

Aptima™ HBV Quant Assay

In-vitro-Diagnostikum

Nur zum US-Export

Allgemeine Informationen	2
Bestimmungsgemäßer Gebrauch	2
Zusammenfassung und Testerklärung	2
Testprinzip	3
Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen	4
Lagerungs- und Handhabungsbedingungen für Reagenzien	6
Probenentnahme und -lagerung	7
Im Panther System gelagerte Proben	10
Transport von Patientenproben	10
Panther System	11
Im Lieferumfang enthaltene Reagenzien und Materialien	11
Erforderliche, jedoch nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien	13
Optionale Materialien	14
Testverfahren mit dem Panther System	14
Verfahrenshinweise	18
Qualitätskontrolle	20
Assay-Kalibrierung	20
Negativ- und Positivkontrollen	20
Interner Kalibrator/Interne Kontrolle	20
Interpretation der Ergebnisse	21
Einschränkungen	21
Leistungsdaten	22
Quantifizierungsgrenze mit dem 3. Internationalen WHO-Standard	22
Nachweisgrenze bei HBV-Genotypen	23
Linearer Bereich	24
Linearität bei HBV-Genotypen	25
Untere Quantifizierungsgrenze mit dem 3. Internationalen WHO-Standard	25
Bestimmung der unteren Qualifizierungsgrenze bei HBV-Genotypen	27
Reproduzierbarkeit	29
Stoffe mit möglicher beeinträchtigender Wirkung	31
Spezifität	32
Analytische Spezifität	33
Wiederholbarkeit bei klinischen Patientenproben	34
Probenverdünnung mit Probenverdünner	35
Methodenkorrelation	37
Verschleppung	37
Literatur	38

Allgemeine Informationen

Bestimmungsgemäßer Gebrauch

Der Aptima HBV Quant Assay ist ein *In-vitro*-Nukleinsäure-Amplifikationstest zur Quantifizierung der DNA des Hepatitis-B-Virus (HBV) in Humanplasma und -serum auf dem voll automatisierten Panther™ System.

Das Plasma kann in Ethylendiamintetraacetat (EDTA), gerinnungshemmeder Acid-Citrate-Dextrose-Lösung (ACD-Stabilisator) und Plasmavorbereitungsröhrchen (PPTs) vorbereitet werden. Das Serum kann in Serumröhrchen und Serum-Separator-Röhrchen (SSTs) vorbereitet werden. Die Aufbereitung, Amplifikation and Quantifizierung der Proben für den Test erfolgen auf dem voll automatischen Panther System. HBV-haltige Proben mit den HBV-Genotypen A, B, C, D, E, F, G und H werden im Assay für die Quantifizierung validiert.

Der Aptima HBV Quant Assay ist als Hilfsmittel in der Betreuung von chronisch HBV-infizierten Patienten indiziert, die sich einer antiviralen medikamentösen HBV-Therapie unterziehen. Mit dem Assay lassen sich die HBV-DNA-Spiegel zu Behandlungsbeginn und unter laufender Behandlung bestimmen, um so die Virusantwort auf die Therapie beurteilen zu können. Die Ergebnisse des Aptima HBV Quant Assays sind im Kontext aller relevanten klinischen und laborbezogenen Erkenntnisse zu deuten.

Der Aptima HBV Quant Assay ist weder für das Screening von Blut und Blutprodukten auf HBV geeignet noch als Diagnostikum zur Bestätigung einer vorliegenden HBV-Infektion.

Zusammenfassung und Testerklärung

Als einer der bekannten viralen Auslöser einer Hepatitis wird das Hepatitis-B-Virus (HBV) mit chronischer HBV-Infektion, Leberzirrhose, Leberkarzinom, Leberinsuffizienz/-versagen bis hin zu Todesfällen in Verbindung gebracht. Laut der Weltgesundheitsorganisation (WHO) handelt es sich bei der HBV-Infektion um eine der häufigsten Infektionskrankheiten überhaupt. Weltweit zeigen Prävalenz und Übertragungswege der HBV-Infektion große Unterschiede. Bei etwa einem Drittel der Weltbevölkerung finden sich serologische Hinweise auf eine frühere oder akute HBV-Infektion, wobei weltweit mehr als 350 Millionen Menschen chronisch mit HBV infiziert sind.^{1,2,3} Eine HBV-Infektion steigert das Risiko einer Dekompensation und Zirrhose der Leber sowie des hepatozellulären Karzinoms (HCC) und geht weltweit mit einer Mortalität von 0,5-1,2 Millionen Todesfällen und als Grunderkrankung bei 5-10 % der Lebertransplantationen einher.^{4,5} Ohne entsprechende Behandlung, Intervention und Kontrolle nach Diagnosestellung liegt die kumulierte Fünfjahres-Inzidenz der Leberzirrhose bei 8-20 %. Nachdem eine Zirrhose vorliegt, steigt das Risiko, an einem hepatozellulären Karzinom (HCC) zu erkranken, jährlich um 2-5 %.⁶

Das Genom des HBV besteht aus zirkulär-geschlossener DNA, jedoch ist die DNA nicht vollständig doppelsträngig; sie enthält etwa 3.200 Basenpaare, die vier sich teilweise überlappende offene Leserahmen (ORF) kodieren, welche die Polymerase-, Oberflächen-, Präkern-/Kern- und X-Proteine exprimieren. Der Polymerase-ORF überlappt die drei anderen ORF-Leserahmen und kodiert die Polymerase, ein Schlüsselprotein für die Virusreplikation. Der Oberflächen-ORF exprimiert drei Proteine, für die Morphogenese des Virus, das Einschleusen des Virus in die Hepatozyten und das Auslösen der Immunreaktion des Wirts von entscheidender Bedeutung sind.⁷ Es gibt 8 HBV-Genotypen (A-H), die sich typischerweise in unterschiedlichen geografischen Gegenden finden. Derzeit dient die Quantifizierung der HBV-DNA der Festlegung, welche chronisch infizierte Patienten von einer Behandlung profitieren würden, sowie der Kontrolle des Ansprechverhaltens auf die Behandlung und zur Beurteilung eines Wiederaanstiegs der Viruslast, was Hinweis auf eine mögliche Arzneimittelresistenz wäre.⁵

Der Aptima HBV Quant Assay ist ein *In-vitro*-Nukleinsäure-Amplifikationstest mit der transkriptionsvermittelten Amplifikationstechnik (TMA - Transcription Mediated Amplification) des Panther Systems zur Quantifizierung der HBV-DNA des Genotyps A, B, C, D, E, F, G und H. Der Aptima HBV Quant Assay zielt auf zwei hoch konservierte Regionen der Polymerase- und Surface-Gene (zur besseren Widerstandsfähigkeit gegenüber möglichen Mutationen). Der Assay ist auf den 3. Internationalen Standard der WHO für das Hepatitis-B-Virus standardisiert (NIBSC-Kode: 10/264).

Testprinzip

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

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

Die Target-Amplifikation findet durch TMA statt, eine transkriptionsvermittelte Nukleinsäureamplifikationsmethode, bei der zwei Enzyme, die reverse Transkriptase des MMLV (Moloney murines Leukämievirus) und die T7-RNA-Polymerase zum Einsatz kommen. Die reverse Transkriptase erzeugt eine DNA-Kopie (mit einer Promotorsequenz für die T7-RNA-Polymerase) der Targetsequenz. T7-RNA-Polymerase produziert mehrere Kopien des RNA-Amplikons vom Template der DNA-Kopie. Der Aptima HBV Quant Assay verwendet die TMA-Methode zur Amplifizierung von zwei Regionen des HBV-Genoms (Polymerase- sowie Surface-Gen). Zur Amplifikation dieser bestimmten Regionen werden spezielle Primer zur Amplifizierung der HBV-Genotypen A, B, C, D, E, F, G und H verwendet. Das Design der Primer und der Ansatz mit zwei Targets gewährleisten eine präzise Quantifizierung der HBV-DNA.


Die Detektion wird erreicht, indem einzelsträngige Nukleinsäure-Sonden (Torches) verwendet werden, die während der Amplifikation des Targets vorhanden sind und spezifisch und in Echtzeit an das Amplikon hybridisieren. Jede Sonde hat ein Fluorophor und einen Quencher. Wenn die Sonde nicht mit dem Amplikon hybridisiert, befindet sich der Quencher nahe bei dem Fluorophor und unterdrückt die Fluoreszenz. Bindet die Sonde jedoch an das Amplikon, ist der Abstand zwischen Quencher und Fluorophor größer, sodass dieses bei Anregung mit einer Lichtquelle ein Signal mit einer bestimmten Wellenlänge abgibt. Je mehr Sonden an Amplikons hybridisieren, desto stärker ist das erzeugte Fluoreszenzsignal. Der Zeitraum, der verstreicht, bis das Fluoreszenzsignal einen bestimmten Schwellenwert erreicht hat, ist zur HBV-Ausgangskonzentration proportional. Jede Reaktion hat einen internen Kalibrator/eine interne Kontrolle (Internal Control, IC) zur Überprüfung auf Schwankungen bei der Probenbearbeitung, Amplifikation und Detektion. Die Konzentration einer Probe wird von der Panther System Software bestimmt, indem die HBV- und IC-Signale in jeder Reaktion mit Kalibrierungsdaten verglichen werden.

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- A. Nur für die *In-vitro*-Diagnostik.
- B. Zur Verringerung des Risikos ungültiger Ergebnisse müssen die Packungsbeilage und das *Panther System Operator's Manual* (Bedienungsanleitung für das Panther System) vollständig durchgelesen werden, bevor dieser Assay durchgeführt wird.
- C. Das qHBV Target-Enhancer-Reagenz (TER) ist ätzend.
- R22 - Gesundheitsschädlich beim Verschlucken.
 - R35/41 - Verursacht schwere Verätzungen der Haut und Augenschäden.



Laborbezogen

-  D. VORSICHT: Die Kontrollen für diesen Assay enthalten Humanplasma. In von der US-amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) zugelassenen Verfahren ist das Plasma negativ auf Hepatitis B-Oberflächenantigen (HBsAg), Antikörper gegen HCV, Antikörper gegen HIV-1 und HIV-2 und HIV-Antigen. Das Plasma ist außerdem bei Testung mit zugelassenen Nukleinsäuretests von Probenpools nicht-reaktiv auf HBV-DNA, HCV-RNA und HIV-1-RNA. Alle aus Humanblut stammenden Materialien sind als potenziell infektiös zu betrachten und mit den allgemeinen Vorsichtsmaßnahmen zu behandeln.^{8,9,10}
- E. Dieses Verfahren sollte nur von Personen durchgeführt werden, die in der Anwendung des Aptima HBV Quant Assays und in der Handhabung potenziell infektiösen Materials entsprechend geschult sind. Bei Materialverschüttung sind die betroffenen Flächen unter Einhaltung entsprechender vor Ort gültiger Verfahren sofort zu desinfizieren.
- F. Nur die im Lieferumfang enthaltenen oder angegebenen Einweg-Laborprodukte verwenden.
- G. Die normalen Vorsichtsmaßnahmen im Labor ergreifen. Nicht mit dem Mund pipettieren. In den ausgewiesenen Arbeitsbereichen nicht essen, trinken oder rauchen. Ungeputerte Einweghandschuhe, Augenschutz und Laborkittel beim Umgang mit Proben und Kitreagenzien tragen. Nach der Handhabung von Proben und Kitreagenzien die Hände gründlich waschen.
- H. Arbeitsflächen, Pipetten und andere Geräte müssen regelmäßig mit einer 2,5-% igen bis 3,5-% igen (0,35 M bis 0,5 M) Natriumhypochloritlösung dekontaminiert werden.
- I. Alles Material, das in Kontakt mit Patientenproben und Reagenzien gelangt ist, nach allen geltenden regionalen, nationalen und internationalen Vorschriften entsorgen.^{8,9,10,11} Alle Arbeitsflächen gründlich reinigen und desinfizieren.
- J. Die Kontrollen enthalten Natriumazid als Konservierungsmittel. Für den Reagenzientransfer kein Metallröhrchen verwenden. Wenn Lösungen mit Natriumazidverbindungen in ein Rohrsystem entsorgt werden, sind sie zu verdünnen und mit reichlichen Mengen an fließendem Leitungswasser hinunterzuspülen. Diese Vorsichtsmaßnahmen werden empfohlen, um Ablagerungen in Metall-Abflussrohren zu vermeiden, die eine Explosionsgefahr bilden können.
- K. Zu der guten Standardpraxis für Molekularbiologie-Laboratorien gehört auch die Überwachung der Laborumgebung. Zur Überwachung der Laborumgebung wird folgende Vorgehensweise empfohlen:

1. Einen Tupfer mit Wattespitze und ein Aptima Probenaliquotröhrchen (Specimen Aliquot Tube, SAT) bereitlegen.
2. Jedes SAT entsprechend beschriften.
3. Jedes SAT mit 1 ml Aptima Probenverdünner füllen.
4. Zur Erfassung der Oberflächenproben einen Tupfer leicht mit nukleasefreiem entionisiertem Wasser befeuchten.
5. Den Tupfer auf der betreffenden Oberfläche in einer vertikalen Bewegung von oben nach unten führen. Während der Probengewinnung den Tupfer etwa eine halbe Drehung drehen.
6. Die Tupferprobe sofort in das Röhrchen geben und im Verdünner vorsichtig schwenken, um möglicherweise auf dem Tupfer vorhandenes Material zu extrahieren. Den Tupfer an der Seite des Transportröhrchens ausdrücken, um so viel Flüssigkeit wie möglich zu extrahieren. Den Tupfer entsorgen und das Röhrchen mit der Kappe verschließen.
7. Die Schritte mit den verbleibenden Tupferproben wiederholen.
8. Die Tupferprobe mit dem molekularen Assay testen.

Probenbezogen

- L. Proben können infektiös sein. Bei der Durchführung dieses Assays sind die allgemein gültigen Vorsichtsmaßnahmen^{8,9,10} zu befolgen. Entsprechend den regional, national und international geltenden Bestimmungen sind angemessene Handhabungs- und Entsorgungsmethoden festzulegen.¹¹ Dieses Verfahren sollte nur von Personen durchgeführt werden, die in der Anwendung des Aptima HBV Quant Assays und in der Handhabung infektiösen Materials entsprechend geschult sind.
- M. Um die Probenintegrität zu wahren, müssen während des Probenversands die ordnungsgemäßen Lagerbedingungen aufrechterhalten werden. Die Probenstabilität unter anderen Versandbedingungen als den hier empfohlenen wurde nicht beurteilt.
- N. Kreuzkontamination in den Probenbehandlungsschritten vermeiden. Insbesondere ist darauf zu achten, beim Lösen oder Entfernen von Kappen von Patientenproben eine Kontamination durch Verbreitung von Aerosolen zu vermeiden. Die Proben können sehr hohe Konzentrationen von Organismen aufweisen. Es ist sicherzustellen, dass die Probenbehälter nicht miteinander in Berührung kommen. Benutzte Materialien dürfen nicht über offene Behälter hinweg entsorgt werden. Wechseln Sie die Handschuhe, wenn diese mit Proben in Kontakt kommen.

Testbezogen

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

- S. Assay-Reagenzien oder Flüssigkeiten nicht kombinieren, außer auf ausdrückliche Anweisung. Füllen Sie Reagenzien oder Flüssigkeiten nicht nach. Das Panther System überprüft die Reagenzien-Füllstände.
- T. Berührung des Target-Enhancer-Reagenz mit Haut, Augen und Schleimhäuten vermeiden. Bei Kontakt mit diesem Reagenz den betroffenen Bereich mit Wasser abspülen. Wird dieses Reagenz verschüttet, muss es mit Wasser verdünnt und anschließend entsprechend den örtlich geltenden Vorschriften beseitigt werden.

Lagerungs- und Handhabungsbedingungen für Reagenzien

- A. Die folgende Tabelle zeigt die Lagerungsbedingungen und die Stabilität der Reagenzien, der Kontrollen und des Kalibrators.

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

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

- B. Alle unbenutzten und rekonstituierten Reagenzien, das Target-Capture-Reagenz (Target Capture Reagent, TCR) und das Target-Enhancer-Reagenz (Target Enhancer Reagent, TER) nach 30 Tagen oder nach Ablauf des Verfallsdatums der Hauptcharge (das frühere Datum ist ausschlaggebend) entsorgen.
- C. Im Panther System gelagerte Reagenzien sind im Gerät 72 Stunden stabil. Reagenzien können bis zu 5 Mal auf das Panther System geladen werden. Das Laden von Reagenzien wird jedes Mal im Panther System-Protokoll vermerkt.

- D. Nach dem Auftauen des Kalibrators muss die Lösung klar sein, d. h., keine Trübungen oder Präzipitate aufweisen.
- ⚠ E. Das Promotorreagenz und das rekonstituierte Promotorreagenz sind lichtempfindlich. Diese Reagenzien sind lichtgeschützt zu lagern und für die Anwendung vorzubereiten.
- F. Das qHBV Target-Enhancer-Reagenz muss vor Gebrauch eine Temperatur von 15 °C bis 30 °C erreichen.

Probenentnahme und -lagerung

Hinweis: Alle Patientenproben sind als potenziell infektiös zu handhaben. Es sind allgemeine Vorsichtsmaßnahmen zu treffen.

Hinweis: Bei den Schritten, die eine Handhabung von Proben erfordern, darauf achten, eine Kreuzkontamination zu vermeiden. Benutztes Material ist beispielsweise so zu beseitigen, dass es nicht über geöffnete Röhrchen geführt wird.

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

- Röhrchen mit EDTA oder ACD als Antikoagulans
- Plasmavorbereitungsröhrchen (PPTs)
- Serumröhrchen
- Serum-Separator-Röhrchen (SSTs)

Bei Serum ist vor der Weiterverarbeitung die Koagelbildung abzuwarten.

A. Probenentnahme

Vollblut kann bei 2 °C bis 30 °C gelagert werden und ist innerhalb von 24 Stunden nach der Probenentnahme zu zentrifugieren. Plasma oder Serum unter Einhaltung der Herstelleranweisungen für das jeweils verwendete Röhrchen vom Erythrozytenpellet trennen. Plasma oder Serum kann im primären Röhrchen auf dem Panther System getestet oder zuvor in ein sekundäres Probenaliquotröhrchen (Specimen Aliquot Tube, SAT) überführt werden. Das Plasma- oder Serummindestvolumen für primäre Entnahmeröhrchen beträgt 1200 µl bzw. 700 µl bei SATs, um das Reaktionsvolumen von 500 µl zu erreichen.

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

B. Bedingungen für die Lagerung von Patientenproben

1. EDTA- und ACD-Plasmaproben

Vollblut kann bei 2 °C bis 30 °C gelagert werden und ist innerhalb von 24 Stunden nach der Probenentnahme zu zentrifugieren. Anschließend kann Plasma unter einer der folgenden Bedingungen längere Zeit gelagert werden:

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

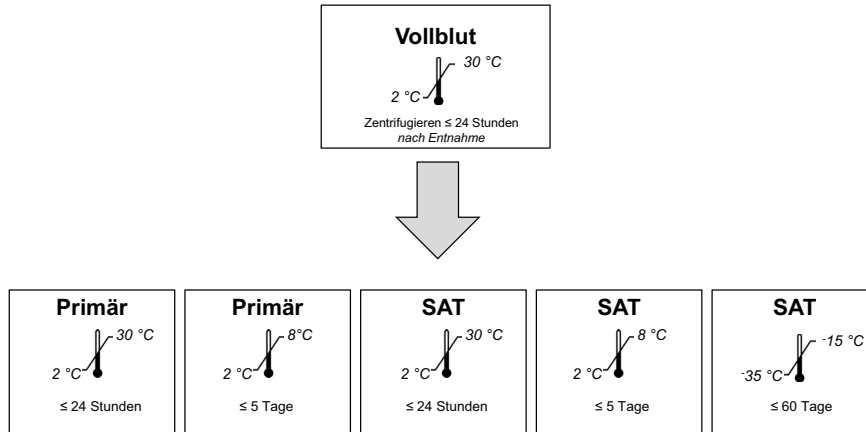


Abbildung 1. Bedingungen für die Lagerung von EDTA/ACD-Röhrchen

2. PPT-Patientenproben

Vollblut kann bei 2 °C bis 30 °C gelagert werden und ist innerhalb von 24 Stunden nach der Probenentnahme zu zentrifugieren. Anschließend kann Plasma unter einer der folgenden Bedingungen längere Zeit gelagert werden:

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

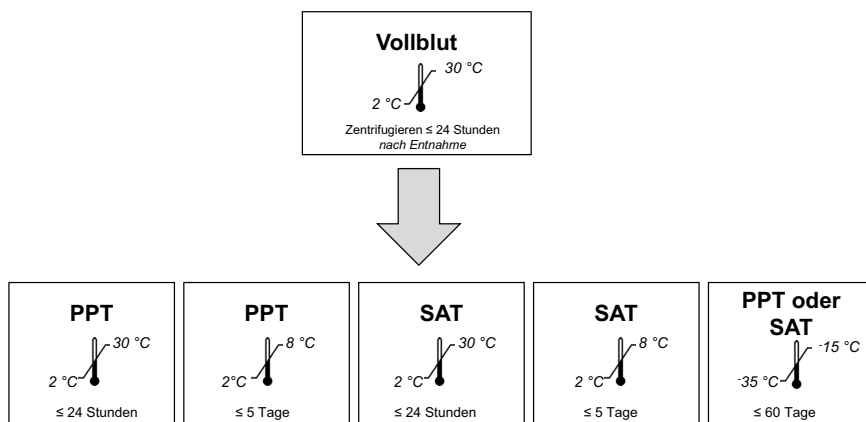


Abbildung 2. Bedingungen für die Lagerung von PPTs

3. Patientenproben in Serumröhrchen

Vollblut kann bei 2 °C bis 30 °C gelagert werden und ist innerhalb von 24 Stunden nach der Probenentnahme zu zentrifugieren. Anschließend kann Serum unter einer der folgenden Bedingungen längere Zeit gelagert werden:

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

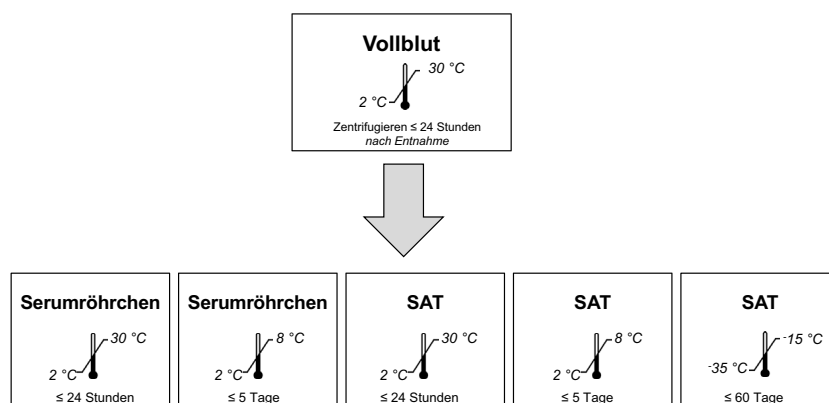


Abbildung 3. Bedingungen für die Lagerung von Serumröhrchen

4. SST-Patientenproben

Vollblut kann bei 2 °C bis 30 °C gelagert werden und ist innerhalb von 24 Stunden nach der Probenentnahme zu zentrifugieren. Anschließend kann Serum unter einer der folgenden Bedingungen längere Zeit gelagert werden:

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

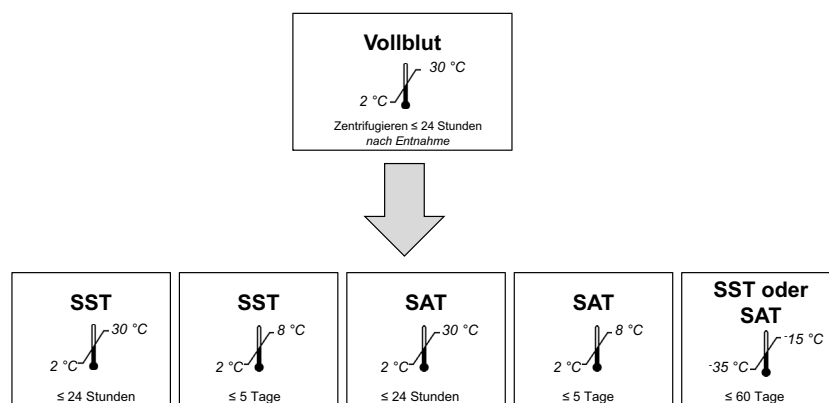


Abbildung 4. Bedingungen für die Lagerung von SSTs

C. Langzeitlagerung im gefrorenen Zustand

Plasma- oder Serumproben können in SATs bis zu 60 Tage lange bei -65 °C bis -85 °C gelagert werden.

D. Verdünnung von Plasma- and Serumproben

Plasma- oder Serumproben können zum Test auf dem Panther System im SAT verdünnt werden. Für weitere Informationen siehe *Testverfahren mit dem Panther System*, Absatz E, "Probenhandhabung", Schritt 6.

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

Im Panther System gelagerte Proben

Proben können bis zu 8 Stunden lang unverschlossen auf dem Panther System stehen gelassen werden. Solange die Gesamtverweildauer auf dem System vor dem Pipettieren der Probe durch das Panther System 8 Stunden nicht übersteigt, können die Proben wieder aus dem Panther System genommen und getestet werden.

Transport von Patientenproben

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

Hinweis: Ein Versand der Patientenproben muss in Übereinstimmung mit geltenden nationalen, internationalen und regionalen Frachtbestimmungen erfolgen.

Panther System

Nachstehend sind die Reagenzien für den Aptima HBV Quant Assay für das Panther System gelistet. Die Symbole zur Identifikation der Reagenzien sind neben dem Reagenznamen angegeben.

Im Lieferumfang enthaltene Reagenzien und Materialien

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

Aptima HBV Quant Assay Kit, 100 Tests (Kat.-Nr. PRD-03424)
(1 Assay-Box, 1 Kalibrator-Kit, 1 Kit mit Kontrollen und 1 Target-Enhancer-Reagent-Box)

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

Aptima HBV Quant Assay-Box
(nach Wareneingang bei 2 °C bis 8 °C lagern)

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

Aptima HBV Quant Kalibrator-Kit (Kat.-Nr. PRD-03425)
(nach Wareneingang bei -15 °C bis -35 °C lagern)

Symbol	Komponente	Menge
PCAL	qHBV Positivkalibrator <i>Plasmid-DNA in Pufferlösung</i>	5 x 2,5 ml
	Barcode-Etikett des Kalibrators	—

Aptima HBV Quant Kit mit Kontrollen (Kat.-Nr. PRD-03426)
(nach Wareneingang bei -15 °C bis -35 °C lagern)

Symbol	Komponente	Menge
NC	qHBV Negativkontrolle <i>HBV-negatives defibriniertes Humanplasma mit Gentamicin und 0,2 % Natriumazid als Konservierungsmittel.</i>	5 x 0,8 ml
LPC	qHBV Schwach positive Kontrolle <i>HBV-negatives defibriniertes Humanplasma mit Gentamicin und 0,2 % Natriumazid als Konservierungsmittel.</i>	5 x 0,8 ml
HPC	qHBV Stark positive Kontrolle <i>HBV-negatives defibriniertes Humanplasma mit Gentamicin und 0,2 % Natriumazid als Konservierungsmittel.</i>	5 x 0,8 ml
	Barcode-Etikett der Kontrolle	—

Aptima HBV Quant Target-Enhancer-Reagenz-Box
(nach Wareneingang bei 15 °C bis 30 °C lagern)

Symbol	Komponente	Menge
TER	qHBV Target-Enhancer-Reagenz <i>Konzentrierte Lithiumhydroxid-Lösung</i>	1 x 46,0 ml

Erforderliche, jedoch nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien

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

Material	Kat.-Nr.
Panther System	—
Panther Durchlaufkit für Echtzeitassays (nur für Echtzeitassays)	PRD-03455 (5000 Tests)
<i>Aptima Assayflüssigkeitskit (auch als Universal-Flüssigkeitskit bezeichnet) enthält Aptima Waschlösung, Aptima Puffer für Deaktivierungsflüssigkeit und Aptima Ölreagenz</i>	303014 (1000 Tests)
<i>Multi-Röhrchen-Einheiten (MTUs)</i>	104772-02
<i>Panther Entsorgungsbeutel-Kit</i>	902731
<i>Panther Abfallabdeckung</i>	504405
oder Panther System-Durchlaufkit <i>(Wenn Echtzeit- und Nicht-Echtzeit-TMA-Assays gleichzeitig laufen) enthält MTUs, Entsorgungsbeutel, Abfallabdeckungen, Auto Detect und Assayflüssigkeiten</i>	303096 (5000 Tests)
Spitzen, 1000 µl, leitfähig, zur Flüssigkeitsstandmessung	10612513 (Tecan)
Chlorbleiche, 5 % bis 7 % (0,7 M bis 1,0 M) Natriumhypochloritlösung	—
Ungepuderte Einweghandschuhe	—
Ersatzkappen für Reagenzien <i>Rekonstitutionslösungs-Flaschen für Amplifikations-, Enzym- und Promoterreagenz</i>	CL0041 (100 Kappen)
<i>TCR-Flasche</i>	CL0040 (100 Kappen)
<i>TER-Flasche</i>	501604 (100 Kappen)
Labortischunterlagen mit Kunststoffrückseite	—
Fusselfreie Tücher	—
Pipettor	—
Spitzen	—
Es können primäre Entnahmeröhrchen mit folgenden Abmessungen verwendet werden:	—
<i>13 mm x 100 mm</i>	
<i>13 mm x 75 mm</i>	
<i>16 mm x 100 mm</i>	
Zentrifuge	—
Vortexer	—

Optionale Materialien

Material	Kat.-Nr.
Aptima Probenaliquotröhrchen (Specimen Aliquot Tubes, SAT) (100 St.)	503762
Deckel für Transportröhrchen (100 St.) <i>Kappe für SAT</i>	504415
Aptima Probenverdünner	PRD-03003
Aptima Probenverdünner-Kit <i>enthält Probenverdünner, 100 SATs und 100 Kappen</i>	PRD-03478
Transferpipetten	—
Handelsübliche Panels, z. B: <i>HBV-Panels von Quality Control for Molecular Diagnostics (QCMD)</i>	—
Wattestäbchen	—
Schwenkvorrichtung für Röhrchen	—

Testverfahren mit dem Panther System

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

A. Vorbereitung des Arbeitsbereichs

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

B. Vorbereitung von Kalibrator und Kontrollen

Lassen Sie den Kalibrator und die Kontrollen vor der Verarbeitung eine Temperatur von 15 °C bis 30 °C annehmen, indem Sie folgenderweise vorgehen:

1. Nehmen Sie den Kalibrator und die Kontrollen aus der Lagerung (-15 °C bis -35 °C) und bringen Sie sie auf eine Temperatur von 15 °C bis 30 °C. Drehen Sie jedes Röhrchen während des gesamten Auftauprozesses behutsam um, um den Inhalt gründlich zu mischen. Es ist darauf zu achten, dass der Röhrcheninhalt vor dem Gebrauch komplett aufgetaut ist.

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

Hinweis: Beim Umdrehen des Kalibrators und der Kontrollen ist starke Schaumbildung zu vermeiden. Schaum beeinträchtigt die Füllstandsmessung im Panther System.

2. Wenn der Röhrcheninhalt aufgetaut ist, trocknen Sie das Röhrchen außen mit einem sauberen, trockenen Einwegtuch ab.
3. Zur Verhinderung einer Kontamination sollten Sie die Röhrchen zu diesem Zeitpunkt nicht öffnen.

C. Reagenzrekonstitution/Vorbereitung eines neuen Kits

Hinweis: Die Reagenzrekonstitution sollte vor Beginn von Arbeiten mit dem Panther System durchgeführt werden.

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

Option. Das TCR-Fläschchen kann auf einer geeigneten Schwenkvorrichtung folgenderweise vorbereitet werden: Nehmen Sie das TCR aus der Lagerung (2 °C bis 8 °C) und schütteln Sie es sofort kräftig 10 Mal. Platzieren Sie die TCR-Flasche auf einer geeigneten Schwenkvorrichtung und lassen Sie sie mindestens 45 Minuten bei 15 °C bis 30 °C erwärmen.
 - c. Vergewissern Sie sich vor dem Gebrauch, dass alle Präzipitate gelöst und die Magnetpartikel suspendiert sind.
2. Zum Rekonstituieren von Amplifikations-, Enzym- und Promotorreagenz gehen Sie folgenderweise vor:
 - a. Nehmen Sie die gefriergetrockneten Reagenzien und die entsprechenden Rekonstitutionslösungen aus der Lagerung (2 °C bis 8 °C). Paaren Sie jede Rekonstitutionslösung mit ihrem lyophilisierten Reagenz.
 - b. Vergewissern Sie sich, dass das Etikett der Rekonstitutionslösung und das des gefriergetrockneten Reagenzes dieselbe Farbe aufweisen. Prüfen Sie die Chargennummern auf dem Hauptchargen-Barcodeblatt, um sicherzustellen, dass die richtigen Reagenzien miteinander gepaart wurden.
 - i. Öffnen Sie das Fläschchen mit dem gefriergetrockneten Reagenz, indem Sie die Metallversiegelung und den Gummistopfen entfernen.
 - ii. Führen Sie das gekerbte Ende des Rekonstitutionsverbindungsstücks (schwarz) fest in das Fläschchen ein (Abbildung 5, Schritt 1).
 - iii. Öffnen Sie die Flasche mit der entsprechenden Rekonstitutionslösung und legen Sie den Deckel auf eine saubere, abgedeckte Arbeitsfläche.
 - iv. Stellen Sie die Flasche mit der Rekonstitutionslösung auf eine stabile Fläche (d. h. den Labortisch). Drehen sich dann das Fläschchen mit dem gefriergetrockneten Reagenz über der Flasche mit der Rekonstitutionslösung um und befestigen Sie das Verbindungsstück an der Flasche mit Rekonstitutionslösung (Abbildung 5, Schritt 2).
 - v. Drehen Sie die zusammengefügte Flasche (an Flasche mit Lösung aufgesetztes Fläschchen) langsam um, damit die Lösung in das Glasfläschchen laufen kann (Abbildung 5, Schritt 3).

- vi. Schwenken Sie die zusammengefügtten Flaschen mindestens 10 Sekunden lang (Abbildung 5, Schritt 4).
- vii. Warten Sie mindestens 30 Minuten, damit das gefriergetrocknete Reagenz in Lösung gehen kann.
- viii. Nachdem das gefriergetrocknete Reagenz in Lösung gegangen ist, schwenken Sie die zusammengefügtten Flaschen mindestens 10 Sekunden lang und mischen Sie anschließend die Lösung gründlich, indem Sie das Glasfläschchen leicht nach vorne und hinten kippen.
- c. Drehen Sie die zusammengefügtten Flaschen dann wieder langsam um, damit die Lösung wieder komplett zurück in die Flasche mit der Rekonstitutionslösung fließen kann (Abbildung 5, Schritt 5).
- d. Entfernen Sie das Rekonstitutionsverbindungsstück und das Glasfläschchen (Abbildung 5, Schritt 6).
- e. Verschließen Sie die Flasche wieder. Tragen Sie die Initialen des Bedieners und das Rekonstitutionsdatum auf dem Etikett ein (Abbildung 5, Schritt 7).
- f. Entsorgen Sie Rekonstitutionsverbindungsstück und Fläschchen (Abbildung 5, Schritt 8).

Warnung: Bei der Rekonstitution von Reagenzien übermäßige Schaumbildung vermeiden. Schaum beeinträchtigt die Füllstandsmessung im Panther System.

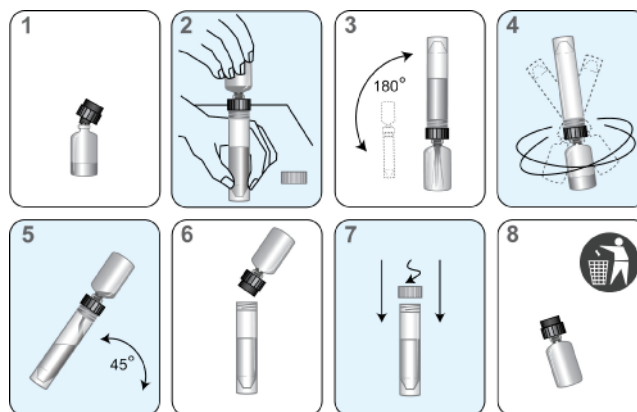


Abbildung 5. Rekonstitution von Reagenzien

3. Nehmen Sie die bereits vorbereiteten Reagenzien aus der Lagerung (15 °C bis 30 °C). Tragen Sie die Initialen des Bedieners und das Öffnungsdatum auf dem Etikett ein. Überprüfen Sie die Chargennummer auf der TER-Flasche, um sicherzustellen, dass sie mit der Chargennummer auf dem Hauptchargen-Barcodeblatt übereinstimmt.
- D. Reagenzienvorbereitung für bereits angesetzte Reagenzien
1. Nehmen Sie die bereits angesetzten Reagenzien aus der Lagerung (2 °C bis 8 °C). Bereits angesetzte Amplifikations-, Enzym-, Promoter- und TCR-Reagenzien müssen vor Beginn des Assays auf eine Temperatur von 15 °C bis 30 °C gebracht werden.
 2. Nehmen Sie das TER aus der Lagerung (15°C bis 30°C).
 3. Bei bereits angesetzten TCR führen Sie vor dem Laden auf das System den Schritt C.1 oben durch.

4. Vor dem Laden auf das System müssen Amplifikations-, Enzym- und Promotorreagenzien zum gründlichen Mischen geschwenkt und umgedreht werden. Beim Umdrehen von Reagenzien übermäßige Schaumbildung vermeiden.
5. Füllen Sie Reagenzflaschen nicht nach. Das Panther System erkennt Flaschen, die nachgefüllt wurden, und nimmt sie nicht an.

E. Probenhandhabung

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

6. Verdünnen einer Probe im SAT

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

Hinweis: Wenn eine Patientenprobe verdünnt wird, muss sie sofort nach der Verdünnung analysiert werden.

a. Verdünnung von kleinvolumigen Proben

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

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

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

b. Verdünnung hochtitriger Proben

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

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

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

Hinweis: Bei verdünnten Proben, deren Konzentration im unverdünnten Zustand über der oberen Quantifizierungsgrenze liegt, werden die Ergebnisse in wissenschaftlicher Notation angegeben.

F. Vorbereitung des Systems

1. Richten Sie das System entsprechend den Anweisungen im *Panther System Operator's Manual* (Bedienungsanleitung für das Panther System) und den *Verfahrenshinweise* ein. Achten Sie darauf, dass Reagenzienstände und TCR-Adapter geeigneter Größe verwendet werden.
2. Laden Sie die Proben in den Probenständer. Führen Sie für jedes Probenröhrchen (Patientenproben und ggf. Kalibrator und Kontrollen) die folgenden Schritte durch:
 - a. Lösen Sie die Kappe eines Probenröhrchens, aber nehmen Sie sie noch nicht ab.
Hinweis: Achten Sie besonders darauf, eine Kontamination durch Aerosolausbreitung zu vermeiden. Lösen Sie vorsichtig die Kappen der Proben.
 - b. Laden Sie das Probenröhrchen in den Probenständer.
 - c. Wiederholen Sie die Schritte 2.a und 2.b für jede verbleibende Probe.
 - d. Wenn die Proben in den Probenständer geladen sind, nehmen Sie die Kappe von jedem Probenröhrchen ab und entsorgen Sie sie in einen Probenständer. Führen Sie die Kappen zur Vermeidung von Kontamination nicht über einen Probenständer oder ein Probenröhrchen.
 - e. Verwenden Sie ggf. eine neue Einweg-Transferpipette, um etwaige Luft- oder Schaumbläschen zu entfernen.
 - f. Wenn die letzte Kappe entfernt wurde, laden Sie den Probenständer in ein Probenfach.

Hinweis: Sichern Sie bei gleichzeitiger Analyse anderer Assays und Probentypen den Probenhalter, bevor Sie den Probenständer in ein Probenfach laden.

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

Verfahrenshinweise

A. Kalibrator und Kontrollen

1. Der qHBV Positivkalibrator, die Röhrchen mit der schwach positiven, der stark positiven und der negativen qHBV-Kontrolle können in jede Position im Probenständer und in jede Probenfach-Bahn auf dem Panther System geladen werden. Die Pipettierung der Proben beginnt, wenn eine der folgenden beiden Bedingungen erfüllt ist:

- a. Der Kalibrator und die Kontrollen werden derzeit vom System verarbeitet.
 - b. Gültige Ergebnisse für den Kalibrator und Kontrollen werden auf dem System registriert.
2. Sobald der Kalibrator und die Röhren mit den Kontrollen pipettiert worden sind und mit dem Aptima HBV Quant Assayreagenzien-Kit verarbeitet werden, können bis zu 24 Stunden lang Patientenproben mit dem zugehörigen rekonstituierten Kit getestet werden, **es sei denn:**
- a. Die Kalibrator- oder Kontrollenergebnisse sind ungültig.
 - b. Das zugehörige Assayreagenzien-Kit wird aus dem System genommen.
 - c. Das zugehörige Assayreagenzien-Kit hat die Stabilitätsgrenze überschritten.
3. Das Kalibrator- und alle Kontrollenröhren können einmal verwendet werden. Wenn versucht wird, mehr als einmal aus dem Röhren zu pipettieren, kann es zu Verarbeitungsfehlern kommen.
- B. Handschuhpuder

Wie in jedem Reagenzsystem kann übermäßiger Puder auf manchen Handschuhen eine Kontamination geöffneter Röhren verursachen. Es werden ungepuderte Handschuhe empfohlen.

Qualitätskontrolle

Ein Lauf- oder Patientenprobenergebnis kann von einem Anwender für ungültig erklärt werden, wenn während der Durchführung des Assays technische, anwender- oder gerätebezogene Probleme auftreten und dokumentiert werden. In diesem Fall müssen die Proben erneut getestet werden.

Assay-Kalibrierung

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

Während der Verarbeitung werden Kriterien für die Annahme des Kalibrators von der Software auf dem Panther System automatisch verifiziert. Wenn weniger als zwei Kalibratorreplikate gültig sind, erklärt die Software den Lauf automatisch für ungültig. Proben eines für ungültig erklärten Laufs sind mit einem frisch vorbereiteten Kalibrator und frisch vorbereiteten Kontrollen erneut zu testen.

Negativ- und Positivkontrollen

Zur Erzeugung gültiger Ergebnisse muss ein Satz von Assay-Kontrollen getestet werden. Ein Replikat der Negativkontrolle, der schwach positiven Kontrolle und der stark positiven Kontrollen muss jedes Mal, wenn ein Reagenzien-Kit auf das Panther System geladen wird, getestet werden. Sobald festgelegt, sind die Kontrollen bis zu 24 Stunden gültig. Der Anwender wird von Software auf dem Panther System darauf aufmerksam gemacht, wenn Kontrollen erforderlich sind.

Während der Verarbeitung werden Kriterien für die Annahme der Kontrollen von der Software auf dem Panther System automatisch verifiziert. Zur Erzeugung gültiger Ergebnisse muss die Negativkontrolle ein Ergebnis „Nicht nachgewiesen“ liefern und die Ergebnisse der Positivkontrollen müssen innerhalb vordefinierter Parameter liegen (LPC Nominal Target: $2,7 \log_{10}$ IE/ml, HPC Nominal Target: $4,6 \log_{10}$ IE/ml). Wenn das Ergebnis für eine der Kontrollen ungültig ist, erklärt die Software den Lauf automatisch für ungültig. Proben eines für ungültig erklärten Laufs sind mit einem frisch vorbereiteten Kalibrator und frisch vorbereiteten Kontrollen erneut zu testen.

Interner Kalibrator/Interne Kontrolle

Jede Probe enthält einen internen Kalibrator/eine interne Kontrolle (IC). Während der Verarbeitung werden IC-Akzeptanzkriterien von der Software auf dem Panther System automatisch verifiziert. Wenn ein IC-Ergebnis ungültig ist, wird das Probenergebnis für ungültig erklärt. Jede Probe mit ungültigem IC-Ergebnis muss erneut getestet werden, um ein gültiges Ergebnis zu erhalten.

Die Software für das Panther System dient zur genauen Verifizierung der Prozesse, wenn Verfahren gemäß den Anweisungen in der Packungsbeilage und im *Panther System Operator's Manual* (Bedienungsanleitung für das Panther System) durchgeführt werden.

Interpretation der Ergebnisse

Das Panther System bestimmt die Konzentration der HBV-DNA in Patientenproben und Kontrolle automatisch, indem es die Ergebnisse mit einer Kalibrationskurve vergleicht. HBV-DNA-Konzentrationen werden in IE/ml und \log_{10} IE/ml angegeben. In Tabelle 1 ist die Ergebnisauswertung gezeigt. Wenn Patientenproben verdünnt worden sind, berechnet das Panther System automatisch die HBV-Konzentration für die unverdünnte Patientenprobe, indem die verdünnte Konzentration mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert wird. Verdünnte Proben werden in den Ergebnissen entsprechend gekennzeichnet.

Hinweis: Bei verdünnten Patientenproben können Ergebnisse wie „Nicht nachgewiesen“ oder „< 10 nachgewiesen“ erhalten werden, indem eine Patientenprobe mit einer Konzentration knapp, aber nahe beim LoD bzw. LLoQ (Nachweisgrenze bzw. untere Quantifizierungsgrenze) verdünnt wird. Es wird empfohlen, eine andere unverdünnte Patientenprobe zu entnehmen und zu testen, wenn kein quantitatives Ergebnis erhalten wird.

Tabelle 1: Ergebnisinterpretation

Messergebnis des Aptima HBV Quant Assays		Auswertung
IE/ml	\log_{10} Wert ^a	
Nicht nachgewiesen	Nicht nachgewiesen	HBV-DNA nicht nachgewiesen.
< 10 nachgewiesen	< 1,0	Es wird HBV-DNA nachgewiesen, aber in einer Menge unterhalb der unteren Quantifizierungsgrenze (LLoQ).
10 bis 1.000.000.000	1,0 bis 9,0	Die HBV-DNA-Konzentration liegt im linearen Bereich von 10 bis 1.000.000.000 IE/ml.
> 1.000.000.000	> 9,0	Die HBV-DNA-Konzentration liegt über der oberen Quantifizierungsgrenze (ULoQ).
Ungültig ^b	Ungültig ^b	Es gab einen Fehler bei der Erzeugung des Ergebnisses. Die Patientenprobe sollte noch einmal getestet werden.

^a Wert ist auf zwei Dezimalstellen gekürzt.

^b Ungültige Ergebnisse sind in blauer Schrift angezeigt.

Hinweis: Bei verdünnten Proben, deren Konzentration im unverdünnten Zustand über der oberen Quantifizierungsgrenze liegt, werden die Ergebnisse in wissenschaftlicher Notation angegeben.

Einschränkungen

- Dieser Test darf nur von Mitarbeitern durchgeführt werden, die im Verfahren unterwiesen wurden. Eine Nichtbefolgung der Anweisungen in dieser Packungsbeilage kann fehlerhafte Ergebnisse zur Folge haben.
- Zuverlässige Ergebnisse hängen von der Adäquanz der Entnahme, des Transports, der Lagerung und der Verarbeitung der Patientenproben ab.
- Es besteht die seltene Möglichkeit, dass Mutationen in den hoch konservierten Regionen des Virusgenoms, in denen die Primer und/oder Sonden im Aptima HBV Quant Assay binden, den Assay stören und so das Virus zu gering quantifiziert oder sogar überhaupt nicht nachgewiesen wird.

Leistungsdaten

Quantifizierungsgrenze mit dem 3. Internationalen WHO-Standard

Die Nachweisgrenze (Limit of Detection, LoD) des Assays ist definiert als die HBV-DNA-Konzentration, die gemäß CLSI EP17-A2 mit einer Wahrscheinlichkeit von mindestens 95 % festgestellt wird.¹²

Die Nachweisgrenze wurde durch Testung von Panels des 3. Internationalen WHO-Standards für Hepatitis-B-Virus-DNA (NIBSC 10/264), verdünnt in HBV-negativem Humanplasma und -serum, bestimmt. Es wurden mindestens 36 Replikate jeder Verdünnung mit jeder der drei Reagenzienchargen getestet, was mindestens 108 Replikate pro Verdünnung ergibt. Zur Aufstellung der vorhergesagten Nachweisgrenzen wurde eine Probit-Analyse durchgeführt. Bei den in Tabelle 2 dargestellten LoD-Werten handelt es sich um die Ergebnisse der Reagenzienchargen mit der höchsten vorhergesagten Nachweisgrenze. Die LoD für den Aptima HBV Quant Assay bei Verwendung des 3. Internationalen WHO-Standards beträgt 5,58 IE/ml für Plasma und 4,29 IE/ml für Serum.

Tabelle 2: Quantifizierungsgrenze mit dem 3. Internationalen WHO-Standard für HBV

Vorhergesagte Nachweisgrenze	Konzentration (IE/ml)	
	Plasma	Serum
10 %	0,16	0,19
20 %	0,27	0,30
30 %	0,39	0,42
40 %	0,55	0,56
50 %	0,75	0,73
60 %	1,02	0,96
70 %	1,42	1,29
80 %	2,09	1,81
90 %	3,58	2,91
95 %	5,58	4,29

Nachweisgrenze bei HBV-Genotypen

Zur Ermittlung der Nachweisgrenze wurden HBV-positive klinische Patientenproben der Genotypen A, B, C, D, E, F, G und H mit HBV-negativem Humanplasma und -serum verdünnt und dann getestet. Die Konzentrationen wurden über einen Vergleichsassay mit CE-Kennzeichnung und Health Canada-Lizenz bestimmt. Es wurden mindestens 24 Replikate jeder Panelprobe mit jeder der beiden Reagenzienchargen getestet, was mindestens 48 Replikate pro Panelprobe ergab. Zur Aufstellung der vorhergesagten 50%- und 95%-Nachweisgrenzen wurde eine Probit-Analyse durchgeführt. Bei den in Tabelle 3 dargestellten LoD-Werten handelt es sich um die Ergebnisse der Reagenzienchargen mit der höchsten vorhergesagten Nachweisgrenze.

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

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

Linearer Bereich

Der lineare Bereich wurde durch Testung von Panels mit in HBV-negativem Humanplasma und -serum verdünnter HBV-DNA gemäß CLSI EP06-A bestimmt.¹³ Die Konzentration der Panels lag im Bereich von 0,86 log IE/ml bis 9,26 log IE/ml. Wie in Abbildung 6 gezeigt, erwies sich der Aptima HBV Quant Assay im gesamten Testbereich als linear, mit einer oberen Quantifizierungsgrenze (Upper Limit of Quantitation, ULoQ) von 9 log IE/ml.

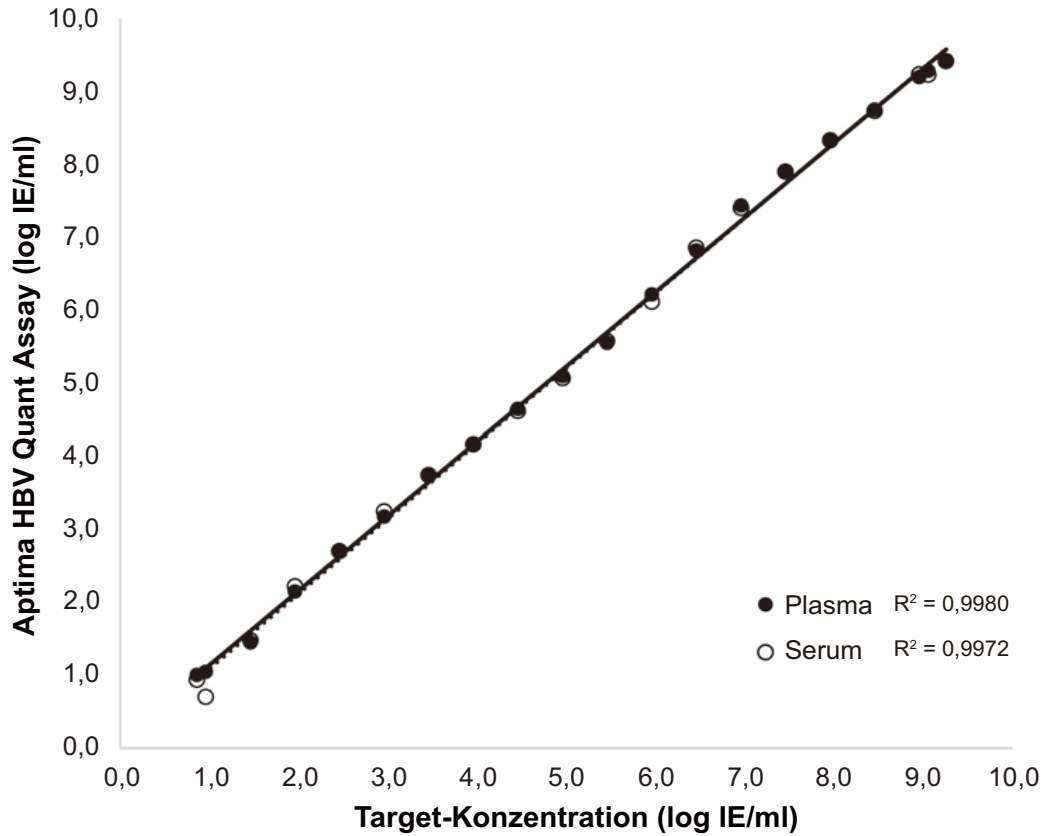


Abbildung 6. Linearität in Plasma und Serum

Linearität bei HBV-Genotypen

Die lineare Reaktion für die Genotypen A, B, C, D, E, F, G und H wurde durch Testung von pufferverdünnten HBV-DNA-Panels im Konzentrationsbereich von 1,44 log IE/ml bis 8,44 log IE/ml bestätigt. Im gesamten Testbereich wurde Linearität für alle getesteten Genotypen aufgezeigt (Abbildung 7).

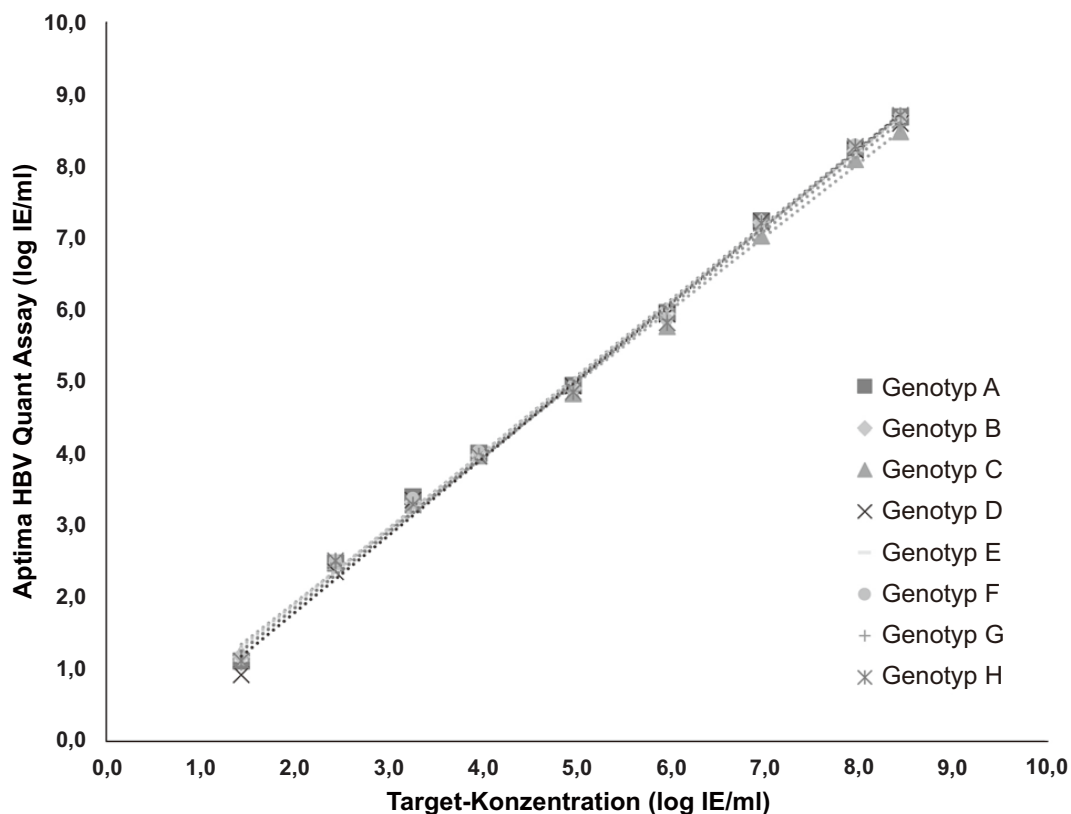


Abbildung 7. Linearität bei HBV-Genotypen A bis H

Untere Quantifizierungsgrenze mit dem 3. Internationalen WHO-Standard

Die untere Quantifizierungsgrenze (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) ist definiert als die niedrigste Konzentration, bei der HBV-DNA innerhalb eines Gesamtfehlers (Total Error, TE) zuverlässig gemäß CLSI EP17-A2 quantifiziert werden kann.¹² Der TE wurde mit zwei Methoden ermittelt: Total Analytical Error (TAE - Gesamtanalysefehler) = |Bias| + 2 SD, und Total Error (TE - Gesamtfehler) = SQRT(2) x 2 SD. Zur Sicherstellung der Genauigkeit und Präzision der Messungen wurde der TE des Aptima HBV Quant Assays auf 1 log IE/ml festgesetzt (d. h., an der LLoQ ist der Unterschied zwischen zwei Messungen von mehr als 1 log IE/ml statistisch signifikant).

Die untere Nachweisgrenze wurde durch Testung von Panels des 3. Internationalen WHO-Standards für Hepatitis-B-Virus-DNA (NIBSC 10/264), verdünnt in HBV-negativem Humanplasma und -serum, bestimmt. Es wurden mindestens 45 Replikate jeder Verdünnung mit jeder der drei Reagenzienchargen getestet, was mindestens 135 Replikate pro Verdünnung ergab. Tabelle 4 enthält die Ergebnisse der drei Reagenzienchargen für Plasma und Tabelle 5 für Serum. Die Ergebnisse für den niedrigsten Konzentrationsmesswert, der den Zielwert der Genauigkeit (TE ≤ 1 log IE/ml und TAE ≤ 1 log IE/ml) mit einer Detektionsrate von 100 % erfüllte, sind in beiden Tabellen schattiert hervorgehoben und in Tabelle 6 zusammengefasst.

Der errechnete LLoQ-Wert für den 3. Internationalen WHO-Standard für Hepatitis-B-Virus liegt für Plasma bei 4,80 IE/ml und für Serum bei 6,34 IE/ml; Grundlage hierfür ist die höchste errechnete Konzentration innerhalb der drei Reagenzienchargen. Da der errechnete LLoQ-Wert für Plasma kleiner ist als der errechnete LoD-Wert von 5,58 IE/ml, beträgt gemäß EP 17-A2 der LLoQ-Wert für Plasma für den 3. Internationalen WHO-Standard 5,58 IE/ml.

Tabelle 4: Untere Quantifizierungsgrenze LLoQ mit dem 3. Internationalen WHO-Standard für HBV in Plasmaverdünnung

Reagenzcharge	Target-Konzentration		Aptima HBV Quant	SD	[Abweichung]	Calculated TE	Calculated TAE
	(IE/ml)	(log IE/ml)	(log IE/ml)	(log IE/ml)	(log IE/ml)	(log IE/ml)	(log IE/ml)
1	7	0,85	0,63	0,27	0,22	0,75	0,75
	8	0,90	0,68	0,28	0,22	0,78	0,77
	9	0,95	0,79	0,25	0,17	0,70	0,66
2	7	0,85	0,48	0,20	0,37	0,57	0,77
	8	0,90	0,47	0,18	0,44	0,51	0,79
	9	0,95	0,61	0,19	0,34	0,54	0,73
3	7	0,85	0,53	0,21	0,32	0,59	0,74
	8	0,90	0,52	0,21	0,38	0,61	0,81
	9	0,95	0,70	0,23	0,25	0,65	0,71

SD = Standardabweichung

Tabelle 5: Untere Quantifizierungsgrenze LLoQ mit dem 3. Internationalen WHO-Standard für HBV in Serumverdünnung

Reagenzcharge	Target-Konzentration		Aptima HBV Quant	SD	[Abweichung]	Berechneter TE	Calculated TAE
	(IE/ml)	(log IE/ml)	(log IE/ml)	(log IE/ml)	(log IE/ml)	(log IE/ml)	(log IE/ml)
1	7	0,85	0,77	0,38	0,08	1,06	0,83
	8	0,90	0,80	0,31	0,10	0,88	0,72
	9	0,95	0,91	0,27	0,05	0,77	0,59
2	7	0,85	0,57	0,20	0,28	0,57	0,68
	8	0,90	0,70	0,22	0,20	0,63	0,64
	9	0,95	0,69	0,23	0,27	0,66	0,73
3	7	0,85	0,65	0,24	0,20	0,67	0,67
	8	0,90	0,65	0,24	0,25	0,68	0,73
	9	0,95	0,67	0,22	0,28	0,63	0,73

SD = Standardabweichung

Tabelle 6: Zusammenfassung der errechneten unteren Quantifizierungsgrenze LLoQ mit dem 3. Internationalen WHO-Standard HBV

Reagenzcharge	LLoQ Plasma		LLoQ Serum	
	(log IE/ml)	(IE/ml)	(log IE/ml)	(IE/ml)
1	0,68	4,80	0,80	6,34
2	0,61	4,09	0,57	3,72
3	0,52	3,34	0,65	4,51

SD = Standardabweichung

Bestimmung der unteren Qualifizierungsgrenze bei HBV-Genotypen

Zur Ermittlung der unteren Qualifizierungsgrenze LLoQ wurden HBV-positive klinische Patientenproben der Genotypen A, B, C, D, E, F, G und H mit HBV-negativem Humanplasma und -serum verdünnt und dann getestet. Es wurden mindestens 36 Replikate jeder Panelprobe mit jeder der beiden Reagenzienchargen getestet, was mindestens 72 Replikate pro Panelprobe ergab. Die Ergebnisse der Reagenziencharge mit dem höchsten Konzentrationsmesswert, der den Zielwert der Genauigkeit ($TE \leq 1 \log \text{IE/ml}$ und $TAE \leq 1 \log \text{IE/ml}$) mit einer Detektionsrate von 100 % erfüllte, sind in Tabelle 7 für Plasma und Tabelle 8 für Serum dargestellt. Die Ergebnisse für den niedrigsten Konzentrationsmesswert, der den Zielwert der Genauigkeit mit einer Detektionsrate von 100 % erfüllte, sind in beiden Tabellen schattiert hervorgehoben und in Tabelle 9 zusammengefasst. Die errechnete untere Quantifizierungsgrenze LLoQ für die Genotypen A, B, C, D, E, F, G und H in Plasma und Serum sind in Tabelle 9 dargestellt. Hierdurch wurde der Gesamt-LLoQ für den Assay mit einem Wert von 10 IE/ml festgestellt.

Tabelle 7: Bestimmung der LLoQ bei Genotypen in Plasma

Genotyp	Target-Konzentration		Aptima HBV Quant	SD	[Abweichung]	Calculated TE	Calculated TAE
	(IE/ml)	(log IE/ml)	(log IE/ml)	(log IE/ml)	(log IE/ml)	(log IE/ml)	(log IE/ml)
A	7	0,85	0,86	0,71	0,02	2,01	1,44
	8	0,90	0,76	0,34	0,14	0,96	0,82
	9	0,95	0,95	0,27	0,01	0,76	0,55
B	7	0,85	0,85	0,36	0,01	1,01	0,72
	8	0,90	0,93	0,24	0,03	0,67	0,51
	9	0,95	0,94	0,23	0,01	0,64	0,46
C	7	0,85	0,62	0,22	0,23	0,62	0,67
	8	0,90	0,65	0,25	0,25	0,70	0,75
	9	0,95	0,70	0,21	0,26	0,59	0,67
D	8	0,90	0,47	0,19	0,43	0,53	0,81
	9	0,95	0,58	0,17	0,38	0,48	0,72
	10	1,00	0,64	0,24	0,36	0,69	0,85
E	7	0,85	0,59	0,19	0,25	0,53	0,63
	8	0,90	0,59	0,23	0,31	0,66	0,78
	9	0,95	0,68	0,28	0,27	0,80	0,83
F	7	0,85	0,92	0,26	0,07	0,74	0,59
	8	0,90	1,09	0,29	0,18	0,83	0,77
	9	0,95	1,04	0,31	0,09	0,89	0,72
G	7	0,85	0,81	0,27	0,04	0,75	0,57
	8	0,90	0,91	0,26	0,01	0,72	0,52
	9	0,95	0,83	0,26	0,12	0,74	0,64
H	7	0,85	0,65	0,25	0,19	0,71	0,69
	8	0,90	0,67	0,24	0,23	0,68	0,71
	9	0,95	0,62	0,21	0,33	0,59	0,75

SD = Standardabweichung

Tabelle 8: Bestimmung der LLoQ bei Genotypen in Serum

Genotyp	Target-Konzentration		Aptima HBV Quant	SD	[Abweichung]	Calculated TE	Calculated TAE
	(IE/ml)	(log IE/ml)	(log IE/ml)	(log IE/ml)	(log IE/ml)	(log IE/ml)	(log IE/ml)
A	7	0,85	0,67	0,28	0,18	0,79	0,74
	8	0,90	0,80	0,34	0,10	0,96	0,78
	9	0,95	0,83	0,26	0,12	0,74	0,65
B	7	0,85	0,56	0,19	0,29	0,54	0,67
	8	0,90	0,71	0,22	0,20	0,62	0,63
	9	0,95	0,59	0,21	0,36	0,59	0,78
C	7	0,85	0,64	0,27	0,20	0,77	0,75
	8	0,90	0,75	0,25	0,15	0,70	0,64
	9	0,95	0,79	0,21	0,16	0,58	0,57
D	8	0,90	0,42	0,14	0,48	0,40	0,76
	9	0,95	0,47	0,18	0,49	0,51	0,84
	10	1,00	0,60	0,23	0,40	0,64	0,85
E	7	0,85	0,56	0,24	0,29	0,69	0,78
	8	0,90	0,63	0,18	0,27	0,50	0,63
	9	0,95	0,67	0,25	0,28	0,70	0,78
F	7	0,85	0,88	0,21	0,03	0,60	0,46
	8	0,90	0,90	0,29	0,01	0,81	0,58
	9	0,95	0,98	0,24	0,02	0,67	0,49
G	7	0,85	0,82	0,24	0,03	0,67	0,50
	8	0,90	0,90	0,25	0,01	0,70	0,50
	9	0,95	1,01	0,23	0,05	0,64	0,51
H	8	0,90	0,69	0,29	0,21	0,81	0,78
	9	0,95	0,77	0,26	0,19	0,74	0,71
	10	1,00	0,78	0,28	0,22	0,80	0,79

SD = Standardabweichung

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

Genotyp	LLoQ Plasma		LLoQ Serum	
	(log IE/ml)	(IE/ml)	(log IE/ml)	(IE/ml)
A	0,95	8,90	0,83	6,79
B	0,93	8,60	0,56	3,59
C	0,62	4,14	0,64	4,38
D	0,64	4,32	0,60	4,01
E	0,59	3,91	0,56	3,60
F	0,92	8,25	0,88	7,56
G	0,81	6,42	0,82	6,55
H	0,62	4,20	0,78	6,01

Reproduzierbarkeit

Zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit diente ein 28-teiliges Panel, für das HBV-positive klinische Proben (Genotyp A und C) verdünnt bzw. HBV-negative Plasma- und Serumproben mit HBV-DNA (Genotyp A und C) versetzt wurden. Das Panel wurde von drei Anwendern mit drei Reagenzchargen auf drei Panther Systemen in einem Zeitraum von mindestens 20 Tagen getestet.

Tabelle 10 und Tabelle 11 zeigt die Reproduzierbarkeit der Assay-Ergebnisse (in log IE/ml) zwischen Geräten, zwischen Bedienern, zwischen Chargen, zwischen Durchläufen, innerhalb von Durchläufen und gesamt. Die Gesamtvariabilität war hauptsächlich durch die Variabilität zwischen den Durchläufen bestimmt (d. h. durch Zufallsfehler).

Tabelle 10: Reproduzierbarkeit des Aptima HBV Quant Assay für Genotyp A

Matrix	N	Mittlere Konzentration (log IE/ml)	Zwischen Bedienern		Zwischen Geräten		Zwischen Chargen		Zwischen Durchläufen		Innerhalb von Durchläufen		Gesamt	
			SD	VK (%)	SD	VK (%)	SD	VK (%)	SD	VK (%)	SD	VK (%)	SD	VK (%)
Plasma	161	1,24	0,02	1,96	0,02	1,75	0,10	7,88	0,02	1,50	0,21	16,80	0,23	18,80
Plasma	162	1,97	0,01	0,75	0,01	0,71	0,08	3,84	0,02	0,76	0,14	7,36	0,17	8,40
Plasma	162	3,23	0,01	0,29	0,01	0,24	0,04	1,39	0,01	0,22	0,08	2,47	0,09	2,87
Plasma	162	4,14	0,03	0,76	0,01	0,28	0,04	0,90	0,01	0,15	0,06	1,38	0,08	1,84
Plasma	162	5,75	0,02	0,39	0,01	0,20	0,06	0,97	0,01	0,13	0,09	1,51	0,11	1,85
Plasma	162	6,98	0,05	0,79	0,03	0,48	0,06	0,91	0,01	0,11	0,09	1,35	0,13	1,87
Plasma	162	7,69	0,03	0,38	0,02	0,23	0,01	0,15	0,01	0,12	0,10	1,30	0,11	1,39
Serum	160	1,17	0,02	1,93	0,02	1,71	0,06	5,54	0,02	1,64	0,20	17,07	0,21	18,21
Serum	162	1,82	0,02	1,15	0,01	0,79	0,10	5,43	0,01	0,72	0,15	8,13	0,18	9,90
Serum	162	3,16	0,01	0,26	0,02	0,62	0,09	2,78	0,02	0,59	0,11	3,38	0,14	4,47
Serum	162	4,06	0,01	0,19	0,01	0,22	0,04	0,99	0,01	0,15	0,07	1,68	0,08	1,98
Serum	162	5,60	0,02	0,36	0,01	0,24	0,06	1,15	0,01	0,22	0,13	2,40	0,15	2,70
Serum	162	6,30	0,03	0,49	0,03	0,42	0,01	0,17	0,01	0,16	0,11	1,77	0,12	1,90
Serum	162	7,48	0,05	0,62	0,03	0,36	0,02	0,25	0,02	0,23	0,08	1,09	0,10	1,35

VK = Variationskoeffizient, SD = Standardabweichung

Hinweis: Die Variabilität aufgrund mancher Faktoren kann numerisch negativ sein, und zwar dann, wenn die Variabilität durch diese Faktoren sehr klein ist. In diesem Fall gilt SD und VK gleich 0.

Tabelle 11: Reproduzierbarkeit des Aptima HBV Quant Assay für Genotyp C

Matrix	N	Mittlere Konzentration (log IE/ml)	Zwischen Bedienern		Zwischen Geräten		Zwischen Chargen		Zwischen Durchläufen		Innerhalb von Durchläufen		Gesamt	
			SD	VK (%)	SD	VK (%)	SD	VK (%)	SD	VK (%)	SD	VK (%)	SD	VK (%)
Plasma	161	1,28	0,02	1,73	0,02	1,40	0,07	5,39	0,02	1,28	0,18	14,32	0,20	15,52
Plasma	162	1,98	0,02	0,79	0,01	0,68	0,08	4,02	0,01	0,61	0,14	6,91	0,16	8,08
Plasma	162	3,23	0,01	0,31	0,01	0,39	0,05	1,49	0,01	0,18	0,06	1,97	0,08	2,52
Plasma	162	4,13	0,01	0,18	0,01	0,29	0,04	0,90	0,01	0,15	0,07	1,69	0,08	1,95
Plasma	162	5,78	0,01	0,14	0,02	0,41	0,06	1,04	0,01	0,16	0,10	1,70	0,12	2,05
Plasma	162	6,83	0,01	0,20	0,03	0,42	0,03	0,42	0,01	0,08	0,06	0,93	0,08	1,13
Plasma	162	7,75	0,03	0,33	0,02	0,19	0,02	0,24	0,01	0,08	0,07	0,94	0,08	1,04
Serum	160	1,20	0,02	1,54	0,02	1,55	0,05	4,24	0,02	1,78	0,18	14,74	0,19	15,59
Serum	162	1,90	0,02	1,20	0,02	0,87	0,05	2,73	0,01	0,72	0,15	8,10	0,17	8,71
Serum	162	3,19	0,03	0,93	0,03	0,92	0,05	1,68	0,00	0,05	0,07	2,34	0,10	3,16
Serum	162	4,04	0,01	0,14	0,01	0,31	0,04	0,94	0,00	0,12	0,05	1,30	0,07	1,64
Serum	162	5,69	0,01	0,16	0,02	0,36	0,05	0,88	0,01	0,13	0,09	1,50	0,10	1,78
Serum	162	6,32	0,04	0,64	0,03	0,45	0,04	0,66	0,01	0,14	0,10	1,57	0,12	1,87
Serum	162	7,23	0,04	0,55	0,02	0,25	0,05	0,68	0,01	0,13	0,10	1,42	0,12	1,69

VK = Variationskoeffizient, SD = Standardabweichung

Hinweis: Die Variabilität aufgrund mancher Faktoren kann numerisch negativ sein, und zwar dann, wenn die Variabilität durch diese Faktoren sehr klein ist. In diesem Fall gilt SD und VK gleich 0.

Stoffe mit möglicher beeinträchtigender Wirkung

Es wurde die Anfälligkeit des Aptima HBV Quant Assays gegenüber Interferenzen durch erhöhte Konzentrationen endogener Stoffe und von Wirkstoffen, die HBV-Infizierten häufig verordnet werden, evaluiert. Es wurden HBV-negative Plasmaproben und Proben verwendet, die mit HBV bis zu einer Konzentration von 4,3 log IE/ml HBV-DNA versetzt worden waren.

Bei Vorliegen von Albumin (90 mg/ml), Hämoglobin (5 mg/ml), Triglyzeriden (30 mg/ml) oder unkonjugiertem Bilirubin (0,2 mg/ml) fand sich keine Störung der Assay-Leistung.

Klinische Plasmaproben von Patienten mit erhöhten Konzentrationen definierter Stoffe oder von Patienten mit den in Tabelle 12 gelisteten Krankheiten wurden mit dem Aptima HBV Quant Assay getestet. Es wurde keine Interferenz der Assay-Leistung beobachtet.

Tabelle 12: Getestete Typen klinischer Patientenproben

Typen klinischer Patientenproben	
1	Antinukleäre Antikörper (ANA)
2	Rheumafaktor (RF)
3	Alkoholbedingte Zirrhose (AC)
4	Alkoholbedingte Hepatitis
5	Hepatitis ohne Alkoholgenese
6	Autoimmunhepatitis
7	Erhöhte Alaninaminotransferase (ALT)
8	Hepatozelluläres Karzinom (HCC)
9	Multiple Sklerose (MS)
10	Systemischer Lupus erythematodes (SLE)
11	Hyperglobulinämie
12	Rheumatoide Arthritis (RA)
13	Anti-Jo1-Antikörper (JO-1)
14	Multiple Myelom (MM)
15	Hämolytisch (erhöhtes Hämoglobin)
16	Ikterisch (erhöhtes Bilirubin)
17	Lipämisch (erhöhte Lipide)
18	Erhöhtes Protein
19	HBV-Antikörper (geimpft)
20	HCV-Antikörper
21	HIV-1 und HIV-2 Antikörper

Bei Vorliegen der in Tabelle 13 gelisteten exogenen Stoffe in mindestens dreifacher Konzentration der C_{max} (Humanplasma) kam es zu keiner Störung der Assayleistung.

Tabelle 13: Exogene Stoffe

Pool von exogenen Stoffen	Getestete exogene Stoffe
1	Saquinavir, Ritonavir, Amprenavir, Indinavir, Lopinavir, Nelfinavirmesylat
2	Clarithromycin, Valganciclovir (als HCl), Efavirenz, Nevirapin
3	Paroxetin-HCl, Enfuvirtid, Zidovudin, Didanosin, Abacavir (als Sulfat)
4	Ribavirin, Entecavir, Adefovirdipivoxil, Tenofoviridisoproxil (als Fumarat), Lamivudin, Ganciclovir, Aciclovir
5	Stavudin, Ciprofloxacin, Fluoxetin, Azithromycin, Valaciclovir, Sertralin, Zalcitabin
6	Interferon alpha-2a, Interferon alpha-2b, pegyliertes Interferon alpha-2b

Spezifität

Die Spezifität wurde mithilfe von 292 frischen und 747 gefrorenen HBV-negativen klinischen Proben bestimmt. Insgesamt wurden 521 Plasma- und 518 Serumproben getestet. Die Spezifität wurde als Prozentsatz der HBV-negativen Proben mit dem Ergebnis „nicht nachgewiesen“ berechnet. In 1038 Proben konnte keine HBV-DNA nachgewiesen werden. Die Spezifität lag bei 99,9 % (1038/1039, 95 % KI: 99,5-100 %).

Tabelle 14: Spezifität in klinischen Plasma- und Serumproben

	Frisches Plasma	Gefrorenes Plasma	Gesamtplasma	Frisches Serum	Gefrorenes Serum	Gesamtserum	Kombiniert
Gültige Replikate (n)	145	376	521	147	371	518	1.039
Nicht nachgewiesen	145	376	521	147	370	517	1.038
Spezifität % (95 %-KI)	100 % (97,4-100)	100 % (99,0-100)	100 % (99,3-100)	100 % (97,5-100)	99,7 % (98,5-100)	99,8 % (98,9-100)	99,9 % (99,5-100)

KI = Konfidenzintervall

Analytische Spezifität

Die mögliche Kreuzreaktivität auf Erreger (Tabelle 15) wurde mit und ohne 4,3 log IE/ml HBV-DNA in HBV-negativem Humanplasma evaluiert. Weder bei bakteriell kontaminierten Plasmaproben noch bei Proben von Patienten, die mit anderen durch Blut übertragenen Erregern infiziert bzw. gegen HBV und Influenza geimpft waren, fanden sich Kreuzreaktivität oder Störungen.

Tabelle 15: Zur Ermittlung der Analysespezifität getestete Erreger

Mikroorganismus/Keim	Quelle	Mikroorganismus/Keim	Quelle
Hepatitis-C-Virus	Klinische Probe	Humanes Herpesvirus Typ 8	Kulturflüssigkeit
Hepatitis-A-Virus	Klinische Probe	Japanische-Enzephalitis-Virus	Aszites
HBV-geimpft	Klinische Probe	Murray-Valley-Enzephalitis-Virus	Zelllysate
HIV-1 und -2	Klinische Probe	St. Louis-Enzephalitis-Virus	Kulturflüssigkeit
Humanes T-Zell-lymphotropes Virus Typ 1 und 2	Klinische Probe	Vacciniavirus	Zelllysate
Parvovirus B19	Klinische Probe	Gelbfieberevirus	Kulturflüssigkeit
Cytomegalievirus	Klinische Probe	<i>Candida albicans</i>	Kultur
Dengue-Virus Typ 1-4	Klinische Probe	<i>Chlamydia trachomatis</i>	Kultur
Epstein-Barr-Virus	Klinische Probe	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Kultur
Grippegeimpft	Klinische Probe	<i>Mycobacterium gordonae</i>	Kultur
Humanes Papillomvirus	Klinische Probe	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	Kultur
Herpes-simplex-Virus Typ 1 und 2	Klinische Probe	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Kultur
Rötelnvirus	Klinische Probe	<i>Propionibacterium acnes</i>	Kultur
Varicella-Zoster-Virus	Klinische Probe	<i>Staphylococcus aureus</i>	Kultur
West-Nil-Virus	Klinische Probe	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Kultur
Humanes BK-Polyomavirus	Zelllysate	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Kultur
Humanes Herpesvirus 6B	Kulturflüssigkeit	<i>Trichomonas vaginalis</i>	Kultur

Wiederholbarkeit bei klinischen Patientenproben

Die Wiederholbarkeit wurde durch Testung von drei Replikaten natürlich infizierter HBV-positiver Plasma- und Serumproben evaluiert. Die mittlere Konzentration und die Standardabweichungen für die getesteten Plasma- und Serumproben werden in Tabellen 16 bzw. 17 gezeigt.

Tabelle 16: Wiederholbarkeit bei klinischen Plasmaproben

Plasmaprobe	Mittlere Konzentration (log IE/ml)	SD
1	2,08	0,09
2	2,98	0,01
3	2,45	0,09
4	2,32	0,06
5	2,58	0,08
6	3,60	0,06
7	3,45	0,04
8	3,95	0,04
9	3,81	0,05
10	4,26	0,03
11	5,65	0,07
12	6,32	0,06
13	6,79	0,06
14	7,40	0,05
15	8,17	0,02

SD = Standardabweichung

Tabelle 17: Wiederholbarkeit bei klinischen Serumproben

Serumprobe	Mittlere Konzentration (log IE/ml)	SD
1	1,93	0,17
2	2,29	0,09
3	2,78	0,05
4	1,98	0,06
5	2,53	0,07
6	3,53	0,06
7	3,38	0,03
8	3,77	0,02
9	3,45	0,17
10	4,26	0,04
11	6,31	0,02
12	5,45	0,04
13	5,74	0,08
14	7,44	0,04
15	8,47	0,03

SD = Standardabweichung

Probenverdünnung mit Probenverdünner

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

Tabelle 18: Probenverdünnung mit Aptima Probenverdünner in Plasma

Verdünnung	Mittlere unverdünnte Konzentration (log IE/ml)	Mittlere angegeben Konzentration ^a (log IE/ml)	Differenz (log IE/ml)
1:3	2,08	1,71	-0,37
	2,98	3,02	0,04
	2,45	2,30	-0,15
	2,32	2,06	-0,26
	2,58	2,46	-0,12
	3,60	3,62	0,02
	3,45	3,36	-0,09
	3,95	3,91	-0,04
	3,81	3,72	-0,09
	4,26	4,24	-0,02
	5,65	5,50	-0,15
	6,32	6,08	-0,24
	6,79	6,40	-0,39
	7,40	7,06	-0,34
	8,17	8,05	-0,12
1:100	8,17	7,82	-0,35
	> 9,00 ^b (10,20 ^c)	10,40	0,20

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

^b Versetzte Patientenprobe.

^c Zielkonzentration, die oberhalb ULoQ liegt.

Tabelle 19: Probenverdünnung mit Aptima Probenverdünner in Serum

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

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

^b Versetzte Patientenprobe.

^c Zielkonzentration, die oberhalb ULoQ liegt.

Methodenkorrelation

Die Leistung des Aptima HBV Quant Assays wurde mit dem eines anderen Assays mit CE-Kennzeichnung und Health Canada-Lizenz verglichen, indem unverdünnte klinische Plasmaproben von Patienten mit HBV-Infektion getestet wurden. Für die in Abbildung 8 dargestellte lineare Regression wurden insgesamt 614 klinische Proben innerhalb des Linearbereichs gemessen, der beiden Assays gemeinsam war.

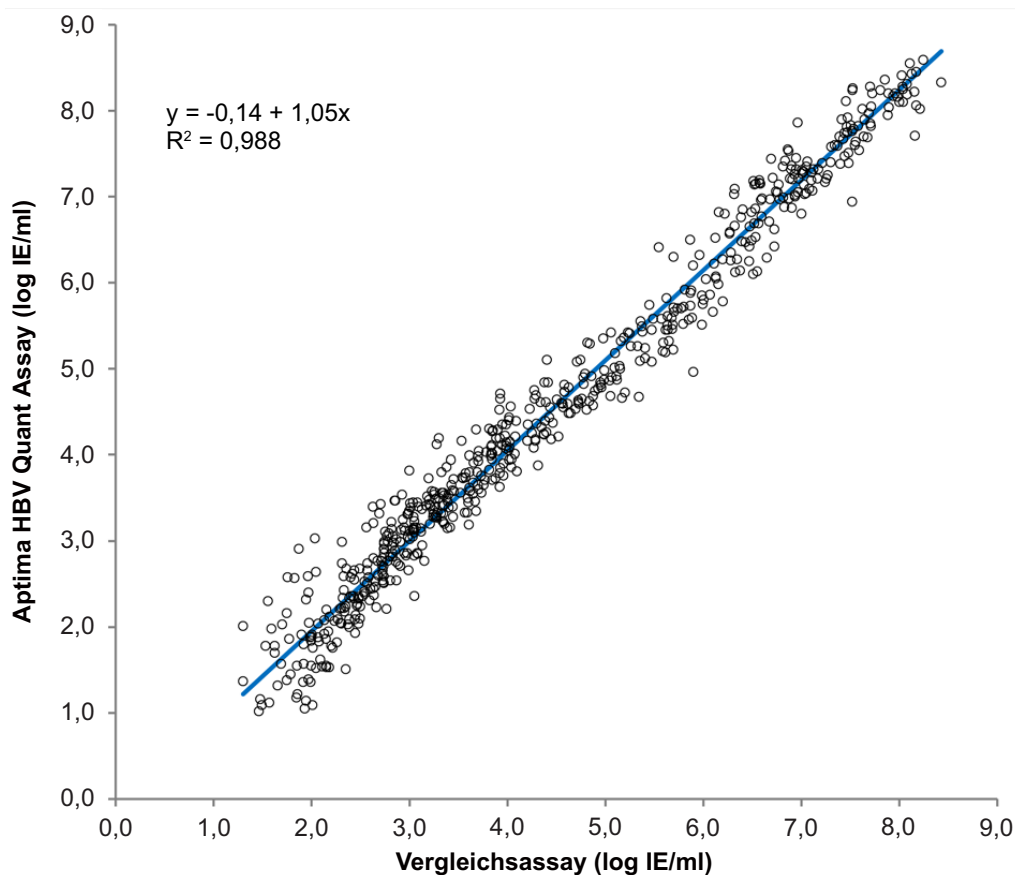


Abbildung 8. Korrelation zwischen dem Aptima HBV Quant Assay und einem Vergleichsassay

Verschleppung

Um festzustellen, ob das Panther System das Risiko falschpositiver Ergebnisse infolge einer verschleppungsbedingten Kontamination minimiert, wurde eine Analytestudie mit mehreren Läufen durchgeführt, bei der versetzte Panels auf drei Panther Systemen getestet wurden. Die Beurteilung der Verschleppung erfolgte anhand von hochtitrigen, mit HBV-DNA versetzten Proben (8 log IE/ml), die im Schachbrettmuster zwischen HBV-negativen Proben verteilt waren. Zur Testung wurden fünfzehn Läufe durchgeführt. Die Gesamtverschleppungsrate betrug 0,0 % (0/705).

Literatur

1. **Lok AS, McMahon BJ.** AASLD Practice Guideline Update. Chronic Hepatitis B: Update 2009. *Hepatology*. 2009; 50(3):661-662;1-36.
2. **Aspinall EJ, Hawkins G, Fraser A, Hutchinson SJ, Goldberg D.** Hepatitis B prevention, diagnosis, treatment and care: a review. *Occupational Medicine* 2011; 61(8):531-540.
3. **Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health.** Early Identification and Linkage to Care of Persons with Chronic Hepatitis B Virus Infection - Three U.S. Sites, 2012-2014. 9. Mai 2014, 63(18);399-401.
4. **Liaw YF, Chu CM.** Hepatitis B virus infection. *Lancet*. 2009;373(9663):582-92.
5. **European Association for the Study of the Liver.** EASL Clinical Practice Guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. *Journal of Hepatology* 2012; 57:167-185.
6. **International Agency for Research on Cancer.** Hepatitis B Virus. IARC Monographs 2012; 100B: 93-133.
7. **Price, J.** An Update on Hepatitis B, D, and E Viruses. *Topics in Antiviral Medicine* 2014; 21(5): 157-163.
8. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2005. Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods; Approved Guideline. CLSI Document MM13-A. Wayne, PA.
9. **29 CFR Part 1910.1030.** Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens; current version.
10. **Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health.** Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL); current version.
11. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2002. Clinical Laboratory Waste Management. CLSI Document GP5-A2. Villanova, PA.
12. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2012. Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline—Second Edition. CLSI Document EP17-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
13. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2003. Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline. CLSI document EP06-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.



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

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

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

Weitere Kontaktinformationen finden Sie unter www.hologic.com.



Hologic N.V.
Da Vincilaan 5
1930 Zaventem
Belgium

Hologic, Aptima und Panther sind Marken und/oder eingetragene Marken von Hologic, Inc. und/oder seinen Tochterunternehmen in den Vereinigten Staaten und/oder anderen Ländern. Alle anderen Marken, die möglicherweise in dieser Packungsbeilage erscheinen, gehören dem jeweiligen Eigentümer.

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

© 2016-2018 Hologic, Inc. Alle Rechte vorbehalten.
AW-13182-801 Rev. 005
2018-03