima HCV Quant Dx został ustalony na poziomie 1 log j.m./mL (tj. w LLoQ różnica między dwoma pomiarami większa niż 1 log j.m./mL jest statystycznie istotna).

LLoQ określono poprzez badanie paneli 2. Międzynarodowego Standardu WHO RNA wirusa zapalenia wątroby typu C (NIBSC 96/798, genotyp 1) rozcieńczonego w osoczu i surowicy ludzkiej ujemnych w kierunku wirusa HCV. Zbadano co najmniej 36 replikatów każdego rozcieńczenia z każdą z trzech partii odczynników, co daje co najmniej 108 replikatów na rozcieńczenie. Wyniki z partii odczynnika o najwyższym stężeniu równym lub większym niż LoD oraz spełniającym wymagania TE i TAE przedstawiono w Tabeli 4 dla osocza i Tabela 5 dla surowicy. LLoQ dla 2. Międzynarodowego Standardu WHO wynosi 7 j.m./mL (0.82 log j.m./mL) dla osocza i 9 j.m./mL (0.93 log j.m./mL) dla surowicy, jak podsumowano w Tabeli 6. LLoQ zostało ustalone dla różnych genotypów (patrz następna sekcja „Określenie dolnej granicy oznaczalności (LLoQ) dla różnych genotypów HCV”). Te dane genotypów ustaliły ogólną wartość LLoQ dla testu na 10 j.m./mL.

Tabela 4: LLoQ przy zastosowaniu 2. Międzynarodowego Standardu WHO wirusa HCV rozcieńczonego w osoczu

Partia odczynników	Stężenie docelowe	Stężenie docelowe	Aptima HCV Quant Dx	SD	Obciążenie	Obliczony TE	Obliczone TAE
	(j.m./mL)	(log j.m./mL)	(log j.m./mL)	(log j.m./mL)	(log j.m./mL)	(log j.m./mL)	(log j.m./mL)
1	3	0,48	0,53	0,30	0,05	0,85	0,65
	6	0,78	0,73	0,31	-0,04	0,88	0,67
	8	0,90	1,08	0,23	0,18	0,65	0,64
2	3	0,48	0,37	0,32	-0,11	0,92	0,75
	6	0,78	0,82	0,27	0,04	0,78	0,59
	8	0,90	0,96	0,26	0,06	0,74	0,58
3	3	0,48	0,46	0,25	-0,01	0,71	0,52
	6	0,78	0,76	0,34	-0,02	0,95	0,69
	8	0,90	0,89	0,26	-0,01	0,73	0,53

SD = odchylenie standardowe

Tabela 5: LLoQ przy zastosowaniu 2. Międzynarodowego Standardu WHO wirusa HCV rozcieńczonego w surowicy

Partia odczynników	Stężenie docelowe	Stężenie docelowe	Aptima HCV Quant Dx	SD	Obciążenie	Obliczony TE	Obliczone TAE
	(j.m./mL)	(log j.m./mL)	(log j.m./mL)	(log j.m./mL)	(log j.m./mL)	(log j.m./mL)	(log j.m./mL)
1	3	0,48	0,65	0,33	0,17	0,94	0,84
	6	0,78	0,93	0,32	0,15	0,90	0,79
	8	0,90	1,08	0,28	0,18	0,80	0,74
2	3	0,48	0,52	0,36	0,04	1,02	0,76
	6	0,78	0,89	0,32	0,11	0,90	0,75
	8	0,90	1,01	0,21	0,11	0,60	0,53
3	3	0,48	0,47	0,39	-0,01	1,11	0,79
	6	0,78	0,71	0,30	-0,06	0,86	0,67
	8	0,90	0,95	0,29	0,05	0,83	0,63

SD = odchylenie standardowe

Tabela 6: Podsumowanie LLoQ przy zastosowaniu 2. Międzynarodowego Standardu WHO dla HCV

Partia odczynników	LLoQ osocza		LLoQ surowicy	
	(log j.m./mL)	(j.m./mL)	(log j.m./mL)	(j.m./mL)
1	0,73	5	0,93	9
2	0,82	7	0,89	8
3	0,76	6	0,71	5

Określenie dolnej granicy oznaczalności (LLOQ) dla różnych genotypów HCV

LLOQ określona poprzez badanie rozcieńczeń próbek klinicznych HCV-dodatnich dla genotypów 1, 2, 3, 4, 5 i 6 w ludzkim osoczu i surowicy ujemnych w kierunku HCV. Przypisanie stężenia dla próbek klinicznych zostało określone przy użyciu testu porównawczego posiadającego znak CE. Przebadano co najmniej 36 replikatów każdego elementu panelu przy użyciu każdej z trzech serii odczynników, co daje co najmniej 108 replikatów dla każdego elementu panelu. Wyniki z partii odczynników o najwyższym stężeniu równym lub większym niż LoD oraz spełniającym wymagania TE i TAE przedstawiono w Tabeli 7 dla osocza i Tabeli 8 dla surowicy. LLOQ dla genotypów 1 do 6 w osoczu i surowicy podsumowano w Tabeli 9. Ustaliło to ogólną wartość LLOQ dla testu na 10 j.m./mL.

Tabela 7: Określenie LLOQ w osoczu w zależności od genotypu

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

SD = odchylenie standardowe

Tabela 8: Określenie LLoQ w surowicy w zależności od genotypu

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

SD = odchylenie standardowe

Tabela 9: Podsumowanie LLoQ w osoczu i surowicy w zależności od genotypu

Genotyp HCV	LLoQ osocza		LLoQ surowicy	
	(log j.m./mL)	(j.m./mL)	(log j.m./mL)	(j.m./mL)
1	0,88	8	0,88	8
2	0,76	6	0,80	6
3	0,80	6	0,67	5
4	0,82	7	0,65	4
5	0,87	7	0,72	5
6	0,79	6	0,99	10

Precyzja

Aby ocenić precyzję, utworzono 10-elementowy panel poprzez rozcieńczenie próbek klinicznych HCV-dodatnich lub dodanie Armored RNA wirusa HCV do osocza i surowicy HCV-ujemnych. Panel był testowany przez trzech operatorów przy użyciu trzech partii odczynników na trzech aparatach Panther System w ciągu 21 dni.

Tabela 10 przedstawia precyzję wyników testów (w log j.m./mL) pomiędzy urządzeniami, pomiędzy operatorami, pomiędzy partiami, pomiędzy seriami, w obrębie serii i ogólnie. Całkowita zmienność dla wszystkich elementów panelu wyniosła $\leq 13,31\%$, wynikała ona głównie ze zmienności w ramach serii (tj. błędu losowego).

Tabela 10: Precyzja testu Aptima HCV Quant Dx

Matryca	N	Średnie stężenie (log j.m./mL)	Pomiędzy urządzeniami		Pomiędzy operatorami		Pomiędzy partiami		Pomiędzy seriami		W ramach serii		Ogółem	
			SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)
Osocze	98 ^a	1,23	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	3,35	0,06	4,54	0,12	9,84	0,14	11,34
Osocze	162	2,06	0,05	2,23	0,00	0,00	0,07	3,20	0,03	1,47	0,10	4,91	0,14	6,88
Osocze	162	3,02	0,03	0,89	0,01	0,24	0,04	1,47	0,01	0,33	0,09	3,08	0,11	3,77
Osocze	162	4,87	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,60	0,04	0,86	0,06	1,13	0,10	2,04
Osocze	162	7,16	0,02	0,21	0,01	0,20	0,04	0,52	0,00	0,00	0,05	0,75	0,09	1,27
Surowica	132 ^a	1,27	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07	5,16	0,00	0,00	0,15	12,17	0,17	13,31
Surowica	162	2,17	0,02	0,99	0,04	1,71	0,07	3,01	0,05	2,15	0,08	3,53	0,12	5,61
Surowica	162	3,09	0,02	0,67	0,00	0,00	0,06	1,79	0,03	0,90	0,07	2,26	0,11	3,44
Surowica	161	4,86	0,00	0,00	0,04	0,78	0,08	1,67	0,00	0,00	0,08	1,72	0,13	2,65
Surowica	162	7,16	0,00	0,00	0,05	0,70	0,05	0,73	0,02	0,31	0,04	0,55	0,10	1,35

CV = współczynnik zmienności, SD = odchylenie standardowe

^a Liczba ważnych wyników w zakresie liniowym testu.

Uwaga: Zmienność w przypadku niektórych czynników może być liczbowo ujemna, co może mieć miejsce jeśli zmienność w wyniku tych czynników jest bardzo niska. W takich przypadkach wartości SD i CV przedstawiono jako 0.

Potencjalne substancje zakłócające

Oceniono podatność testu Aptima HCV Quant Dx na zakłócenia spowodowane podwyższonym poziomem substancji endogennych lub lekami powszechnie przepisywanymi osobom zakażonym wirusem HCV. Badano próbki osocza ujemne w kierunku HCV oraz próbki z domieszką HCV do stężenia 3,3 log j.m./mL RNA wirusa HCV.

Nie zaobserwowano zakłóceń w wynikach testu w obecności albuminy (90 mg/mL), hemoglobiny (5 mg/mL), trójglicerydów (30 mg/mL) lub niezwiązanej bilirubiny (0,2 mg/mL).

Próbki osocza pobrane od pacjentów z podwyższonym poziomem zdefiniowanych substancji lub od pacjentów z chorobami wymienionymi w Tabeli 11 zostały przebadane przy użyciu testu Aptima HCV Quant Dx. Nie zaobserwowano żadnych zakłóceń w przeprowadzaniu testu.

Tabela 11: Badane typy próbek klinicznych

Typy próbek klinicznych	
1	Czynnik reumatoidalny (RF)
2	Przeciwciała przeciwjądrowe (ANA)
3	Przeciwciała anty-Jo-1 (JO-1)
4	Toczeń rumieniowaty (SLE)
5	Reumatoidalne zapalenie stawów (RA)
6	Stwardnienie rozsiane (MS)
7	Hiperglobulinemia
8	Podwyższona aminotransferaza alaninowa (ALT)
9	Podwyższona aminotransferaza asparaginianowa (AST)
10	Alkoholowa marskość wątroby (AC)
11	Szpiczak plazmocytowy (MM)
12	Lipemia (podwyższony poziom lipidów)
13	Żółtaczka (podwyższona bilirubina)
14	Hemoliza (podwyższona hemoglobina)
15	Podwyższony poziom albumin białkowych
16	Przeciwciała HBV
17	Przeciwciała HIV-1
18	Przeciwciała HIV-2

Nie zaobserwowano zakłóceń wyników testu w obecności substancji egzogennych wymienionych w Tabeli 12 w stężeniach co najmniej trzykrotnie większych niż C_{max} (ludzkie osocze).

Tabela 12: Substancje egzogenne

Pula substancji egzogennych	Badane substancje egzogenne
1	Telaprewir, klarytromycyna, interferon alfa-2a, dolutegrawir, azytromycyna
2	Symeprewir, sofosbuwir
3	Efawirenz, boceprewir, pegylowany interferon alfa-2b, emtrycytabina, raltegrawir, amoksylicyna
4	Siarczan abakawiru, rybawiryne, dazabuwir, ryliwiryna, ryfampina/ryfampicyne
5	Lopinawir, tenofowir, lamiwudyna, walgancyklowir
6	Heparyna, EDTA, cytrynian sodu

Swoistość

Swoistość określono na podstawie 198 świeżych i 538 zamrożonych próbek klinicznych ujemnych w kierunku HCV. Łącznie przebadano 370 próbek osocza i 366 próbek surowicy. Swoistość została obliczona jako procent próbek ujemnych w kierunku HCV z wynikami „Nie wykryto”. W 736 próbkach nie wykryto RNA wirusa HCV. Swoistość wyniosła 100% (736/736, 95-procentowy przedział ufności: 99,6-100%).

Tabela 13: Swoistość w próbkach klinicznych osocza i surowicy

	Świeże osocze	Zamrożone osocze	Osocze Ogółem	Świeża Surowica	Zamrożona surowica	Surowica Ogółem	Połączone
Ważne replikaty (n)	100	270	370	98	268	366	736
Nie wykryto	100	270	370	98	268	366	736
Swoistość (95% CI)	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	(97,1-100)	(98,9-100)	(99,2-100)	(97,0-100)	(98,9-100)	(99,2-100)	(99,6-100)

CI = Przedział ufności

Swoistość analityczna

Potencjalna reaktywność krzyżowa z patogenami wymienionymi w Tabeli 14 została oceniona w ludzkim HCV-ujemnym osoczu w obecności lub nieobecności 3,3 log j.m./mL wirusa HCV. Nie zaobserwowano reaktywności krzyżowej. W obecności patogenów nie zaobserwowano żadnych zakłóceń.

Tabela 14: Patogeny badane pod kątem swoistości analitycznej

Patogen	Stężenie		Patogen	Stężenie	
Wirus zapalenia wątroby typu A	100 000	kopii/mL	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	1 000 000	CFU/mL ^f
Wirusowe zapalenie wątroby typu B (HBV)	100 000	j.m./mL ^a	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1 000 000	CFU/mL
Wirus zapalenia wątroby typu G	1 470	PFU/mL ^b	<i>Staphylococcus aureus</i>	1 000 000	CFU/mL
HIV-1	100 000	kopii/mL	<i>Propionibacterium acnes</i>	1 000 000	CFU/mL
HIV-2	100 000	PFU/mL	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1 000 000	CFU/mL
Wirus opryszczki pospolitej typu 1 (HSV-1)	100 000	PFU/mL	<i>Candida albicans</i>	1 000 000	CFU/mL
Wirus opryszczki pospolitej typu 2 (HSV-2)	100 000	PFU/mL	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1 000 000	CFU/mL
Ludzki herpeswirus typu 6B	100 000	kopii/mL	<i>Chlamydia trachomatis</i>	1 000 000	IFU/mL ^g
Ludzki herpeswirus typu 8	2 667	TCID50 U/mL ^c	<i>Trichomonas vaginalis</i>	1 000 000	komórek/mL
Ludzki wirus T-limfotropowy typu 1 (HTLV-1)	100 000	vp/mL ^d			
Ludzki wirus T-limfotropowy typu 2 (HTLV-2)	100 000	vp/mL			
Parowirus B19	100 000	j.m./mL			
Wirus Zachodniego Nilu	100 000	PFU/mL			
Wirus dengi typu 1	100 000	PFU/mL			
Wirus dengi typu 2	100 000	PFU/mL			
Wirus dengi typu 3	100 000	PFU/mL			
Wirus dengi typu 4	100 000	PFU/mL			
Cytomegalowirus	100 000	PFU/mL			
Wirus Epsteina-Barr	100 000	kopii/mL			
Wirus różyczki	100 000	PFU/mL			
Ludzki wirus brodawczaka (Papillomavirus)	100 000	komórek/mL			
Adenowirus typu 5	100 000	TCID50 U/mL			
Wirus grypy A	100 000	TCID50 U/mL			
Wirus japońskiego zapalenia mózgu koni	N/D	N/D			
Wirus zapalenia mózgu St. Louis	N/D	N/D			
Wirus zapalenia mózgu doliny Murray	2 643	LD/mL ^e			
Wirus żółtej gorączki	100 000	komórek/mL			

^a j.m./mL = Jednostki międzynarodowe na mL

^b PFU/mL = Jednostki tworzące tysinki na mL

^c TCID50 U/mL = Jednostki dawki zakaźnej dla hodowli tkankowej na mL

^d vp/mL = Cząstki wirusowe na mL

^e LD/mL = Dawka śmiertelna na mL

^f CFU/mL = Jednostki tworzące kolonie na mL

^g IFU/mL = Jednostki tworzące inkluzje na mL

Próbki kliniczne zawierające wirusy inne niż HCV

Patogeny wymienione w Tabeli 15 zostały ocenione poprzez uzyskanie pojedynczych naturalnie zakażonych próbek klinicznych. Były one badane w obecności lub nieobecności 3,3 log j.m./mL RNA wirusa HCV. Nie zaobserwowano reaktywności krzyżowej. Nie zaobserwowano żadnych zakłóceń.

Tabela 15: Próbki kliniczne badane pod kątem swoistości analitycznej

Mikroorganizm	Matryca	N (dawcy)
HBV	surowica	5
HBV	osocze	5
Wirus dengi	osocze	10
Wirus zapalenia wątroby typu A	osocze	10
HTLV-1	osocze	10
HTLV-2	osocze	10
HIV-1	osocze	10
Wirus Zachodniego Nilu	osocze	10

Powtarzalność próbek klinicznych

Powtarzalność oceniano poprzez testowanie trzech replikatów naturalnie zakażonych HCV-dodatnich próbek klinicznych osocza i surowicy. Średnie stężenie i odchylenie standardowe dla badanych próbek osocza i surowicy są przedstawione w Tabeli 16 i 17.

Tabela 16: Powtarzalność próbek klinicznych osocza

ID próbki osocza	Średnie stężenie (log j.m./mL)	SD
1	1,68	0,05
2	1,69	0,17
3	1,73	0,06
4	1,73	0,06
5	1,84	0,05
6	2,30	0,10
7	2,71	0,09
8	2,80	0,06
9	3,22	0,04
10	3,80	0,05
11	4,12	0,08
12	4,21	0,11
13	4,90	0,14
14	6,94	0,11
15	7,05	0,04

Tabela 17: Powtarzalność próbek klinicznych surowicy

ID próbki surowicy	Średnie stężenie (log j.m./mL)	SD
1	1,67	0,07
2	1,74	0,10
3	1,86	0,15
4	1,67	0,07
5	2,00	0,07
6	2,51	0,08
7	3,12	0,23
8	3,29	0,02
9	3,70	0,18
10	3,99 ^a	0,13
11	4,35	0,05
12	5,48	0,12
13	5,74	0,07
14	5,80	0,13
15	7,15	0,10

^aWynik z dwóch z trzech badanych replikatów. Usunięto jeden odstający replikat.

Rozcieńczanie próbki przy użyciu rozcieńczalnika do próbek

Aby ocenić odzysk RNA wirusa HCV w próbkach rozcieńczonych rozcieńczalnikiem do próbek Aptima, próbki osocza i surowicy, które obejmowały zakres liniowy, zostały rozcieńczone w stosunku 1:3 rozcieńczalnikiem do próbek Aptima. Dodatkowo, naturalnie zakażone próbki kliniczne o wysokim mianie oraz próbki z domieszką Armored RNA wirusa HCV o stężeniu powyżej ULoQ zostały rozcieńczone w stosunku 1:100 przy użyciu rozcieńczalnika do próbek Aptima. Każda próbka była badana w postaci czystej i rozcieńczonej (1:3 lub 1:100) w trzech replikatach. Różnice między średnim podawanym stężeniem (współczynnik rozcieńczenia zastosowany do wyniku rozcieńczonej próbki) a średnim czystym stężeniem są pokazane w Tabeli 18 dla osocza i Tabela 19 dla surowicy. Stężenia próbek zostały dokładnie odtworzone w rozcieńczonych próbkach.

Tabela 18: Rozcieńczenie próbek za pomocą rozcieńczalnika do próbek Aptima – Osocze

Rozcieńczenie	Średnie stężenie czyste (log j.m./mL)	Średnie zgłoszone stężenie ^a (log j.m./mL)	Różnica
1:3	1,68	1,89	-0,21
	1,69	1,69	0,00
	1,73	2,11	-0,38
	1,73	1,78	-0,05
	1,84	1,80	0,04
	2,30	2,23	0,07
	2,71	2,76	-0,05
	2,80	2,76	0,04
	3,22	3,28	-0,06
	3,80	3,71	0,09
	4,12	4,06	0,06
	4,21	4,07	0,14
	4,90	4,68	0,22
	6,94	6,72	0,22
	7,05	6,91	0,14
1:100	7,05	6,59	0,46
	> 8,00 (8,45) ^b	8,38	0,07

^aZgłoszone stężenie to wartość obliczona po zastosowaniu współczynnika rozcieńczenia.

^bPróbka z domieszką.

Uwaga: Wszystkie wyniki > 8,00 log j.m./mL zostały oszacowane przy użyciu dodatkowej analizy.

Tabela 19: Rozcieńczenie próbek za pomocą rozcieńczalnika do próbek Aptima – Surowica

Współczynnik rozcieńczenia	Średnie czyste Stężenie (log j.m./mL)	Średnie zgłoszone stężenie ^a (log j.m./mL)	Różnica
1:3	1,67	1,85	-0,18
	1,74	1,72	0,02
	1,86	1,66	0,20
	1,67	1,85	-0,18
	2,00	1,91	0,09
	2,51	2,37	0,14
	3,12	3,01	0,11
	3,29	3,35	-0,06
	3,70	3,53	0,17
	3,99 ^c	3,87	0,12
	4,35	4,30	0,05
	5,48	5,25	0,23
	5,74	5,62	0,12
	5,80	5,50	0,30
7,15	6,86	0,29	
1:100	7,15	6,65	0,50
	> 8,00 (8,44) ^b	8,46	-0,02

^aZgłoszone stężenie to wartość obliczona po zastosowaniu współczynnika rozcieńczenia.

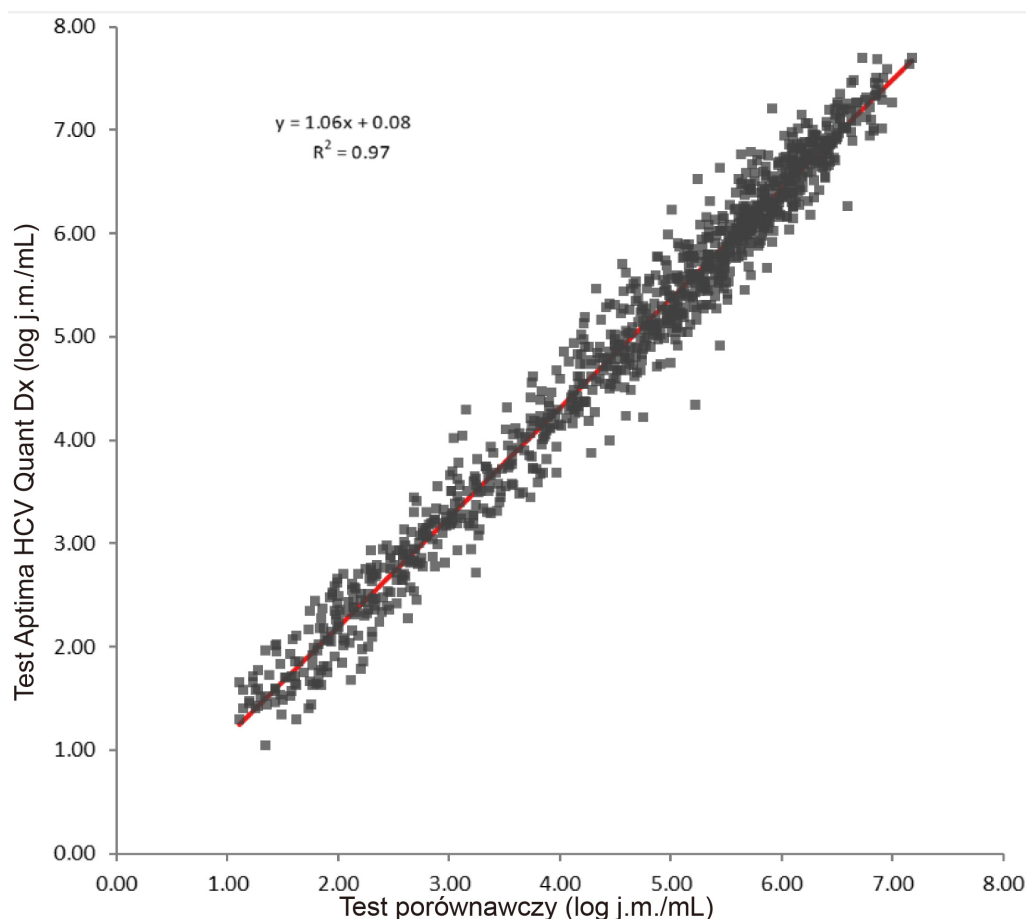
^bPróbka z domieszką.

^cWynik z dwóch z trzech badanych replikatów. Usunięto jeden odstający replikat.

Uwaga: Wszystkie wyniki > 8,00 log j.m./mL zostały oszacowane przy użyciu dodatkowej analizy.

Korelacja metod

Skuteczność testu Aptima HCV Quant Dx została oceniona w porównaniu z testem porównawczym posiadającym znak CE poprzez testowanie nierozcieńczonych klinicznych próbek od pacjentów zakażonych HCV na trzech aparatach Panther System przy użyciu czterech serii odczynników. Do regresji liniowej użyto 1058 próbek osocza i surowicy (872 osocza, 186 surowicy) wszystkich genotypów HCV w zakresie liniowym wspólnym dla obu testów, jak pokazano w Rysunek 8.



Rysunek 8. Korelacja pomiędzy testem Aptima HCV Quant Dx a testem porównawczym

Zgodność diagnostyczna

Aby ocenić zgodność diagnostyczną, 227 próbek osocza i surowicy od osób zakażonych HCV zbadano przy użyciu testu Aptima HCV Quant Dx i porównawczego testu jakościowego posiadającego znak CE. Każdy wynik dający wynik kwantyfikowalny lub wykrywalny został zakwalifikowany jako „Wykryto”. Każdy wynik, w którym nie wykryto cząsteczek szukanych, został skategoryzowany jako „Nie wykryto cząsteczek szukanych”. Zgodność diagnostyczna pomiędzy testami wynosiła 100%, jak pokazano w Tabeli 20.

Tabela 20: Zgodność diagnostyczna pomiędzy testem Aptima HCV Quant Dx a testem porównawczym

		Test Aptima HCV Quant Dx	
		Wykryto	Nie wykryto cząsteczek szukanych
Test porównawczy	Wykryto	99	0
	Nie wykryto cząsteczek szukanych	0	128

Przenoszenie

Aby ustalić, że Panther System minimalizuje ryzyko fałszywie dodatnich wyników wynikających z zanieczyszczenia przez przeniesienie, przeprowadzono badanie z wykorzystaniem paneli z domieszkami na trzech aparatach Panther System. Przenoszenie oceniono przy użyciu próbek osocza z domieszką Armored RNA o wysokim mianie (7 log j.m./mL), przeplatanych między próbkami ujemnymi w kierunku HCV w szachownicy. Testy przeprowadzono w piętnastu seriach. Ogólny wskaźnik przenoszenia wyniósł 0,14% (1/704).

Panel serokonwersji

Przebadano jedenaście zestawów paneli serokonwersji HCV, łącznie 72 próbki. Wyniki testu Aptima HCV Quant Dx zostały porównane z wynikami testów na obecność przeciwciał HCV. Liczba dni do pierwszego wyniku reaktywnego jest podana w Tabeli 21. Test Aptima HCV Quant Dx wykrywa obecność HCV średnio o 20 dni wcześniej niż testy na obecność przeciwciał.

Tabela 21: Podsumowanie danych dla panelu serokonwersji

ID panelu	Liczba przebadanych elementów panelu	Liczba reaktywnych elementów panelu			Dni do pierwszego reaktywnego wyniku			Różnica w dniach do pierwszego wyniku reaktywnego (na podstawie daty pobrania krwi)	
		Aptima HCV Quant Dx	Test 1 na przeciwciała HCV	Test 2 na przeciwciała HCV	Aptima HCV Quant Dx	Test 1 na przeciwciała HCV	Test 2 na przeciwciała HCV	Dni wcześniej niż test 1 na przeciwciała HCV	Dni wcześniej niż test 2 na przeciwciała HCV
PHV911	4	4	3	3	14	14	11	11	
PHV913	4	4	0	0	g ^b	7	9	7	
PH919	7	4	3	3	25	28	3	3	
PH920	9	9	7	6	0 ^c	13	13	16	
PH921	11	11	9	7	0	7	7	18	
PH923	6	6	2	2	0	21	21	21	
PH924	6	6	3	3	0	59	59	59	
PH925	5	5	1	1	0	27	27	27	
PH926	5	5	1	0	0	14	14 ^b	14	
6227	7	4	2	2	42	74	32	32	
6229	8	8	4	3	0	17	17	20	
Ogółem	72	66	35	32			Średnia 19,36	20,73	
							Mediana 14	18	

Test 1 na przeciwciała HCV wykonano przy użyciu testu Abbot Prism HCV.

Test 2 na przeciwciała HCV wykonano przy użyciu testu Ortho Enhanced SAVE, z następującymi wyjątkami:

Panele 6227 i 6229, które były badane przy użyciu testu Ortho ELISA Anti-HCV 3.0

^aKrwi z pierwszego pobrania nie badano z powodu niedostępności próbki od dawcy.

^bWszystkie próbki krwi w tym panelu były niereaktywne w kierunku przeciwciał HCV. Ostatni dzień pobrania krwi został użyty jako „Dni do pierwszego reaktywnego wyniku”.

^cKrwi z drugiego pobrania nie badano z powodu niedostępności próbki od dawcy.

Bibliografia

1. Averhoff FM, Glass N i Holtzman D. Global Burden of Hepatitis C: Considerations for Healthcare Providers in the United States. *Clinical Infectious Diseases* 2012; 55 (S1): S10-15.
2. Current and Future Disease Progression of the Chronic HCV Population in the United States (2013) PLOS ONE Tom 8: Wydanie 5; 1-10.
3. Engle RE, Bukh J, Alter HJ i inni, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24797372> Transfusion-associated hepatitis before the screening of blood for hepatitis risk factors. *Transfusion*. 5 maja 2014 r.
4. Lee M-H, Yang, H-I, Yuan Y i inni, Epidemiology and natural history of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterology* 2014; 20 (28): 9270-9280
5. Hepatitis C Viruses: Genome and Molecular Biology (2006); Horizon Biosciences
6. Smith DB, Bukh J, Kuiken C i inni, P. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology*. Styczeń 2014 r.; 59(1):318-27.
7. EASL Recommendations on treatment of Hepatitis C 2014: www.easl.eu/_clinical-practice-guideline
8. AASLD and the Infectious Diseases Society of America (IDSA), in collaboration with the International Antiviral Society-USA (IAS-USA) 2014: www.hcvguidelines.org
9. CDC. Testing for HCV infection: An update for clinicians and laboratories. *MMWR* 2013; 62 (18)
10. Rutter, K, Hofer H, Beinhardt, S i inni, Durability of SVR in chronic hepatitis C patients treated with peginterferon- α 2a/ribavirin in combination with a direct acting antiviral. *Aliment Pharmacol Ther*. Lipiec 2013;38(2):118-23.
11. Treatment of Hepatitis C, A Systemic Review (2014) *JAMA* Tom 312: Nr 6; 631-640.
12. EASL International Consensus Conference on Hepatitis C. Consensus Statement. *J Hepatol* 1999; 30; 956-61
13. NIH Consensus and State-of-the-Science Statements. Management of Hepatitis C: 2002; 19 (3):1-46
14. Peiffer K-H and Sarrazin C. The importance of HCV RNA measurement in tailoring treatment duration: *Digestive and Liver Disease* 45S (2013) S323-S331.
15. **Clinical and Laboratory Standards Institute**. 2005. Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods; Approved Guideline. CLSI dokument MM13-A. Wayne, PA.
16. **29 CFR część 1910.1030**. Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens; current version.
17. **Centers for Disease Control and Prevention / National Institutes of Health**. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL); wersja bieżąca.
18. **Clinical and Laboratory Standards Institute**. 2002. Clinical Laboratory Waste Management. CLSI dokument GP5-A2. Villanova, PA.
19. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)**. 2012. Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline – Second Edition. CLSI dokument EP17-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
20. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)**. 2003. Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline. CLSI document EP06-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.



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

Dział obsługi klienta: +1 800 442 9892
customersupport@hologic.com

Wsparcie techniczne: +1 888 484 4747
molecularsupport@hologic.com

Więcej informacji kontaktowych zamieszczono na stronie www.hologic.com.



Hologic BVBA
Da Vincilaan 5
1930 Zaventem
Belgium

Hologic, Aptima i Panther oraz powiązane logo są znakami towarowymi i/lub zastrzeżonymi znakami towarowymi firmy Hologic, Inc. i/lub spółek zależnych w Stanach Zjednoczonych i/lub innych państwach.

Armored RNA to znak towarowy należący do Asuragen, Inc.

Wszystkie inne znaki towarowe, które mogą się pojawić w tej ulotce załączonej do opakowania, należą do ich odpowiednich właścicieli.

Opisywany produkt może być objęty co najmniej jednym patentem USA, przedstawionym na stronie www.hologic.com/patents.

© 2015-2019 Hologic, Inc. Wszelkie prawa zastrzeżone.

AW-13249-3401 Wer. 005
2019-04