

Aptima™ HCV Quant Dx 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	4
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
Reagencie 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 (LoD) s použitím 2. mezinárodního standardu WHO	21
Mez detekce napříč jednotlivými genotypy HCV	22
Lineární rozsah	23
Linearita napříč HCV genotypy	24
Dolní mez kvantifikace s použitím 2. mezinárodní normy WHO	24
Stanovení dolní meze kvantifikace (LLoQ) napříč genotypy HCV	26
Přesnost	28
Potenciálně rušivé látky	29
Specifita	30
Analytická specifita	31
Klinické vzorky obsahující jiné viry než HCV	32
Opakovatelnost klinických vzorků	32
Ředění vzorku pomocí ředícího roztoku na vzorky	33
Metoda korelace	35
Diagnostická shoda	36
Křížová kontaminace	36
Sérokonverzní panel	37
Literatura	38

Všeobecné informace

Určené použití

Aptima HCV Quant Dx assay (Test Aptima HCV Quant Dx) je test v reálném čase na základě transkripční mediované amplifikace. Tento test se používá pro detekci i kvantifikaci RNA viru hepatitidy C (HCV) v čerstvém a zmrazeném lidském séru a plazmě od osob infikovaných HCV.

Plazma může být připravena v kyselině ethylendiamintetraoctové (EDTA), antikoagulačním roztoku citrát - dextróza (ACD) a zkumavkách na přípravu plazmy (PPT, plasma preparation tubes). Sérum může být připraveno v sérových zkumavkách a zkumavkách pro separaci séra (SST, serum separator tubes). Vzorky se testují pomocí systému Panther pro automatizované zpracování, amplifikaci, detekci a kvantifikaci vzorků. Vzorky obsahující HCV genotypy 1 až 6 jsou pro detekci a kvantifikaci v testu validovány.

Aptima HCV Quant Dx Assay je indikován pro použití jako pomůcka při diagnostice infekce HCV. Test lze použít k potvrzení aktivní infekce HCV u pacientů s pozitivním výsledkem testu na protilátky proti HCV. Detekce RNA HCV indikuje, že se virus replikuje, a je proto důkazem aktivní infekce.

Aptima HCV Quant Dx Assay je indikován pro použití jako pomůcka při léčbě pacientů infikovaných HCV podstupujících antivirovou léčbu HCV. Test měří hladiny RNA HCV na počátku, v průběhu léčby a po léčbě, pro stanovení setrvalé virologické odpovědi (SVR, sustained virological response). Výsledky testu Aptima HCV Quant Dx Assay musí být interpretovány v kontextu všech relevantních klinických a laboratorních nálezů.

Aptima HCV Quant Dx Assay není určen pro použití jako screeningový test na přítomnost HCV v krvi nebo krevních produktech.

Shrnutí a vysvětlení testu

HCV je patogen přenášený krví s celosvětovou zátěží pro veřejné zdravotnictví až 170 milionů globálně infikovaných osob a 350 000 úmrtí ročně v důsledku onemocnění souvisejících s HCV, včetně cirhózy a rakoviny jater.^{1,2} Přenos HCV probíhá stykem s krví, krevními produkty nebo v důsledku aktivit, u kterých může potenciálně dojít k perkutánní expozici.^{3,4} Z hlediska genetiky obsahuje HCV genom RNA s pozitivním vláknem tvořený přibližně 9500 nukleotidy kódujícími strukturální proteiny (jádro, glykoproteiny E1 a E2, protein p7 iontového kanálu) a nestrukturální proteiny (NS2, NS3, NS4A/B, NS5A/B), přičemž poslední z nich jsou klíčové virové replikativní proteiny a cíle přímo působících antivirových léků.^{4,5} Dvě netranslatované oblasti (UTR) genomu, 5'UTR a 3'UTR, hrají roli jak v translaci, tak i při replikaci/balení genomu.⁵ 5'-UTR je nejvíce konzervovaná oblast genomu napříč šesti hlavními HCV genotypy.⁶

Z klinického hlediska existuje vysoká prevalence asymptomatických infekcí HCV a navzdory detekovatelným protilátkám (obvykle během 5-12 týdnů) se u více než 75 % pacientů vyskytují chronické infekce HCV.² Algoritmy laboratorního testování na HCV vyžadují diagnózu aktivních infekcí HCV u osob pozitivně testovaných na protilátky prostřednictvím detekce RNA HCV v plazmě nebo séru, aby byla umožněna vhodná léčba.^{7,8,9}

Kvantifikace RNA HCV (virová zátěž) hrála stěžejní roli při definování a monitorování úspěšnosti léčby HCV. Setrvalá virologická odpověď (SVR) definovaná jako nenalezená RNA HCV po úspěšné terapii je hlavním ukazatelem vyléčené infekce HCV.^{10,11} Při léčbě založené na interferonu se jako pozitivní prediktory pro SVR ukázaly časná virologická odpověď (EVR, early virological response) definovaná jako pokles virové zátěže HCV 2 log nebo větší po 12 týdenní léčbě a rychlá virologická odpověď (RVR, rapid virological response) definovaná jako nedetekovatelná úroveň RNA HCV po 4 týdnech léčby.^{10,12,13} Tyto ukazatele virové kinetiky se využívají u

přístupů podle odpovědi upravující volbu zastavení nebo prodloužení léčby k dosažení SVR.¹⁴ Kromě toho prokázaly dlouhodobé následné studie trvanlivost SVR po úspěšné léčbě a eradikace viru zabraňuje progresi onemocnění jater.¹⁰

V éře přímo působících antivirotik (DAA), se měření virové zátěže HCV provádí před léčbou, pro stanovení výchozí virové zátěže, během léčby pro stanovení odpovědi na léčbu a po léčbě pro stanovení SVR (nebo relapsu). Téměř všichni pacienti dosáhnou při většině režimů v testu virologické odpovědi na léčbu DAA definované jako podlimitní hodnota kvantifikace (<LLOQ, below the lower limit of quantitation) následované hodnotami vyššími než 90 % SVR ve 12. týdnu po léčbě.^{8,11} Detekce a kvantifikace RNA HCV bude i nadále hrát zásadní roli při diagnóze HCV a péči o pacienty při léčbě antivirotiky.

Principy postupu

Aptima HCV Quant Dx Assay je test amplifikace nukleových kyselin, který využívá technologii transkripční mediované amplifikace (TMA) v reálném čase pro detekci a kvantifikaci RNA HCV před léčbou pro pomoc při diagnóze nebo ke stanovení výchozího virového zatížení a zároveň také měření odpovědi během léčby a po léčbě. Test cílí na konzervovanou oblast genomu HCV, kde detekuje a kvantifikuje genotypy 1, 2, 3, 4, 5 a 6. Test je standardizován dle 2. mezinárodního standardu WHO pro virus hepatitidy typu C (NIBSC kód 96/798).¹²

Aptima HCV Quant Dx 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 RNA. Na vzorek je použit detergent, aby došlo k solubilizaci virové schránky, denaturaci proteinů a uvolnění genomické RNA viru. Zachycené oligonukleotidy hybridizují do vysoce konzervovaných oblastí RNA HCV, 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 myši 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 HCV Quant Dx Assay využívá metodu TMA pro amplifikaci části 5'UTR genomu HCV. Amplifikace této oblasti je dosaženo použitím specifických primerů určených k amplifikaci HCV genotypů 1, 2, 3, 4, 5 a 6.

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 HCV. 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 HCV a IC pro každou reakci a jejich porovnáním s kalibračními údaji.

Varování a bezpečnostní opatření

- A. Před provedením tohoto testu si pečlivě přečtěte celou příbalovou informaci a *Návod k použití systému Panther*. Snížíte tak riziko výskytu neplatných výsledků.

Pro laboratoř



- B. 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 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 preventivními opatřeními.^{15,16,17}
- C. Tento test mohou používat pouze pracovníci s náležitým školením v použití testu Aptima HCV Quant Dx Assay a v manipulaci s potenciálně infekčními materiály. Dojde-li k rozlití, ihned proveďte dezinfekci dle příslušných postupů daného pracoviště.
- D. Používejte pouze dodané nebo specifikované jednorázové laboratorní vybavení.
- E. Dodržujte běžná laboratorní bezpečnostní opatření. Nepipetujte ústy. Ve vyhrazených pracovních prostorech nejezte, nepijte ani nekuřte. Při manipulaci se vzorky a reagensiemi soupravy používejte jednorázové rukavice bez talku, ochranné brýle a laboratorní pláště. Po manipulaci se vzorky a reagensiemi soupravy si pečlivě omyjte ruce.
- F. Pracovní povrchy, pipety a další vybavení pravidelně dekontaminujte 2,5 % až 3,5 % (0,35 M až 0,5 M) roztokem chlornanu sodného.
- G. Veškeré materiály, které přišly do styku se vzorky a reagensiemi, zlikvidujte v souladu s místními a národními předpisy.^{15,16,17,18} Důkladně vyčistěte a dezinfikujte všechny pracovní povrchy.
- H. 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.
- I. 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

- J. Vzorky mohou být infekční. Při provádění tohoto testu dodržujte univerzální bezpečnostní opatření^{15,16,17}. Zajistěte správné postupy při manipulaci a likvidaci v souladu s místními nařízeními.¹⁸ Tento test mohou používat pouze pracovníci s náležitým školením v použití testu Aptima HCV Quant Dx Assay a v manipulaci s infekčními materiály.
- K. Chcete-li zajistit integritu vzorku, zajistěte při přepravě vzorků vhodné přepravní podmínky. Stabilita vzorků za jiných než doporučených přepravních podmínek nebyla hodnocena.
- L. 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

- M. Nepoužívejte souprava reagensů, kalibrátor a kontroly po datu expirace.
- N. Nezaměňujte, nemíchejte ani nekombinujte reagensie testu ze souprav s různými čísly hlavní šarže. Kapaliny testu mohou mít různá čísla šarží. Kontroly a kalibrátor mohou mít různá čísla šarží.
- O. Zabraňte mikrobiální a nukleázové kontaminaci reagensů.
- P. Všechny reagensie 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 reagensiemi a Postup testu na systému Panther*.
- Q. Nekombinujte žádné reagensie ani kapaliny testu, pokud k tomu neobdržíte výslovný pokyn. Reagensie ani kapaliny nedolévejte. Systém Panther ověřuje hladiny reagensů.
- R. Některé reagensie 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 HCV 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

Požadavky na skladování a manipulaci s reagensiemi

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

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

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

- B. Zlikvidujte veškeré nepoužité rekonstituované reagensie a reagensie záchytu cíle (TCR, target capture reagent) 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 reagensií.
- 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.

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 kyselinu ethylendiamintetraoctovou (EDTA) nebo antikoagulační roztok kyselina citronová, citrát a dextróza (ACD) nebo
- 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 6 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

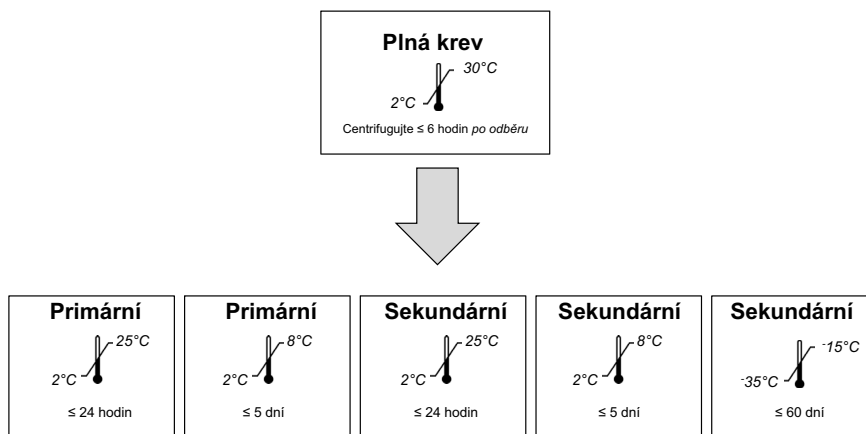
Pokud nejsou testovány okamžitě, lze plazmu a sérum uchovávat v souladu s níže uvedenými specifikacemi. Pokud jsou převedeny do sekundární zkumavky, mohou být plazma nebo sérum zmrazeny na teplotu -20 °C. Nepřekračujte 3 cykly zmrazení-rozpuštění. Nezmrazujte vzorky v EDTA, ACD nebo v sérum v primárních 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 6 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 25 °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.

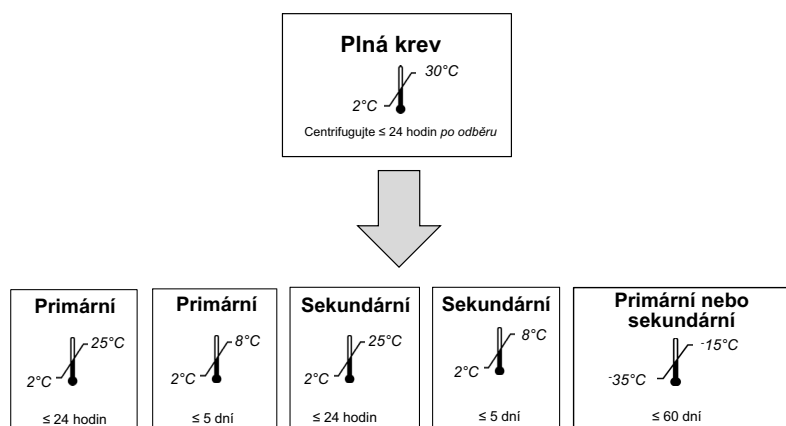


Obrázek 1. Podmínky uchování pro zkumavky s EDTA/ACD

2. Vzorky v PPT

Celá krev může být uchovávána při teplotě 2 °C až 30 °C a musí být odstředěna do 6 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 25 °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 primární odběrové zkumavce nebo sekundární zkumavce při teplotě -20 °C po dobu až 60 dnů.

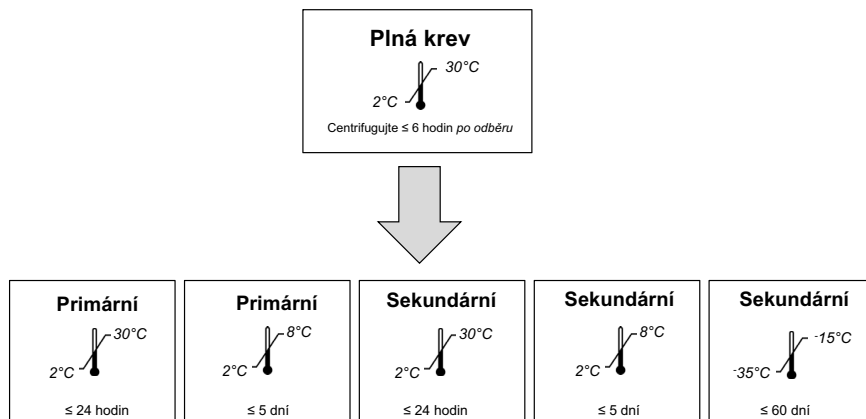


Obrázek 2. Podmínky uchování pro PPT

3. Sérové zkumavky se vzorkem

Celá krev může být uchovávána při teplotě 2 °C až 30 °C a musí být odstředěna do 6 hodin po odběru vzorků. Sérum může být poté uchováváno 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.

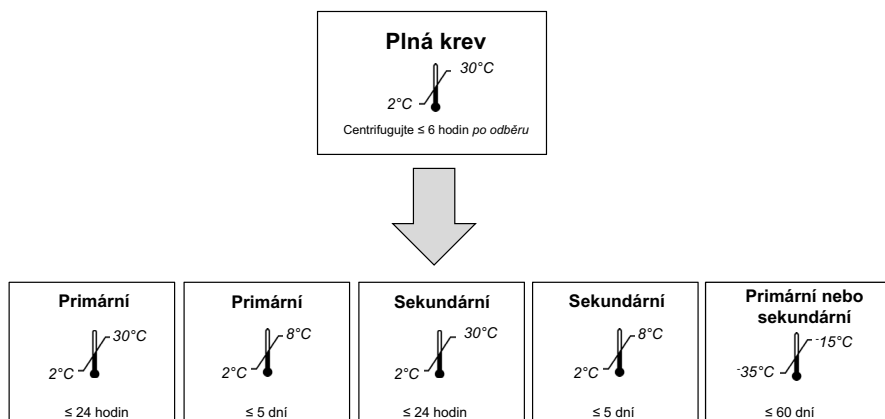


Obrázek 3. Podmínky uchovávání pro sérové zkumavky

4. Vzorky v SST

Celá krev může být uchovávána při teplotě 2 °C až 30 °C a musí být odstředěna do 6 hodin po odběru vzorků. Sérum může být poté uchováváno 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 primární odběrové zkumavce nebo sekundární zkumavce při teplotě -20 °C po dobu až 60 dnů.




Obrázek 4. Podmínky uchovávání v SST

C. Dlouhodobé skladování ve zmrazeném stavu

Vzorky plazmy nebo séra mohou být skladovány při teplotě -70 °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. Více informací viz *Postup testu na systému Panther*, krok E.6 níže.

 **Ředění vzorků plazmy a séra lze použít pouze pro stanovení kvantitativních výsledků. Neředte vzorky plazmy ani séra pro stanovení diagnostických výsledků.**

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 HCV Quant Dx 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 HCV Quant Dx Assay, 100 testů, kat. č. PRD-03506

(1 krabička testu, 1 kalibrační souprava a 1 souprava kontrol)

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

Krabička testu Aptima HCV Quant Dx Assay

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

Symbol	Složka	Množství
A	Amplifikační reagentie qHCV <i>Neinfekční nukleové kyseliny vysušené v pufrovaném roztoku.</i>	1 lahvička
E	Enzymová reagentie qHCV <i>Vysušená reverzní transkriptáza a RNA-polymeráza v pufrovaném roztoku HEPES.</i>	1 lahvička
PRO	Reagentie s promotorem qHCV <i>Neinfekční nukleové kyseliny vysušené v pufrovaném roztoku.</i>	1 lahvička
AR	Rekonstituční roztok pro amplifikaci qHCV <i>Vodný roztok obsahující glycerol a konzervační látky.</i>	1 x 7,2 ml
ER	Rekonstituční roztok pro enzymy qHCV <i>Roztok pufrovaný HEPES obsahující surfaktant a glycerol.</i>	1 x 5,8 ml
PROR	Rekonstituční roztok pro promotor qHCV <i>Vodný roztok obsahující glycerol a konzervační látky.</i>	1 x 4,5 ml
TCR	Reagentie záchytu cíle qHCV <i>Nukleové kyseliny v pufrovaném solném roztoku obsahujícím pevnou fází, 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 HCV Quant Dx (kat. č. PRD-03507)

(po přijetí uchovávejte při teplotě -15 °C až -35 °C)

Symbol	Složka	Množství
PCAL	pozitivní kalibrátor qHCV <i>Transkript v pufrovaném roztoku.</i>	5 x 2,5 ml
	Štítek čárového kódu kalibrátoru	–

Souprava kontrol Aptima HCV Quant Dx (kat. č. PRD-03508)
(po přijetí uchovávejte při teplotě -15 °C až -35 °C)

Symbol	Složka	Množství
NC	negativní kontrola qHCV <i>HCV negativní defibrinovaná lidská plazma obsahující gentamicin a 0,2 % azid sodný jako konzervanty.</i>	5 x 0,8 ml
LPC	nízká pozitivní kontrola qHCV <i>Neinfekční HCV Armored RNA v defibrinované lidské plazmě obsahující gentamicin a 0,2 % azid sodný jako konzervanty.</i>	5 x 0,8 ml
HPC	vysoká pozitivní kontrola qHCV <i>Neinfekční HCV Armored RNA v defibrinované lidské plazmě obsahující gentamicin a 0,2 % azid sodný jako konzervanty.</i>	5 x 0,8 ml
	Štítek s čárovým kódem kontroly	–

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) obsahuje promývací roztok Aptima, pufr Aptima pro deaktivaci kapaliny a olejovou reagensii Aptima</i>	303014 (1000 testů)
<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) obsahuje MTU, odpadní vaky, kryty odpadních košů, automatickou detekci a testovací kapaliny</i>	303096 (5000 testů)
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 nepropichovací uzávěry	103036A
Náhradní uzávěry pro reagensie	
<i>Rekonstituční lahvičky pro amplifikační, enzymovou a promotorovou reagensii</i>	CL0041 (100 uzávěrů)
<i>Lahvička TCR</i>	CL0040 (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 transportní 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:	–
HCV z Quality Control for Molecular Diagnostics (QCMD, kontrola kvality pro molekulární diagnostiku) nebo	
Panely SeraCare ACCURUN HCV	
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 teploty 15 °C až 30 °C tímto způsobem:

- Vyjměte kalibrátor a kontroly z prostoru pro uchovávání (-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.

2. Po rozmrazení obsahu zkumavky vysušte vnější stranu zkumavky čistým suchým jednorázovým ubrouskem.
3. 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.

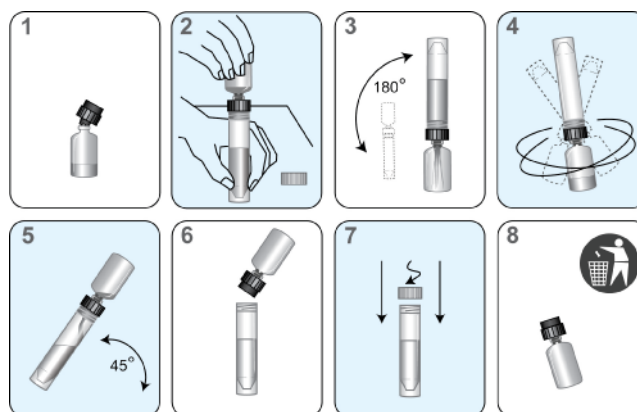
1. Chcete-li připravit reagensii pro záchyt cíle (TCR), proveďte následující kroky:
 - a. Vyjměte TCR z prostoru pro uchovávání (2 °C až 8 °C). Zkontrolujte číslo šarže na lahvičce TCR a ujistěte se, že odpovídá číslu šarže na listu čárového kódu hlavní šarže.
 - b. Lahvičku TCR okamžitě 10 krát silně 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 zapište iniciály obsluhy a datum rekonstituce (Obrázek 5, krok 7).
- f. Odstraňte rekonstituční objímku a skleněnou lahvičku (Obrázek 5, krok 8).

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



Obrázek 5. Proces rekonstituce reagentů

D. Příprava u již dříve připravovaných reagentů

1. Vyjměte dříve připravené reagenty z prostoru pro uchovávání (2 °C až 8 °C).
2. Před zahájením testu musí dříve připravené amplifikační, enzymové, promotorové reagenty a TCR dosáhnout teplotu 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 reagenty a převratte je, aby se řádně promíchaly. Při převracení reagentů zabraňte nadměrné tvorbě pěny.
5. Lahvičky s reagenty nedoplňujte. Systém Panther rozpozná lahvičky, které byly doplněny, a zamítne je.

E. Manipulace se vzorkem

1. Zajistěte, aby zpracované vzorky v primárních zkumavkách nebo nezředitelné 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 odstředujte 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 odstředujte 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. Zředte vzorek plazmy nebo séra v poměru 1:3 v SAT nebo 1:100 v sekundární zkumavce.

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

- ⚠ Ředění vzorků lze použít pouze pro stanovení kvantitativních výsledků. Neředte vzorky pro stanovení diagnostických výsledků.

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, 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 vložením stojanu na vzorek do prostoru na vzorky předržovač vzorků.
- g. Opakujte kroky 2.a až 2.f pro další stojan na vzorky.

Poznámky k postupu

A. Kalibrátor a kontroly

1. Pozitivní kalibrátor qHCV, nízká pozitivní kontrola qHCV, vysoká pozitivní kontrola qHCV a negativní kontrolní zkumavka qHCV mohou být vloženy na libovolnou polohu ve stojanu na vzorky a do kteréhokoli 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 HCV Quant Dx Assay, mohou být v průběhu 24 hodin otestovány vzorky pomocí přiřazené rekonstituční soupravy, **pokud nebudou porušeny následující podmínky:**
 - a. Výsledek kalibrátoru nebo výsledky kontrol 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 „Nedetekován“ a pozitivní kontroly musí vygenerovat výsledky v rámci předdefinovaných parametrů. 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 RNA HCV pro vzorky a kontroly porovnáním výsledků s kalibrační křivkou. Koncentrace RNA HCV jsou uvedeny v IU/ml a \log_{10} IU/ml. Interpretaci výsledků uvádí Tabulka 1. Pokud se pro zředěné vzorky použije ředění 1:3 nebo 1:100, systém Panther automaticky vypočítá koncentraci HCV pro čistý vzorek vynásobením zředěné koncentrace faktorem zředění a zředěné vzorky jsou označeny jako zředěné.

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

Systém Panther neposkytuje kvalitativní výsledek (tj. „Reaktivní“ nebo „Nereaktivní“) pro diagnostické použití. Obsluha musí interpretovat ohlášenou koncentraci RNA HCV do kvalitativního výsledku (Tabulka 1). Vzorky s výsledky uvedenými jako „Nedetekováno“ jsou na RNA HCV nereaktivní. Vzorky s výsledky uvedenými jako „Detekováno <10“ s výsledky uvedenými v lineárním rozsahu a >100 000 000 (horní mez kvantifikace) ukazují, že RNA HCV byla detekována a tyto vzorky jsou reaktivní na RNA HCV.

Tabulka 1: Interpretace výsledků.

Ohlášený výsledek testu Aptima HCV Quant Dx Assay		Interpretace koncentrace RNA HCV	Diagnostická kvalitativní interpretace uživatele ^a
IU/ml	Log ₁₀ hodnoty ^b		
Nedetekováno	Nedetekováno	RNA HCV nebyla detekována.	Nereaktivní na RNA HCV
Detekováno <10	<1,00	HCV RNA je detekována, ale na úrovni pod LLoQ	Reaktivní na RNA HCV
10 až 100 000 000	1,00 až 8,00	Koncentrace RNA HCV je v lineárním rozmezí 10 až 100 000 000 IU/ml	Reaktivní na RNA HCV
>100 000 000	>8,00	Koncentrace RNA HCV je nad ULoQ	Reaktivní na RNA HCV
Neplatné ^c	Neplatné ^c	Při generování výsledku došlo k chybě. Vzorky je nutné testovat znovu	Neplatné

^a Diagnostická interpretace může být provedena ze vzorků séra nebo plazmy, které nebyly zředěny.

^b Hodnota je zkrácena na dvě desetinná místa.

^c Neplatné výsledky jsou zobrazeny modrou barvou.

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.

Provedení**Mez detekce (LoD) s použitím 2. mezinárodního standardu WHO**

Mez detekce (LoD, limit of detection) testu je definována jako koncentrace RNA HCV, která je detekována s 95 % nebo vyšší pravděpodobností podle CLSI EP17-A2.¹⁹

LoD byla stanovena testovacími panely 2. mezinárodního standardu WHO pro RNA viru hepatitidy C (NIBSC 96/798, genotyp 1) zředěnou v HCV 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 HCV Quant Dx Assay s použitím 2. mezinárodního standardu WHO je 4,3 IU/ml pro plazmu a 3,9 IU/ml pro sérum.

Tabulka 2: Mez detekce s použitím 2. mezinárodního standardu WHO

Předpokládaná mez detekce	Koncentrace (IU/ml)	
	Plazma	Sérum
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

Mez detekce napříč jednotlivými genotypy HCV

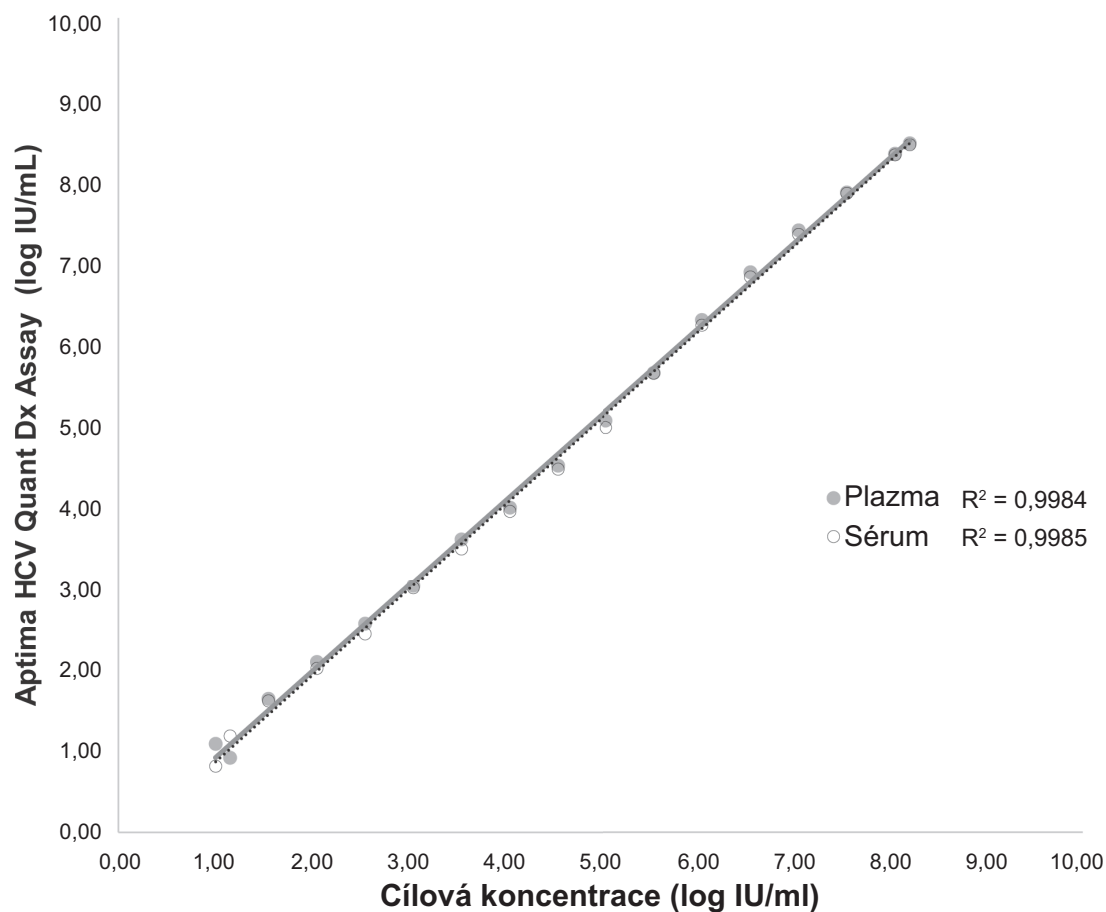
Hodnota LoD byla stanovena testováním HCV pozitivních klinických vzorků genotypů 1, 2, 3, 4, 5 a 6 zředěných v HCV negativní lidské plazmě a séru. Koncentrace byly stanoveny použitím srovnávacího testu s označením CE. Minimálně 20 replikátů každého článku panelu bylo testováno s každou ze tří šarží reagensů, tedy minimálně 60 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 jednotlivými HCV genotypy s použitím klinických vzorků

Genotyp	Předpokládaná mez detekce	Koncentrace (IU/ml)	
		Plazma	Sérum
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

Lineární rozsah

Lineární rozsah byl stanoven testováním panelů s HCV Armored RNA zředěných v HCV negativní lidské plazmě a séru podle CLSI EP06-A.²⁰ Koncentrace panelů se pohybovala v rozmezí od 1,0 log IU/ml do 8,2 log IU/ml. Aptima HCV Quant Dx Assay prokázal linearitu v celém testovaném rozsahu, s horní mezí kvantifikace (ULoQ) 8,0 log IU/ml, jak znázorňuje Obrázek 6.



Obrázek 6. Linearita v plazmě a séru

Linearita napříč HCV genotypy

Lineární odpověď na genotypy 1, 2, 3, 4, 5 a 6 byla potvrzena testováním panelů transkriptu HCV zředěného v pufru při koncentracích v rozmezí od 1,36 log IU/ml do 7,36 log IU/ml. Testování bylo provedeno na třech systémech Panther s použitím tří šarží reagensů. Jak znázorňuje Obrázek 7, byla prokázána linearita v celém testovaném rozsahu na všech testovaných genotypy.



Obrázek 7. Linearita Azkřížené HCV genotypy 1 až 6

Dolní mez kvantifikace s použitím 2. mezinárodní normy WHO

Dolní mez kvantifikace (LLoQ) je definována jako nejnižší koncentrace, při které je RNA HCV spolehlivě kvantifikována v rámci celkové chyby, podle CLSI EP17-A2.¹⁹ Celková chyba byla stanovena 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 HCV Quant Dx Assay nastavena na 1 log IU/ml (tj. v LLoQ je rozdíl mezi dvěma měřeními více než 1 log IU/ml je statisticky významný).

LLoQ byla stanovena testovacími panely dle 2. mezinárodního standardu WHO pro RNA viru hepatitidy C (NIBSC 96/798, genotyp 1) zředěnou v HCV 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. Výsledky ze šarže reagensů s nejvyšší koncentrací rovnou nebo větší než LoD a splňující požadavky na TE a TAE uvádí Tabulka 4 pro plazmu a Tabulka 5 pro sérum. LLoQ pro 2. mezinárodní standard WHO je 7 IU/ml (0,82 log IU/ml) pro plazmu a 9 IU/ml (0,93 log IU/ml) pro sérum, jak shrnuje Tabulka 6. LLoQ byla stanovena napříč genotypy (viz další část „Stanovení dolní meze kvantifikace (LLoQ) napříč HCV genotypy“). Tato data genotypu stanovují celkové LLoQ pro test jako 10 IU/ml.

Tabulka 4: LLoQ s použitím 2. mezinárodního standardu WHO pro HCV zředěné v plazmě

Šarže reagensie	Cílová koncentrace	Cílová koncentrace	Aptima HCV Quant Dx	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	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 = směrodatná odchylka

Tabulka 5: LLoQ s použitím 2. mezinárodního standardu WHO pro HCV zředěný v séru

Šarže reagensie	Cílová koncentrace	Cílová koncentrace	Aptima HCV Quant Dx	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	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 = směrodatná odchylka

Tabulka 6: Souhrn LLoQ s použitím 2. mezinárodního standardu WHO pro HCV

Šarže reagensie	LLoQ v plazmě		LLoQ v séru	
	(log IU/ml)	(IU/ml)	(log IU/ml)	(IU/ml)
1	0,73	5	0,93	9
2	0,82	7	0,89	8
3	0,76	6	0,71	5

Stanovení dolní meze kvantifikace (LLoQ) napříč genotypy HCV

LLoQ byla stanovena testováním zředěných HCV pozitivních klinických vzorků pro genotypy 1, 2, 3, 4, 5 a 6 v HCV negativní lidské plazmě a séru. Určení koncentrace pro klinické vzorky bylo stanoveno pomocí srovnávacího testu s označením CE. Minimálně 36 replikátů každého článku panelu bylo testováno s každou ze tří šarží reagensů, tedy minimálně 108 replikátů na jeden článek panelu. Výsledky ze šarže reagensů s nejvyšší koncentrací rovnou nebo větší než LoD a splňující požadavky na TE a TAE uvádí Tabulka 7 pro plazmu a Tabulka 8 pro sérum. LLoQ pro genotypy 1 až 6 v plazmě a séru shrnuje Tabulka 9. Tím byla stanovena celková LLoQ pro test na hodnotu 10 IU/ml.

Tabulka 7: Stanovení LLoQ napříč genotypy v plazmě

Genotyp	Cílová koncentrace	Cílová koncentrace	Aptima HCV Quant Dx	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	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 = směrodatná odchylka

Tabulka 8: Stanovení LLoQ napříč genotypy v séru

Genotyp	Cílová koncentrace	Cílová koncentrace	Aptima HCV Quant Dx	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	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 = směrodatná odchylka

Tabulka 9: Souhrn LLoQ napříč genotypy v plazmě a séru

HCV genotyp	LLoQ v plazmě		LLoQ v séru	
	(log IU/ml)	(IU/ml)	(log IU/ml)	(IU/ml)
1	0,88	8	0,88	8
2	0,76	6	0,80	6
3	0,80	6	0,67	5
4	0,82	7	0,65	4
5	0,87	7	0,72	5
6	0,79	6	0,99	10

Přesnost

Pro posouzení přesnosti byl vyroben 10 článkový panel zředěním HCV pozitivních klinických vzorků nebo obohacením Armored RNA do HCV negativní plazmy a séra. Panel byl testován třemi technikami za použití tří šarží reagensů na třech systémech Panther po dobu více než 21 dnů.

Tabulka 10 ukazuje přesnost výsledků testu (v log IU/ml) mezi přístroji, provozovatelem, šaržemi, cykly, v rámci cyklů a celkově. Celková variabilita všech článků panelu byla 13,31 %, primárně kvůli variabilitě uvnitř cyklu (tj. náhodné chyby).

Tabulka 10: Přesnost testu Aptima HCV Quant Dx Assay

Matrice	N	Střední koncentrace (log IU/ml)	Mezi přístroji		Mezi technikami		Mezi šaržemi		Mezi cykly		V rámci cyklu		Celkem	
			SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)
Plazma	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
Plazma	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
Plazma	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
Plazma	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
Plazma	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
Sérum	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
Sérum	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
Sérum	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
Sérum	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
Sérum	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 = koeficient variability, SD = směrodatná odchylka

^a Počet platných výsledků v lineárním rozsahu testu.

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 HCV Quant Dx Assay na interferenci se zvýšenými hladinami endogenních látek nebo léky běžně předepisovanými jedincům infikovaným HCV. Byly testovány HCV negativní vzorky plazmy a vzorky obohacené HCV na koncentraci 3,3 log IU/ml RNA HCV.

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).

Pomocí testu Aptima HCV Quant Dx Assay byly testovány klinické vzorky plazmy od pacientů se zvýšenými hladinami definovaných látek nebo od pacientů s chorobami, které uvádí Tabulka 11. Během provádění testu nebyla pozorována žádná interference.

Tabulka 11: Testované typy klinických vzorků

Typy klinických vzorků	
1	Revmatoidní faktor (RF)
2	Antinukleární protilátka (ANA)
3	Anti-Jo-1 protilátka (JO-1)
4	Systémový lupus erythematoses (SLE)
5	Revmatoidní artritida (RA)
6	Roztroušená skleróza (MS)
7	Hyperglobulinémie
8	Zvýšená alaninaminotransferáza (ALT)
9	Zvýšená aspartátaminotransferáza (AST)
10	Alkoholická cirhóza (AC)
11	Mnohočetný myelom (MM)
12	Lipemický (zvýšená hladina lipidů)
13	Ikterický (zvýšená hladina bilirubinu)
14	Hemolyzovaný (zvýšená hladina hemoglobinu)
15	Zvýšený proteinový albumin
16	HBV protilátky
17	HIV-1 protilátky
18	HIV-2 protilátky

V přítomnosti exogenních látek, které uvádí Tabulka 12, nebyla při koncentracích alespoň trojnásobku C_{max} (lidská plazma) během provádění testu pozorována žádná interference.

Tabulka 12: Exogenní látky

Fond exogenních látek	Testované exogenní látky
1	Telaprevir, klaritromycin, interferon alfa-2a, dolutegravir, azithromycin
2	Simeprevir, sofosbuvir
3	Efavirenz, boceprevir, pegylovaný interferon alfa-2b, emtricitabin, raltegravir, amoxicilin
4	Abacavir sulfát, ribavirin, dasabuvir, rilpivirin, rifampin / rifampicin
5	Lopinavir, tenofovir, lamivudin, valganciklovir
6	Heparin, EDTA, citrát sodný

Specificita

Specificita byla stanovena pomocí 198 čerstvých a 538 zmrazených HCV negativních klinických vzorků. Celkem bylo testováno 370 vzorků plazmy a 366 vzorků séra. Specificita byla vypočtena jako procento HCV negativních vzorků s výsledky „Nedetkováno.“ RNA HCV nebyla detekována ve všech 736 vzorcích. Specificita byla 100 % (736/736, 95 % CI: 99,6-100 %).

Tabulka 13: Specificita v klinických vzorcích plazmy a séra

	Čerstvá plazma	Zmrazená plazma	Plazma celkem	Čerstvé sérum	Zmrazené sérum	Sérum celkem	Kombinované
Platné replikáty (n)	100	270	370	98	268	366	736
Nedetkováno	100	270	370	98	268	366	736
Specificita (95 % CI)	100 % (97,1–100)	100 % (98,9–100)	100 % (99,2–100)	100 % (97,0–100)	100 % (98,9–100)	100 % (99,2–100)	100 % (99,6–100)

CI = interval spolehlivosti

Analytická specifita

Potenciální zkřížená reaktivita na patogeny, které uvádí Tabulka 14, byla vyhodnocena v HCV negativní lidské plazmě v přítomnosti nebo nepřítomnosti 3,3 log IU/ml HCV. Nebyla pozorována žádná zkřížená reaktivita. V přítomnosti patogenů nebyla pozorována žádná interference.

Tabulka 14: Patogeny testované na analytickou specifitu

Patogen	Koncentrace		Patogen	Koncentrace	
Virus hepatitidy A	100 000	kopii/ml	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	1 000 000	CFU/ml ^f
Virus hepatitidy B (HBV)	100 000	IU/ml ^a	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1 000 000	CFU/ml
Virus hepatitidy 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
Virus herpes simplex 1 (HSV-1)	100 000	PFU/ml	<i>Candida albicans</i>	1 000 000	CFU/ml
Virus herpes simplex 2 (HSV-2)	100 000	PFU/ml	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1 000 000	CFU/ml
Lidský herpes virus 6B	100 000	kopii/ml	<i>Chlamydia trachomatis</i>	1 000 000	IFU/ml ^g
Lidský herpes virus 8	2 667	TCID50 U/ml ^c	<i>Trichomonas vaginalis</i>	1 000 000	buněk/ml
Lidský T-buněčný lymfotropický virus typu 1 (HTLV-1)	100 000	vp/ml ^d			
Lidský T-buněčný lymfotropický virus typu 2 (HTLV-2)	100 000	vp/ml			
Parvovirus B19	100 000	IU/ml			
Virus západonilské horečky	100 000	PFU/ml			
Virus horečky dengue 1	100 000	PFU/ml			
Virus horečky dengue 2	100 000	PFU/ml			
Virus horečky dengue 3	100 000	PFU/ml			
Virus horečky dengue 4	100 000	PFU/ml			
Cytomegalovirus	100 000	PFU/ml			
Epstein-Barr virus	100 000	kopii/ml			
Virus zarděnek	100 000	PFU/ml			
Lidský papillomavirus	100 000	buněk/ml			
Adenovirus typu 5	100 000	TCID50 U/ml			
Virus chřipky A	100 000	TCID50 U/ml			
Virus japonské encefalitidy	NA	NA			
Virus encefalitidy St. Louis	NA	NA			
Virus encefalitidy Murray Valley	2 643	LD/ml ^e			
Virus žluté zimnice	100 000	buněk/ml			

^a IU/ml = mezinárodní jednotky na ml

^b PFU/ml = plakotvorné jednotky na ml

^c TCID50 U/ml = infekční dávkové jednotky tkáňové kultury na ml

^d vp/ml = virové částice na ml

^e LD/ml = smrtelná dávka na ml

^f CFU/ml = kolonie tvořící jednotky na ml

^g IFU/ml = jednotky tvořící inkluzi na ml

Klinické vzorky obsahující jiné viry než HCV

Patogeny, které uvádí Tabulka 15 byly stanoveny při získání jednotlivých přirozeně infikovaných klinických vzorků. Byly testovány v přítomnosti nebo nepřítomnosti 3,3 log IU/ml RNA HCV. Nebyla pozorována žádná zkřížená reaktivita. Nebyla pozorována žádná interference.

Tabulka 15: Klinické vzorky testované na analytickou specifitu

Mikroorganismus	Matrice	N (dárce)
HBV	sérum	5
HBV	plazma	5
Virus horečky dengue	plazma	10
Virus hepatitidy A	plazma	10
HTLV-1	plazma	10
HTLV-2	plazma	10
HIV-1	plazma	10
Virus západonilské horečky	plazma	10

Opakovatelnost klinických vzorků

Opakovatelnost byla vyhodnocena testováním tří replikátů přirozeně infikovaných HCV 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

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

Tabulka 17: Opakovatelnost klinických vzorků séra

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

^a Výsledek dvou ze tří testovaných replikátů. Jeden odlehlý replikát byl odstraněn.

Ředění vzorku pomocí ředícího roztoku na vzorky

Pro vyhodnocení regenerace RNA HCV 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 Armored RNA 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 - plazma

Ředění	Průměrná čistá koncentrace (log IU/ml)	Průměrná hlášená koncentrace ^a (log IU/ml)	Rozdíl
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

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

^b Obohacený vzorek.

Poznámka: Všechny výsledky > 8,00 log IU/ml byly stanoveny pomocí další analýzy.

Tabulka 19: Zředění vzorku pomocí ředícího roztoku na vzorky Aptima - sérum

Faktor ředění	Průměrná čistá koncentrace (log IU/ml)	Průměrná hlášená koncentrace ^a (log IU/ml)	Rozdíl
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

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

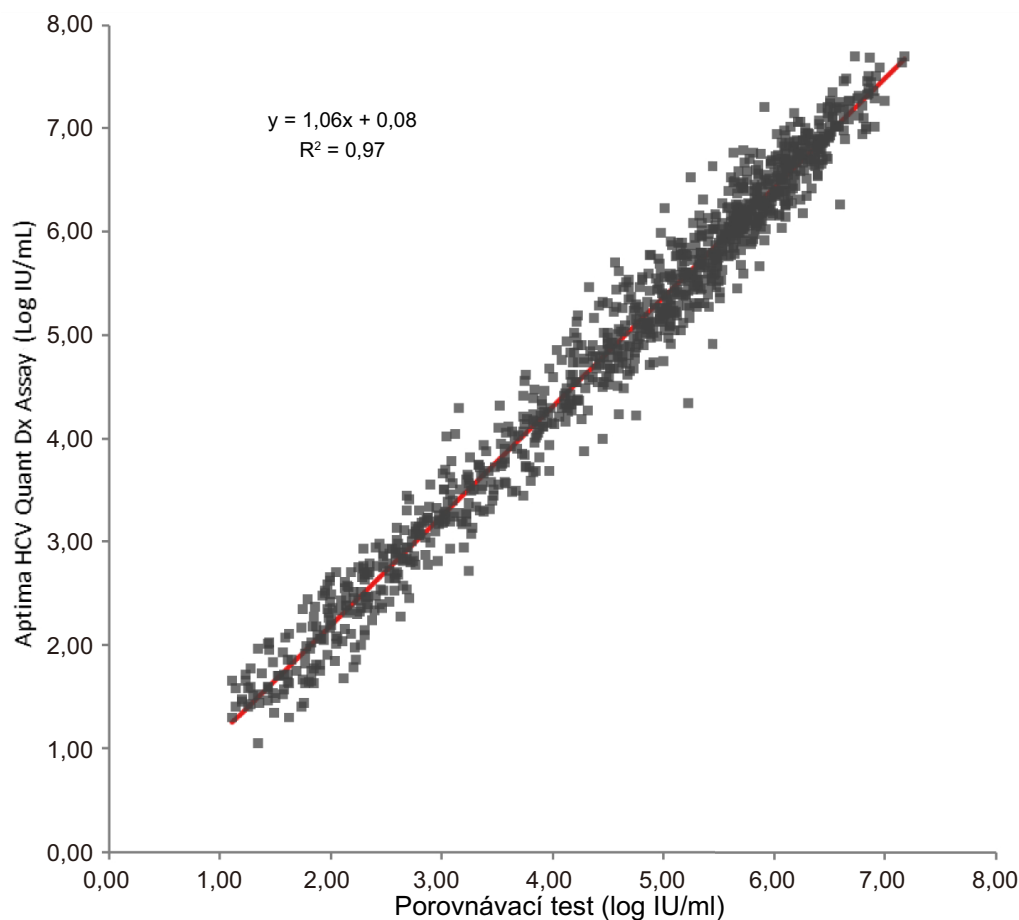
^b Obohacený vzorek.

^c Výsledek dvou ze tří testovaných replikátů. Jeden odlehlý replikát byl odstraněn.

Poznámka: Všechny výsledky >8,00 log IU/ml byly stanoveny pomocí další analýzy.

Metoda korelace

Výkon testu Aptima HCV Quant Dx Assay byl hodnocen proti srovnávacímu testu s označením CE testováním neřaděných klinických vzorků od pacientů infikovaných HCV na třech systémech Panther pomocí čtyř šarží reagensů. Pro lineární regresi bylo použito celkem 1058 vzorků plazmy a séra (872 plazmy, 186 séra) napříč všemi HCV genotypy v lineárním rozsahu společném pro oba testy, jak uvádí Obrázek 8.



Obrázek 8. Korelace mezi testem Aptima HCV Quant Dx Assay a srovnávacím testem

Diagnostická shoda

Pro posouzení diagnostické shody bylo testováno 227 vzorků plazmy a séra od HCV pozitivních jedinců pomocí testu Aptima HCV Quant Dx Assay a srovnávacího kvalitativního testu s označením CE. Jakýkoli výsledek poskytující kvantifikovatelný nebo detekovatelný výsledek byl klasifikován jako „Detekováno“. Jakýkoli výsledek nedetekovaného cíle byl kategorizován jako „Cíl nedetekován.“ Diagnostická shoda mezi testy byla 100 %, jak uvádí Tabulka 20.

Tabulka 20: Diagnostická shoda mezi testem Aptima HCV Quant Dx Assay a srovnávacím testem

		Aptima HCV Quant Dx Assay	
		Detekováno	Cíl nebyl detekován
Porovnávací test	Detekováno	99	0
	Cíl nebyl detekován	0	128

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 Armored RNA s vysokým titrem HCV (7 log IU/ml) rozptýlených mezi HCV negativními vzorky v šachovnicovém vzoru. Testování proběhlo v patnácti cyklech. Celková míra křížové kontaminace byla 0,14 % (1/704).

Sérokonverzní panel

Bylo testováno jedenáct sad sérokonverzních panelů HCV, celkem 72 vzorků. Výsledky testu Aptima HCV Quant Dx Assay byly porovnány s výsledky testu protilátek proti HCV. Počet dní do prvního reaktivního výsledku uvádí Tabulka 21. Aptima HCV Quant Dx Assay detekoval přítomnost HCV v průměru o 20 dní dříve než testy na protilátky.

Tabulka 21: Souhrn údajů sérokonverzního panelu

ID panelu	Počet testovaných článků panelu	Počet reaktivních článků panelu			Dnů do prvního reaktivního výsledku			Rozdíl v počtu dnů do prvního reaktivního výsledku (na základě data krvácení)	
		Aptima HCV Quant Dx	Test1 na protilátky proti HCV	Test2 na protilátky proti HCV	Aptima HCV Quant Dx	Test1 na protilátky proti HCV	Test2 na protilátky proti HCV	Dnů před testem1 na protilátky proti HCV	Dnů před testem2 na protilátky proti HCV
PHV911	4	4	3	3	3 ^a	14	14	11	11
PHV913	4	4	0	2	0	9 ^b	7	9	7
PH919	7	4	3	3	25	28	28	3	3
PH920	9	9	7	6	0 ^c	13	16	13	16
PH921	11	11	9	7	0	7	18	7	18
PH923	6	6	2	2	0	21	21	21	21
PH924	6	6	3	3	0	59	59	59	59
PH925	5	5	1	1	0	27	27	27	27
PH926	5	5	1	0	0	14	14 ^b	14	14
6227	7	4	2	2	42	74	74	32	32
6229	8	8	4	3	0	17	20	17	20
Celkem	72	66	35	32				Průměr 19,36	20,73
								Medián 14	18

Test1 na protilátky proti HCV byl proveden testem Abbot Prism HCV

Test2 na protilátky proti HCV byl proveden testem Ortho Enhanced SAVE s následujícími výjimkami:

Panely 6227 a 6229, které byly oba testovány testem Ortho ELISA Anti-HCV 3.0

^a První krvácení nebylo testováno kvůli nedostupnosti vzorku od dodavatele.

^b Všechna krvácení v tomto panelu byla nereaktivní na HCV protilátku. Poslední den krvácení byl použit jako hodnota „Počet dnů do prvního reaktivního výsledku“.

^c Druhé krvácení nebylo testováno kvůli nedostupnosti vzorku od dodavatele.

Literatura

1. Averhoff FM, Glass N and Holtzman D. Global Burden of Hepatitis C: Considerations for Healthcare Providers in the United States. *Clinical Infectious Diseases* 2012; 55 (S1): S10-15.
2. Current and Future Disease Progression of the Chronic HCV Population in the United States (2013) *PLOS ONE* Volume 8: Issue 5; 1-10.
3. Engle RE, Bukh J, Alter HJ et al., <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24797372> Transfusion-associated hepatitis before the screening of blood for hepatitis risk factors. *Transfusion*. 2014 May 5
4. Lee M-H, Yang, H-I, Yuan Y et al., Epidemiology and natural history of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterology* 2014; 20 (28): 9270-9280
5. *Hepatitis C Viruses: Genome and Molecular Biology* (2006); Horizon Biosciences
6. Smith DB, Bukh J, Kuiken C, et al, P. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology*. 2014 Jan;59(1):318-27.
7. EASL Recommendations on treatment of Hepatitis C 2014: www.easl.eu/_clinical-practice-guideline
8. AASLD and the Infectious Diseases Society of America (IDSA), in collaboration with the International Antiviral Society-USA (IAS-USA) 2014: www.hcvguidelines.org
9. CDC. Testing for HCV infection: An update for clinicians and laboratories. *MMWR* 2013; 62 (18)
10. Rutter, K, Hofer H, Beinhardt, S et al., Durability of SVR in chronic hepatitis C patients treated with peginterferon-2a/ribavirin in combination with a direct acting antiviral. *Aliment Pharmacol Ther*. 2013 Jul;38(2):118-23.
11. Treatment of Hepatitis C, A Systemic Review (2014) *JAMA* Volume 312: No.6; 631-640.
12. EASL International Consensus Conference on Hepatitis C. Consensus Statement. *J Hepatol* 1999; 30; 956-61
13. NIH Consensus and State-of-the-Science Statements. Management of Hepatitis C: 2002; 19 (3):1-46
14. Peiffer K-H and Sarrazin C. The importance of HCV RNA measurement in tailoring treatment duration: *Digestive and Liver Disease* 45S (2013) S323-S331.
15. **Clinical and Laboratory Standards Institute**. 2005. Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods; Approved Guideline. CLSI Document MM13-A. Wayne, PA.
16. **29 CFR Part 1910.1030**. Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens; current version.
17. **Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health**. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL); current version.
18. **Clinical and Laboratory Standards Institute**. 2002. Clinical Laboratory Waste Management. CLSI Document GP5-A2. Villanova, PA.
19. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)**. 2012. Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline—Second Edition. CLSI Document EP17-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
20. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)**. 2003. Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline. CLSI document EP06-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.



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

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 BVBA
Da Vincilaan 5
1930 Zaventem
Belgium

Hologic, Aptima, Panther a související loga jsou ochranné známky nebo registrované ochranné známky společnosti Hologic, Inc. nebo jejích dceřiných společností v USA nebo v jiných zemích.

Armored RNA je ochranná známka společnosti Asuragen, Inc.

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.

© 2015-2019 Hologic, Inc. Všechna práva vyhrazena.

AW-13249-2601 Rev. 005
Duben 2019