

Aptima™ HBV Quant Assay

Per uso diagnostico *in vitro*.

Solo per l'esportazione dagli USA

Informazioni generali	2
Utilizzo previsto	2
Riepilogo e spiegazione del test	2
Principi della procedura	3
Avvertenze e precauzioni	4
Requisiti di conservazione e manipolazione dei reagenti	7
Raccolta e conservazione dei campioni	8
Campioni caricati sul Panther System	11
Trasporto dei campioni biologici	11
Panther System	12
Reagenti e materiali forniti	12
Materiali richiesti ma disponibili separatamente	14
Materiali opzionali	15
Procedura di analisi del Panther System	15
Note procedurali	20
Controllo della qualità	21
Calibrazione del test	21
Controlli positivi e negativi	21
Calibratore interno/Controllo interno	21
Interpretazione dei risultati	22
Limiti	22
Prestazioni	23
Limite di rilevamento utilizzando il Terzo Standard Internazionale dell'OMS	23
Limite di rilevamento nei genotipi dell'HBV	24
Range lineare	25
Linearità nei genotipi dell'HBV	26
Limite inferiore di quantificazione utilizzando il Terzo Standard Internazionale dell'OMS	26
Determinazione del limite inferiore di quantificazione (LLoQ) nei genotipi dell'HBV	28
Riproducibilità	30
Sostanze potenzialmente interferenti	32
Specificità	33
Specificità analitica	34
Ripetibilità dei campioni clinici	35
Diluizione dei campioni con il diluente dei campioni	36
Correlazione fra metodi	38
Contaminazione crociata	38
Bibliografia	39

Informazioni generali

Utilizzo previsto

Aptima HBV Quant Assay (Test quantitativo dell'HBV Aptima) è un test di amplificazione degli acidi nucleici *in vitro* per la quantificazione del DNA del virus dell'epatite B (HBV) nel plasma e nel siero umano sul Panther™ System completamente automatico.

Il plasma può essere preparato in acido etilendiamminotetraacetico (EDTA), in una soluzione di acido citrico-citrato-destrosio anticoagulante (ACD) e in provette di preparazione del plasma (PPT). Il siero può essere preparato in provette con siero e in provette con separatore di siero (SST). I campioni biologici vengono analizzati utilizzando Panther System completamente automatico per il trattamento, l'amplificazione, il rilevamento e la quantificazione dei campioni. I campioni biologici contenenti genotipi A, B, C, D, E, F, G e H dell'HBV sono convalidati per la quantificazione nel test.

Il test Aptima HBV Quant Assay è indicato per l'utilizzo come ausilio nella gestione di pazienti affetti da HBV cronica che si sottopongono a una terapia farmacologica antivirale per l'HBV. Il test può essere utilizzato per misurare i livelli di DNA dell'HBV al basale e durante il trattamento come ausilio nella valutazione della risposta del virus al trattamento. I risultati del test Aptima HBV Quant Assay devono essere interpretati all'interno del contesto di tutti i risultati clinici e di laboratorio rilevanti.

Aptima HBV Quant Assay non è realizzato per essere utilizzato come test di screening nel sangue o prodotti ematici per l'HBV o come test diagnostico per confermare la presenza di infezione da HBV.

Riepilogo e spiegazione del test

Il virus dell'epatite B (HBV), uno dei virus noti come causa dell'epatite, è riconducibile a un'infezione da HBV permanente, cirrosi epatica, cancro del fegato, insufficienza epatica e, potenzialmente, decesso. L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) classifica l'HBV come una delle patologie infettive più comuni del mondo. La prevalenza dell'infezione da HBV e il metodo di trasmissione variano notevolmente in tutto il mondo. All'incirca un terzo della popolazione mondiale mostra evidenza sierologica di infezione da HBV progressiva o presente, con patologia di tipo cronico in oltre 350 milioni di persone in tutto il mondo.^{1,2,3} L'infezione da HBV comporta un maggiore rischio di scompenso epatico, cirrosi e carcinoma epatocellulare (HCC) con un tasso di mortalità compreso tra 0,5 e 1,2 milioni di decessi e il 5 – 10% di casi di trapianto di fegato all'anno, a livello mondiale.^{4,5} Senza un trattamento, un intervento e un monitoraggio adeguato dopo la diagnosi, l'incidenza cumulativa di 5 anni di cirrosi è compresa tra l'8 e il 20%. In seguito all'insorgenza di cirrosi, il rischio annuale di carcinoma epatocellulare (HCC) oscilla tra il 2 e il 5%.⁶

L'HBV presenta un genoma a DNA circolare, a doppio filamento parziale, di circa 3200 coppie base che codificano quattro schemi di lettura aperti (ORF) parzialmente sovrapposti che esprimono la polimerasi, la superficie, il precore/core e le proteine X. L'ORF della polimerasi sovrappone gli altri 3 ORF e codifica una proteina chiave della replicazione del virus, la polimerasi. L'ORF della superficie esprime tre proteine essenziali per la morfogenesi del virus, la penetrazione del virus negli epatociti e un'induzione della risposta immunitaria dell'organismo ospite.⁷ Esistono 8 genotipi di HBV (A-H) e si trovano generalmente in distinte zone geografiche. Attualmente, la quantificazione del DNA dell'HBV serve a determinare quali pazienti affetti da infezione cronica sia necessario trattare, per monitorare la risposta alla terapia e valutare rebound della carica virale che potrebbero indicare una resistenza al farmaco.⁵

Aptima HBV Quant Assay è un test di amplificazione dell'acido nucleico *in vitro* che utilizza una tecnologia ad amplificazione mediata da trascrizione (TMA) in tempo reale sul Panther System per quantificare il DNA dell'HBV, i genotipi A, B, C, D, E, F, G e H. Aptima HBV Quant Assay mira a due regioni altamente conservate nella polimerasi e ai geni di superficie (per una maggiore tolleranza alle potenziali mutazioni). Il test è standardizzato al Terzo Standard Internazionale dell'OMS per il virus dell'epatite B (codice NIBSC: 10/264).

Principi della procedura

Aptima HBV Quant Assay prevede tre passaggi principali che si svolgono tutti in un'unica provetta caricata sul Panther System: cattura del target, amplificazione del target tramite TMA e rilevamento dei prodotti dell'amplificazione (amplicone) mediante sonde marcate con composti fluorescenti (torce).

Durante la cattura del target, il DNA virale viene isolato dai campioni biologici. Il campione biologico viene trattato con un detergente per solubilizzare l'envelope virale, denaturare le proteine e rilasciare il DNA genomico virale. Gli oligonucleotidi di cattura ibridizzano con le regioni altamente conservate del DNA dell'HBV, se presente, nel campione biologico analizzato. Il target ibridizzato viene successivamente catturato su microparticelle magnetiche che sono separate dal campione biologico in un campo magnetico. Le fasi di lavaggio servono a rimuovere i componenti esterni dalla provetta di reazione.


L'amplificazione del target avviene tramite TMA, che è un metodo di amplificazione degli acidi nucleici mediato da trascrizione che utilizza due enzimi, la trascrittasi inversa del virus della leucemia murina di Moloney (MMLV) e la polimerasi dell'RNA T7. La trascrittasi inversa viene usata per generare una copia di DNA (contenente una sequenza promotrice della polimerasi dell'RNA T7) della sequenza target. La polimerasi dell'RNA T7 produce copie multiple di amplicone di RNA dal modello della copia di DNA. Aptima HBV Quant Assay utilizza il metodo TMA per amplificare due regioni del genoma dell'HBV (gene della polimerasi e gene di superficie). L'amplificazione di queste regioni viene ottenuta utilizzando specifici primer realizzati per amplificare i genotipi A, B, C, D, E, F, G e H dell'HBV. L'approccio della regione a doppio target con primer che mira alle regioni altamente conservate garantisce un'accurata quantificazione del DNA dell'HBV.

Il rilevamento si ottiene utilizzando torce di acido nucleico monofilamento presenti durante l'amplificazione del target e che ibridizzano specificamente con l'amplicone in tempo reale. Ogni torcia presenta un fluoroforo e un quencher. Quando la torcia non viene ibridizzata con l'amplicone, il quencher è in stretta prossimità del fluoroforo e sopprime la fluorescenza. Quando la torcia si lega all'amplicone, il quencher viene allontanato dal fluoroforo ed emetterà un segnale a una specifica lunghezza d'onda quando eccitato da una sorgente luminosa. Quando più torce ibridizzano con l'amplicone, viene generato un segnale fluorescente più elevato. Il tempo impiegato dal segnale fluorescente per raggiungere una soglia specificata è proporzionale alla concentrazione iniziale di HBV. Ogni reazione presenta un calibratore interno/controllo interno (IC) che controlla le variazioni nel trattamento, nell'amplificazione e nel rilevamento del campione biologico. La concentrazione di un campione viene determinata dal software del Panther System che utilizza i segnali dell'HBV e dell'IC per ogni reazione e che li mette a confronto con le informazioni di calibrazione.

Avvertenze e precauzioni

- A. Solo per uso diagnostico *in vitro*.
- B. Per ridurre il rischio di risultati non validi, leggere attentamente l'intero foglietto illustrativo e il *Panther System Operator's Manual* (Manuale per l'operatore del Panther System) prima di eseguire questo test.
- C. Il reagente di potenziamento per l'amplificazione del target qHBV (Target Enhancer Reagent, TER) è corrosivo. Vedere "Pertinenti al test" a pagina 5 per l'elenco completo delle avvertenze.

**Pertinenti al laboratorio**

- D.  **ATTENZIONE:** i controlli di questo test contengono plasma umano. Il plasma è negativo all'antigene di superficie dell'epatite B (HBsAg), agli anticorpi anti-HCV, agli anticorpi anti-HIV-1 e anti-HIV-2 e all'antigene dell'HIV quando analizzato con le procedure autorizzate dalla US Food and Drug Administration. Inoltre, il plasma non è reattivo al DNA dell'HBV, all'RNA dell'HCV e all'RNA dell'HIV-1 quando analizzato con test degli acidi nucleici autorizzati che utilizzano campioni combinati in pool. Tutti i materiali provenienti dal sangue umano devono essere considerati potenzialmente infettivi ed essere maneggiati rispettando le Precauzioni universali.^{8,9,10}
- E. Solo il personale adeguatamente formato nell'utilizzo di Aptima HBV Quant Assay e nella manipolazione di materiali potenzialmente infettivi deve eseguire questa procedura. Se si verifica un versamento, disinfettare immediatamente seguendo le procedure del centro appropriate.
- F. Usare solo contenitori da laboratorio monouso forniti o indicati in modo specifico come monouso.
- G. Adottare le consuete precauzioni di laboratorio. Non pipettare con la bocca. Non mangiare, bere né fumare nelle aree di lavoro designate. Quando si maneggiano campioni e reagenti del kit, indossare guanti monouso senza talco, occhiali protettivi e camici da laboratorio. Lavarsi accuratamente le mani dopo aver maneggiato campioni e reagenti del kit.
- H. Le superfici di lavoro, le pipette e le altre apparecchiature devono essere decontaminate regolarmente con una soluzione di ipoclorito di sodio al 2,5 – 3,5% (0,35 M – 0,5 M).
- I. Smaltire tutti i materiali che sono entrati in contatto con campioni e reagenti in conformità alle normative nazionali, internazionali e regionali in vigore.^{8,9,10,11} Pulire e disinfettare accuratamente tutte le superfici di lavoro.
- J. I controlli contengono azoturo di sodio come conservante. Non utilizzare tubi metallici per il trasferimento dei reagenti. Se soluzioni contenenti composti dell'azoturo di sodio vengono smaltite in un sistema idraulico, devono essere diluite e scaricate con abbondanti quantità di acqua corrente. Queste precauzioni sono consigliate per evitare l'accumulo di depositi nelle tubazioni metalliche in cui potrebbero svilupparsi condizioni esplosive.

- K. Le buone pratiche standard per i laboratori molecolari includono il monitoraggio ambientale. Per monitorare l'ambiente di un laboratorio, si consiglia la seguente procedura:
1. Munirsi di un bastoncino di ovatta e abbinarlo a una provetta per aliquota di campione (SAT) Aptima.
 2. Etichettare in maniera appropriata ogni SAT.
 3. Riempire ogni SAT con 1 ml di diluente dei campioni Aptima.
 4. Per raccogliere i campioni dalle superfici, inumidire leggermente un bastoncino di ovatta con acqua deionizzata priva di nucleasi.
 5. Passare il bastoncino di ovatta sulla superficie di interesse con un movimento verticale dall'alto verso il basso. Ruotare il bastoncino di ovatta di circa mezzo giro mentre lo si passa sulla superficie.
 6. Collocare immediatamente nella provetta il bastoncino con il campione e roteare delicatamente il bastoncino nel diluente per estrarre gli eventuali materiali prelevati. Premere il bastoncino sul lato della provetta di trasporto per fare fuoriuscire quanto più liquido possibile. Gettare il bastoncino e tappare la provetta.
 7. Ripetere queste fasi per i rimanenti bastoncini con i campioni.
 8. Analizzare il bastoncino con il test molecolare.

Pertinenti ai campioni





- L. I campioni biologici potrebbero essere infettivi. Nell'eseguire questo test, adottare le Precauzioni universali^{8,9,10}. È necessario stabilire metodi di manipolazione e smaltimento adeguati in conformità alle normative nazionali, internazionali e regionali.¹¹ Solo il personale adeguatamente formato nell'utilizzo di Aptima HBV Quant Assay e nella manipolazione di materiali potenzialmente infettivi deve eseguire questa procedura.
- M. Mantenere le corrette condizioni di conservazione durante la spedizione del campione biologico per assicurarne l'integrità. La stabilità del campione in condizioni di spedizione diverse da quelle raccomandate non è stata determinata.
- N. Evitare la contaminazione crociata durante i procedimenti di manipolazione dei campioni biologici. Prestare particolare attenzione a evitare la contaminazione provocata dalla diffusione degli aerosol quando si allentano o si tolgono i tappi dei contenitori dei campioni. I campioni possono contenere livelli di organismi estremamente alti. Assicurarsi che i contenitori dei campioni biologici non vengano in contatto tra di loro ed eliminare i materiali usati senza farli passare sopra i contenitori aperti. Cambiare i guanti se vengono a contatto con i campioni biologici.

Pertinenti al test

- O. Non utilizzare il kit di reagenti, il calibratore o i controlli dopo la data di scadenza.
- P. Non scambiare, mescolare o combinare reagenti del test provenienti da kit con numeri di lotto master diversi. I liquidi del test possono avere numeri di lotto diversi. I controlli e il calibratore possono avere numeri di lotto diversi.
- Q. Evitare la contaminazione microbica e da nucleasi dei reagenti.

- R. Tappare e conservare tutti i reagenti del test alle temperature specificate. L'uso di reagenti conservati in modo improprio può influire sulle prestazioni del test. Consultare *Requisiti di conservazione e manipolazione dei reagenti e Procedura di analisi del Panther System* per maggiori informazioni.
- S. Non combinare reagenti o liquidi del test senza istruzioni specifiche. Non rabboccare i flaconi di reagenti o liquidi. Il Panther System verifica i livelli dei reagenti.
- T. Evitare il contatto del reagente di potenziamento per l'amplificazione del target con la cute, gli occhi e le mucose. In caso di contatto con questo reagente, lavare con acqua. Se si verificano versamenti di reagente, diluire con acqua e seguire le procedure del centro appropriate.
- U. Alcuni reagenti di questo kit riportano, sulle rispettive etichette, delle indicazioni di pericolo e dei simboli di sicurezza.

Nota: la comunicazione dei pericoli riflette le classificazioni delle schede di sicurezza UE (SDS). Per informazioni relative alla comunicazione sui pericoli specifiche per la propria regione, fare riferimento alla scheda SDS specifica della regione nella Raccolta delle schede di sicurezza all'indirizzo www.hologicds.com.


 	<p>HBV VL Kit Controls Azoturo di sodio 0,2% Human Serum 95-100%</p> <p>AVVERTENZA H312 - Nocivo per contatto con la pelle H412 - Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata P273 - Non disperdere nell'ambiente P280 - Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso</p>
 	<p>Target Enhancer Reagent Lithium Hydroxide, Monohydrate 5-10%</p> <p>PERICOLO H302 - Nocivo se ingerito H314 - Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari P260 - Non respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol P280 - Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso P303 + P361 + P353 - IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE (o con i capelli): togliersi di dosso immediatamente tutti gli indumenti contaminati. Sciacquare la pelle/fare una doccia P305 + P351 + P338 - IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. P310 - Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico</p>

Requisiti di conservazione e manipolazione dei reagenti

- A. La seguente tabella mostra le condizioni di conservazione e la stabilità di reagenti, controlli e calibratore.

Reagente	Conservazione a confezione chiusa	Kit aperto (ricostituito)	
		Conservazione	Stabilità
Reagente di amplificazione qHBV	da 2 °C a 8 °C		
Soluzione di ricostituzione amplificazione qHBV	da 2 °C a 8 °C	da 2 °C a 8 °C	30 giorni ^a
Reagente enzimatico qHBV	da 2 °C a 8 °C		
Soluzione di ricostituzione enzimatica qHBV	da 2 °C a 8 °C	da 2 °C a 8 °C	30 giorni ^a
Reagente promotore qHBV	da 2 °C a 8 °C		
Soluzione di ricostituzione promotrice qHBV	da 2 °C a 8 °C	da 2 °C a 8 °C	30 giorni ^a
Reagente di cattura del target qHBV	da 2 °C a 8 °C	da 2 °C a 8 °C	30 giorni ^a
qHBV PCAL (Calibratore positivo)	da -15 °C a -35 °C	da 15 °C a 30 °C	Fiala monouso Utilizzare entro 24 ore
qHBV NC CONTROL – (Controllo negativo)	da -15 °C a -35 °C	da 15 °C a 30 °C	Fiala monouso Utilizzare entro 24 ore
qHBV LPC CONTROL + (Controllo positivo basso)	da -15 °C a -35 °C	da 15 °C a 30 °C	Fiala monouso Utilizzare entro 24 ore
qHBV HPC CONTROL + (Controllo positivo alto)	da -15 °C a -35 °C	da 15 °C a 30 °C	Fiala monouso Utilizzare entro 24 ore
Reagente di potenziamento per l'amplificazione del target qHBV	da 15 °C a 30 °C	da 15 °C a 30 °C	30 giorni ^a

^a Quando i reagenti vengono rimossi dal Panther System, devono essere immediatamente riportati alle loro temperature di conservazione appropriate.

- B. Smaltire qualsiasi reagente ricostituito inutilizzato, il reagente di cattura del target (TCR) e il reagente di potenziamento per l'amplificazione del target (TER) dopo 30 giorni o dopo la data di scadenza del lotto master, a seconda di quale data cada per prima.
- C. I reagenti conservati sul Panther System sono stabili per 72 ore quando sono conservati sullo strumento. I reagenti possono essere caricati nel Panther System fino a 5 volte. Il Panther System registra ogni volta che i reagenti vengono caricati.
- D. Dopo lo scongelamento del calibratore, la soluzione deve essere trasparente, ossia non torbida o con precipitati.
-  E. Il reagente promotore e il reagente promotore ricostituito sono fotosensibili. Proteggere questi reagenti dalla luce durante la conservazione e la preparazione per l'uso.
- F. Il reagente di potenziamento per l'amplificazione del target qHBV deve essere a una temperatura compresa tra 15 °C e 30 °C prima dell'uso.

Raccolta e conservazione dei campioni

Nota: maneggiare tutti i campioni come se contenessero agenti potenzialmente infettivi. Adottare le Precauzioni universali.

Nota: prestare attenzione a evitare la contaminazione crociata durante le fasi di manipolazione dei campioni. Ad esempio, smaltire il materiale utilizzato senza farlo passare sulle provette aperte.

Nota: Per la conservazione si raccomandano solo provette secondarie in plastica.

È possibile utilizzare i campioni di sangue intero raccolti nelle seguenti provette di vetro o di plastica:

- Provette contenenti anticoagulanti EDTA o ACD
- Provette di preparazione del plasma (PPT)
- Provette con siero
- Provette con separatore di siero (SST)

Per il siero, consentire la formazione del coagulo prima dell'ulteriore trattamento.

A. Raccolta dei campioni

Il sangue intero può essere conservato a una temperatura di 2 °C – 30 °C e deve essere centrifugato entro 24 ore dalla raccolta del campione biologico. Separare il plasma o il siero dal pellet di globuli rossi seguendo le istruzioni del produttore della provetta utilizzata. Il plasma o il siero possono essere analizzati sul Panther System direttamente da provetta primaria o essere trasferiti in una provetta secondaria come la provetta per aliquota di campione Aptima. Per ottenere il volume di reazione di 500 µl, il volume minimo suggerito di siero o di plasma per le provette di raccolta primarie è 1200 µl, mentre per le provette secondarie il volume minimo è 700 µl. La seguente tabella identifica i requisiti di volume morto per ciascun tipo di provetta primaria e secondaria.

Provetta (dimensioni e tipo)	Volume morto su Panther
Provetta per aliquota di campione (SAT) Aptima	0,2 ml
12x75 mm	0,5 ml
13x100 mm	0,5 ml
13x100 mm con Gel	0,3 ml
16x100 mm con Gel	0,7 ml

Se non analizzati immediatamente, il plasma e il siero possono essere conservati in conformità alle specifiche riportate in basso. Se trasferiti in una provetta secondaria, il plasma o il siero possono essere congelati a -20 °C. Non superare 3 cicli di congelamento/scongelamento. Non congelare i campioni in provette di raccolta primarie contenenti EDTA, ACD o siero.

B. Condizioni di conservazione dei campioni

1. Campioni di plasma con EDTA e ACD

Il sangue intero può essere conservato a una temperatura di 2 °C – 30 °C e deve essere centrifugato entro 24 ore dalla raccolta del campione biologico. Il plasma può quindi essere conservato in una delle seguenti condizioni:

- Nella provetta di raccolta primaria o nella provetta secondaria a 2 °C – 30 °C per un periodo massimo di 24 ore,
- Nella provetta di raccolta primaria o nella provetta secondaria a 2 °C – 8 °C per un periodo massimo di 5 giorni oppure
- Nella provetta secondaria a -20 °C per un periodo massimo di 60 giorni.

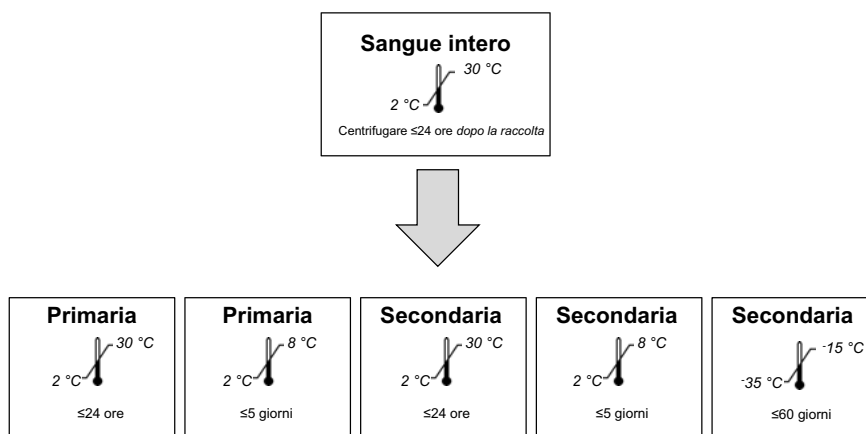


Figura 1. Condizioni di conservazione per le provette contenenti EDTA/ACD

2. Campioni nelle PPT

Il sangue intero può essere conservato a una temperatura di 2 °C – 30 °C e deve essere centrifugato entro 24 ore dalla raccolta del campione biologico. Il plasma può quindi essere conservato in una delle seguenti condizioni:

- Nella PPT o nella provetta secondaria a 2 °C – 30 °C per un periodo massimo di 24 ore,
- Nella PPT o nella provetta secondaria a 2 °C – 8 °C per un periodo massimo di 5 giorni oppure
- Nella PPT o nella provetta secondaria a -20 °C per un periodo massimo di 60 giorni.

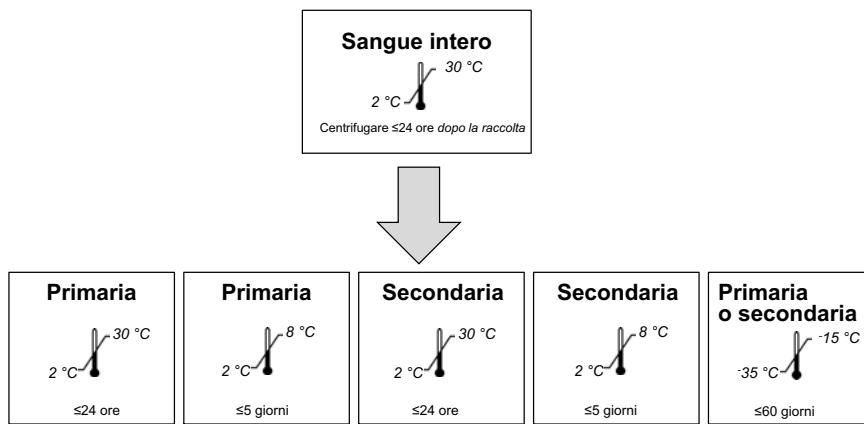


Figura 2. Condizioni di conservazione per le PPT

3. Campioni biologici in provette con siero

Il sangue intero può essere conservato a una temperatura di 2 °C – 30 °C e deve essere centrifugato entro 24 ore dalla raccolta del campione biologico. Il siero può quindi essere conservato in una delle seguenti condizioni:

- Nella provetta del siero o nella provetta secondaria a 2 °C – 30 °C per un periodo massimo di 24 ore oppure
- Nella provetta del siero o nella provetta secondaria a 2 °C – 8 °C per un periodo massimo di 5 giorni oppure
- Nella provetta secondaria a -20 °C per un periodo massimo di 60 giorni.

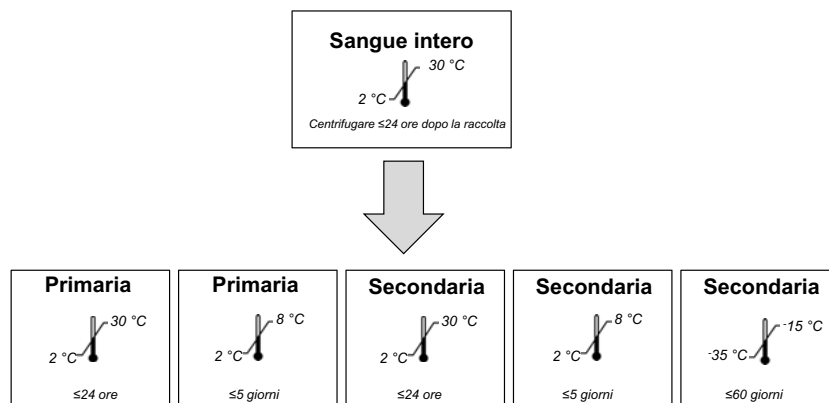


Figura 3. Condizioni di conservazione delle provette contenenti siero

4. Campioni biologici nelle SST

Il sangue intero può essere conservato a una temperatura di 2 °C – 30 °C e deve essere centrifugato entro 24 ore dalla raccolta del campione biologico. Il siero può quindi essere conservato in una delle seguenti condizioni:

- Nella SST o nella provetta secondaria a 2 °C – 30 °C per un periodo massimo di 24 ore,
- Nella SST o nella provetta secondaria a 2 °C – 8 °C per un periodo massimo di 5 giorni oppure
- Nella SST o nella provetta secondaria a -20 °C per un periodo massimo di 60 giorni.

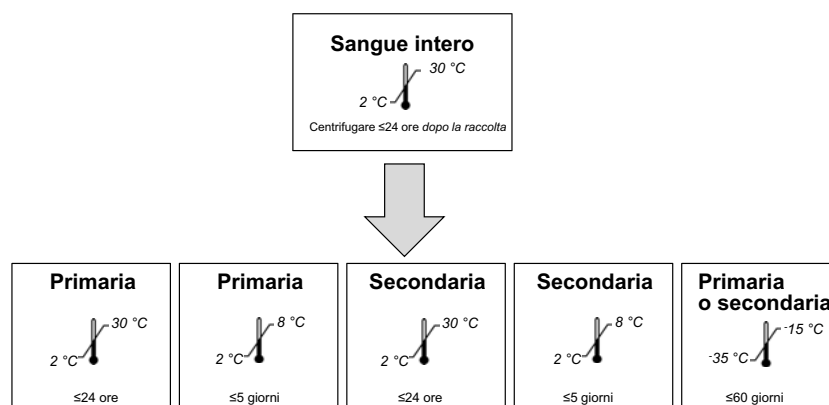


Figura 4. Condizioni di conservazione per le SST

C. Conservazione in congelatore a lungo termine

I campioni di plasma o di siero possono essere conservati a una temperatura compresa tra -65 °C e -85 °C per un periodo massimo di 60 giorni nelle SAT.

D. Diluizione di campioni di plasma e siero

I campioni di plasma e di siero possono essere diluiti nella SAT o in una provetta secondaria per l'analisi con il Panther System. Consultare *Procedura di analisi del Panther System*, paragrafo E "Manipolazione dei campioni biologici", passaggio 6 per maggiori informazioni.

Nota: se un campione biologico viene diluito, deve essere analizzato subito dopo la diluizione. Non congelare un campione biologico diluito.

Campioni caricati sul Panther System

I campioni possono essere lasciati sul Panther System senza tappo per un periodo massimo di 8 ore. I campioni possono essere rimossi dal Panther System ed essere analizzati a condizione che il tempo totale di permanenza sullo strumento non superi le 8 ore prima del pipettaggio del campione da parte del Panther System.

Trasporto dei campioni biologici

Mantenere le condizioni di conservazione dei campioni come descritto in *Raccolta e conservazione dei campioni*.

Nota: i campioni biologici devono essere spediti in conformità alle normative sul trasporto nazionali, internazionali e regionali applicabili.

Panther System

Sono elencati di seguito i reagenti di Aptima HBV Quant Assay per il Panther System. Accanto al nome di ciascun reagente è indicato anche il rispettivo simbolo identificativo.

Reagenti e materiali forniti

Nota: per informazioni sulle dichiarazioni relative a pericoli e precauzioni che possono essere associate ai reagenti, consultare la libreria delle schede dei dati sulla sicurezza reperibile sul sito Web www.hologic.com/sds.

Kit Aptima HBV Quant Assay, 100 test (n. di cat. PRD-03424)

(1 scatola del test, 1 kit calibratore, 1 kit controlli e 1 scatola del reagente di potenziamento per l'amplificazione del target)

Calibratori e controlli aggiuntivi possono essere ordinati separatamente. Vedere qui di seguito i numeri di catalogo individuali.

Scatola Aptima HBV Quant Assay

(alla consegna, conservare a 2 °C – 8 °C)

Simbolo	Componente	Quantità
A	Reagente di amplificazione qHBV <i>Acidi nucleici non infettivi essiccati in soluzione tamponata.</i>	1 flacone
E	Reagente enzimatico qHBV <i>Trascrittasi inversa e polimerasi dell'RNA essiccate in soluzione tamponata HEPES.</i>	1 flacone
PRO	Reagente promotore qHBV <i>Acidi nucleici non infettivi essiccati in soluzione tamponata.</i>	1 flacone
AR	Soluzione di ricostituzione amplificazione qHBV <i>Soluzione acquosa contenente glicerolo e conservanti.</i>	1 x 7,2 ml
ER	Soluzione di ricostituzione enzimatica qHBV <i>Soluzione tamponata HEPES contenente un tensioattivo e glicerolo.</i>	1 x 5,8 ml
PROR	Soluzione di ricostituzione promotrice qHBV <i>Soluzione acquosa contenente glicerolo e conservanti.</i>	1 x 4,5 ml
TCR	Reagente di cattura del target qHBV <i>Acidi nucleici in una soluzione salina tamponata contenente acidi nucleici non infettivi in fase solida e il calibratore interno.</i>	1 x 72,0 ml
	Collari per ricostituzione	3
	Foglio dei codici a barre dei lotti master	1 foglio

Kit calibratore Aptima HBV Quant (n. di cat. PRD-03425)
(alla ricezione, conservare a temperature da -15 °C a -35 °C)

Simbolo	Componente	Quantità
PCAL	Calibratore positivo qHBV <i>Plasmid DNA in soluzione tamponata</i>	5 x 2,5 ml
	Etichetta del codice a barre del calibratore	—

Kit controlli Aptima HBV Quant (n. di cat. PRD-03426)
(alla ricezione, conservare a temperature da -15 °C a -35 °C)

Simbolo	Componente	Quantità
NC	Controllo negativo qHBV <i>Plasma umano defibrinato negativo all'HBV contenente gentamicina e azoturo di sodio allo 0,2% come conservanti.</i>	5 x 0,8 ml
LPC	Controllo positivo basso qHBV <i>Plasma positivo HBV inattivato in plasma umano defibrinato contenente gentamicina e azoturo di sodio allo 0,2% come conservanti.</i>	5 x 0,8 ml
HPC	Controllo positivo alto qHBV <i>Plasma positivo HBV inattivato in plasma umano defibrinato contenente gentamicina e azoturo di sodio allo 0,2% come conservanti.</i>	5 x 0,8 ml
	Etichetta dei codici a barre dei controlli	—

Aptima HBV Quant Scatola del reagente di potenziamento per l'amplificazione del target
(alla ricezione, conservare a temperature da 15 °C a 30 °C)

Simbolo	Componente	Quantità
TER	Reagente di potenziamento per l'amplificazione del target qHBV <i>Una soluzione concentrata di idrossido di litio</i>	1 x 46,0 ml

Materiali richiesti ma disponibili separatamente

Nota: salvo altrimenti specificato, per i materiali resi disponibili da Hologic sono indicati i rispettivi numeri di catalogo.

Materiale	N. di cat.
Panther System	—
Kit sessione analitica Panther System per test in tempo reale (esclusivamente per test in tempo reale)	PRD-03455 (5000 test)
<i>Kit di liquidi per Aptima Assay (noto anche come kit dei liquidi universale) contiene soluzione di lavaggio Aptima, tampone Aptima per liquidi di disattivazione e reagente oleoso Aptima</i>	303014 (1000 test)
<i>Unità multiprovetta (MTU)</i>	104772-02
<i>Kit di sacchetti per rifiuti Panther</i>	902731
<i>Coperchio del contenitore per rifiuti Panther</i>	504405
Oppure Kit sessione analitica Panther System <i>(quando si eseguono test TMA non in tempo reale parallelamente a test TMA in tempo reale) contiene MTU, sacchetti per rifiuti, coperchi del contenitore per i rifiuti, rilevamento automatico e liquidi del test</i>	303096 (5000 test)
Puntali, 1000 µl conduttivi, rilevatori di liquido	10612513 (Tecan)
Candeggina, soluzione di ipoclorito di sodio al 5% – 7% (0,7 M – 1,0 M)	—
Guanti monouso senza talco	—
Tappi di ricambio per reagenti <i>Flaconi di ricostituzione dei reagenti di amplificazione, enzimatici e promotori CL0041 (100 tappi)</i>	
<i>Flacone TCR</i>	CL0040 (100 tappi)
<i>Flacone TER</i>	501604 (100 tappi)
Teli da banco di laboratorio plastificati	—
Panni che non lasciano pelucchi	—
Pipettatore	—
Puntali	—
Opzioni provetta di raccolta primaria:	
<i>13 mm x 100 mm</i>	—
<i>13 mm x 75 mm</i>	—
<i>16 mm x 100 mm</i>	—
Centrifuga	—
Miscelatore vortex	—

Materiali opzionali

Materiale	N. di cat.
Opzioni provetta secondaria:	
12 mm x 75 mm	—
13 mm x 100 mm	—
16 mm x 100 mm	—
<i>Provette per aliquota di campione (SAT) Aptima (confezione da 100)</i>	503762
Tappo per provette di trasporto (confezione da 100) <i>tappo per SAT</i>	504415
Diluyente dei campioni Aptima	PRD-03003
Kit diluyente dei campioni Aptima <i>contiene il diluyente dei campioni, 100 SAT e 100 tappi</i>	PRD-03478
Pipette di trasferimento	—
Pannelli disponibili in commercio; ad esempio: <i>Pannelli HBV di Quality Control for Molecular Diagnostics (QCMD)</i>	—
Bastoncini di ovatta	—
Agitatore oscillante per provette	—

Procedura di analisi del Panther System

Nota: per ulteriori informazioni procedurali, vedere il *Panther System Operator's Manual (Manuale per l'operatore del Panther System)*.

A. Preparazione dell'area di lavoro

1. Pulire le superfici di lavoro dove verranno preparati i reagenti. Passare sulle superfici di lavoro e sui pipettatori una soluzione di ipoclorito di sodio al 2,5% – 3,5% (0,35 M – 0,5 M). Lasciare la soluzione di ipoclorito di sodio a contatto con le superfici per almeno 1 minuto, quindi risciacquare con acqua deionizzata (DI). Non lasciare asciugare la soluzione di ipoclorito di sodio. Coprire la superficie del banco con teli da banco di laboratorio puliti, assorbenti e plastificati.
2. Pulire una superficie di lavoro separata su cui preparare i campioni. Utilizzare la procedura descritta in precedenza (passaggio A.1).
3. Pulire eventuali pipettatori. Utilizzare la procedura di pulizia descritta in precedenza (passaggio A.1).

B. Preparazione del calibratore e dei controlli

Consentire al calibratore e ai controlli di raggiungere una temperatura compresa fra 15 °C e 30 °C prima del trattamento, come indicato di seguito:

1. Togliere il calibratore e i controlli dal luogo in cui sono conservati (da -15 °C a -35 °C) e porli a una temperatura compresa fra 15 °C e 30 °C. Durante l'intero processo di scongelamento, capovolgere delicatamente ciascuna provetta per miscelarla accuratamente. Assicurarsi che il contenuto delle provette sia completamente scongelato prima di utilizzarlo.

Opzione. Le provette di calibratore e controlli possono essere collocate su un agitatore oscillante per essere miscelate accuratamente. Assicurarsi che il contenuto delle provette sia completamente scongelato prima di utilizzarlo.

Nota: non generare schiuma eccessiva quando si capovolgono calibratore e controlli. La schiuma pregiudica la sensibilità di rilevamento dei livelli nel Panther System.

2. Quando il contenuto della provetta si è scongelato, asciugare l'esterno della provetta con un panno monouso pulito e asciutto.
3. Per prevenire la contaminazione, non aprire le provette.

C. Ricostituzione del reagente/preparazione di un nuovo kit

Nota: eseguire la ricostituzione dei reagenti prima di iniziare qualsiasi lavoro sul Panther System.

1. Per preparare il reagente di cattura del target (TCR), procedere nel modo seguente:
 - a. Togliere il TCR dal luogo in cui è conservato (2 °C – 8 °C). Controllare il numero di lotto sul flacone del TCR per assicurarsi che corrisponda al numero di lotto riportato sul foglio dei codici a barre dei lotti master.
 - b. Agitare immediatamente il flacone di TCR in modo vigoroso per 10 volte. Lasciare riscaldare il flacone di TCR a 15 °C – 30 °C per almeno 45 minuti. Durante questo periodo, roteare e capovolgere il flacone di TCR almeno ogni 10 minuti.

Opzione. Il flacone TCR può essere preparato su un agitatore oscillante per provette attenendosi a queste istruzioni: togliere il TCR dal luogo in cui è conservato (2 °C – 8 °C) e agitarlo immediatamente in modo vigoroso per 10 volte. Collocare il flacone di TCR su un agitatore oscillante per provette e lasciare il TCR a riscaldarsi a 15 °C – 30 °C per almeno 45 minuti.

- c. Prima di utilizzarlo, assicurarsi che tutto il precipitato sia in soluzione e che le particelle magnetiche siano in sospensione.
2. Per ricostituire il reagente di amplificazione, il reagente enzimatico e il reagente promotore, procedere nel modo seguente:
 - a. Togliere dal luogo di conservazione (2 °C – 8 °C) i reagenti liofilizzati e le corrispondenti soluzioni di ricostituzione. Abbinare ciascuna soluzione di ricostituzione al rispettivo reagente liofilizzato.
 - b. Assicurarsi che l'etichetta della soluzione di ricostituzione e l'etichetta del reagente liofilizzato abbiano colori corrispondenti. Controllare i numeri di lotto sul foglio dei codici a barre dei lotti master per assicurarsi di abbinare i reagenti appropriati.
 - i. Aprire la fiala di reagente liofilizzato rimuovendo il sigillo metallico e il tappo di gomma.
 - ii. Inserire con decisione sulla fiala l'estremità indentata del collare di ricostituzione (nero) (Figura 5, passaggio 1).
 - iii. Aprire il flacone della soluzione di ricostituzione corrispondente e appoggiare il tappo su una superficie di lavoro pulita e coperta.
 - iv. Appoggiare il flacone con la soluzione di ricostituzione su una superficie stabile (sul banco). Quindi capovolgere la fiala del reagente liofilizzato sul flacone con la soluzione di ricostituzione e fissare saldamente il collare al flacone con la soluzione di ricostituzione (Figura 5, passaggio 2).
 - v. Capovolgere lentamente i flaconi assemblati (fiala fissata al flacone con la soluzione) per consentire alla soluzione di drenare nella fiala di vetro (Figura 5, passaggio 3).
 - vi. Raccogliere i flaconi assemblati e rotearli per almeno 10 secondi (Figura 5, passaggio 4).

- vii. Attendere almeno 30 minuti per permettere al reagente liofilizzato di andare in soluzione.
- viii. Dopo che il reagente liofilizzato è andato in soluzione, roteare i flaconi assemblati per almeno 10 secondi, quindi fare oscillare leggermente avanti e indietro la soluzione all'interno della fiala di vetro per miscelare bene.
- c. Inclinare di nuovo lentamente i flaconi assemblati per consentire a tutta la soluzione di drenare nuovamente nel flacone della soluzione di ricostituzione (Figura 5, passaggio 5).
- d. Rimuovere con cautela il collare di ricostituzione e il flacone di vetro (Figura 5, passaggio 6).
- e. Rimettere il cappuccio sul flacone. Registrare sull'etichetta le iniziali dell'operatore e la data di ricostituzione (Figura 5, passaggio 7).
- f. Rimuovere il collare di ricostituzione e il flacone di vetro (Figura 5, passaggio 8).

Avvertenza: evitare la formazione di schiuma eccessiva durante la ricostituzione dei reagenti. La schiuma pregiudica la sensibilità di rilevamento dei livelli nel Panther System.

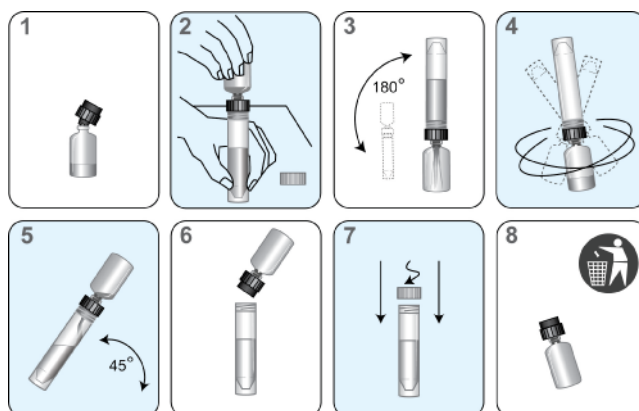


Figura 5. Processo di ricostituzione dei reagenti

- 3. Rimuovere il reagente di potenziamento per l'amplificazione del target qHBV dal luogo di conservazione (15 °C – 30 °C). Registrare sull'etichetta le iniziali dell'operatore e la data di apertura. Controllare il numero di lotto sul flacone del TER per assicurarsi che corrisponda al numero di lotto riportato sul foglio dei codici a barre dei lotti master.
- D. Preparazione di reagenti per i reagenti precedentemente preparati
- 1. Togliere dal luogo di conservazione (a 2 °C – 8 °C) i reagenti precedentemente preparati. I reagenti TCR, di amplificazione, enzimatico e promotore precedentemente preparati devono raggiungere una temperatura compresa fra 15 °C e 30 °C prima dell'avvio del test.
 - 2. Togliere il TER dal luogo in cui è conservato (a 15 °C – 30 °C).
 - 3. Per il TCR precedentemente preparato, eseguire il passaggio C.1 descritto in precedenza, prima di caricarlo sul sistema.

4. Roteare e capovolgere i reagenti di amplificazione, enzimatico e promotore per miscelarli bene prima di caricarli sul sistema. Evitare la formazione di schiuma eccessiva quando si capovolgono i reagenti.
5. Evitare di rabboccare i flaconi dei reagenti. Il Panther System riconosce e rifiuta i flaconi rabboccati.

E. Manipolazione dei campioni biologici

1. Assicurarsi che i campioni lavorati nelle provette primarie o i campioni non diluiti nelle provette secondarie siano stati conservati correttamente secondo quanto indicato in *Raccolta e conservazione dei campioni* a pagina 8.
2. Assicurarsi che i campioni biologici congelati siano scongelati del tutto. Miscelare con vortex i campioni biologici scongelati per 3 – 5 secondi per miscelarli bene.
3. Lasciare che i campioni biologici raggiungano i 15 °C – 30 °C prima di sottoporli al trattamento. Per ulteriori informazioni sul caricamento dei campioni sullo strumento, vedere *Campioni caricati sul Panther System*.
4. Assicurarsi che ciascuna provetta di raccolta primaria contenga fino a un massimo di 1200 µl di campione o che ciascuna SAT contenga almeno 700 µl di campione. Consultare la tabella fornita in *Raccolta dei campioni* a pagina 8 per identificare i requisiti di volume morto per ciascun tipo di provetta primaria e secondaria. Se si rende necessario diluire il campione biologico, per ulteriori informazioni vedere il passaggio E.6 di seguito.
5. Immediatamente prima di caricare i campioni biologici in una rastrelliera campioni, centrifugare ciascun campione a 1000 – 3000g per 10 minuti. Non togliere i tappi. La presenza di bolle nella provetta può pregiudicare il rilevamento del livello di liquido nel Panther System.

Per informazioni su come caricare la rastrelliera e togliere i tappi, vedere *Preparazione del sistema*, passaggio F.2 di seguito.

6. Diluire un campione 1:3 in una SAT o 1:100 in una provetta secondaria.
Un campione può essere diluito in una provetta secondaria per l'analisi con il Panther System.

Nota: se un campione biologico viene diluito, deve essere analizzato subito dopo la diluizione.

a. Diluizione di campioni biologici con volume ridotto

Per portare il volume dei campioni biologici al volume minimo richiesto (700 µl) utilizzare il diluente dei campioni Aptima. I campioni biologici contenenti almeno 240 µl possono essere diluiti nel modo seguente con due parti di diluente dei campioni (1:3):

- i. Trasferire 240 µl di campione biologico nella SAT.
- ii. Aggiungere 480 µl di diluente per campioni Aptima.
- iii. Tappare la provetta.
- iv. Capovolgerla delicatamente 5 volte per miscelarla.

I campioni biologici diluiti 1:3 possono essere analizzati utilizzando l'opzione 1:3 sul Panther System. Per ulteriori informazioni vedere il *Panther System Operator's Manual* (Manuale per l'operatore del Panther System). Il software riporterà automaticamente il risultato per il campione non diluito applicando il fattore di diluizione. Questi campioni biologici saranno segnalati come campioni diluiti.

b. Diluizione di campioni biologici con alto titolo

Se il risultato dell'analisi di un campione biologico è al di sopra del limite superiore di quantificazione (ULoQ), il campione può essere diluito nel modo seguente con 99 parti di diluente dei campioni Aptima (1:100):

- i. Trasferire 30 µl di campione nella SAT o in una provetta secondaria.
- ii. Aggiungere 2970 µl di diluente per campioni Aptima.
- iii. Tappare la provetta.
- iv. Capovolgerla delicatamente 5 volte per miscelarla.

I campioni diluiti 1:100 possono essere analizzati utilizzando l'opzione 1:100 sul Panther System. Per ulteriori informazioni vedere il *Panther System Operator's Manual* (Manuale per l'operatore del Panther System). Il software riporterà automaticamente il risultato per il campione diluito applicando il fattore di diluizione. Questi campioni biologici saranno segnalati come campioni diluiti.

Nota: per i campioni diluiti con concentrazioni di campioni non diluiti maggiori dell'ULoQ, i risultati saranno riportati utilizzando la notazione scientifica.

F. Preparazione del sistema

1. Impostare il sistema in base alle istruzioni fornite nel *Panther System Operator's Manual* (Manuale per l'operatore del Panther System) e in *Note procedurali*. Assicurarsi di utilizzare rastrelliere reagenti e adattatori TCR di dimensioni appropriate.
2. Caricare i campioni nella rastrelliera campioni. Eseguire i seguenti passaggi per ciascuna provetta di campione (campione biologico e, quando necessario, calibratore e controlli):
 - a. Allentare il tappo di una delle provette dei campioni, senza però rimuoverlo.

Nota: prestare particolare attenzione a evitare la contaminazione provocata dalla diffusione degli aerosol. Allentare delicatamente i tappi dei campioni.

- b. Caricare la provetta del campione nella rastrelliera campioni.
- c. Ripetere i passaggi 2.a e 2.b per ciascun campione rimanente.
- d. Dopo che i campioni sono stati caricati nella rastrelliera campioni, rimuovere e gettare tutti i tappi delle provette dei campioni di una rastrelliera campioni. Per evitare la contaminazione, non fare passare i tappi sopra le altre rastrelliere campioni o sopra le provette dei campioni.
- e. Se necessario, utilizzare una pipetta di trasferimento monouso nuova per eliminare eventuali bolle o schiuma.
- f. Dopo aver rimosso l'ultimo tappo, caricare la rastrelliera campioni nello scomparto campioni.

Nota: se contemporaneamente si eseguono altri test e si analizzano altri tipi di campioni, fissare il fermo campioni prima di caricare la rastrelliera campioni nello scomparto campioni.

- g. Ripetere i passaggi da 2.a a 2.f per la successiva rastrelliera campioni.

Note procedurali

A. Calibratore e controlli

1. Le provette del calibratore positivo qHBV, del controllo positivo basso qHBV, del controllo positivo alto qHBV e del controllo negativo qHBV possono essere caricate in una posizione qualsiasi nella rastrelliera campioni e in una corsia qualsiasi dello scomparto campioni sul Panther System. Il pipettaggio dei campioni biologici inizierà quando verrà soddisfatta una delle due seguenti condizioni:
 - a. Il calibratore e i controlli sono in fase di trattamento sul sistema.
 - b. I risultati validi del calibratore e dei controlli sono stati registrati nel sistema.
2. Quando le provette del calibratore e dei controlli sono state pipettate e sono in fase di trattamento per il kit di reagenti del test Aptima HBV Quant Assay, i campioni biologici possono essere analizzati con il kit ricostituito a essi associato per un massimo di 24 ore **a meno che**:
 - a. Il risultato di calibratore o controllo risulti non valido.
 - b. Il kit di reagenti del test associato venga rimosso dal sistema.
 - c. Il kit di reagenti del test associato abbia superato i limiti di stabilità.
3. Ciascuna provetta di calibratore e controllo può essere analizzata solo una volta. Se si tenta di analizzare la provetta più di una volta, è possibile che si verifichino errori di trattamento.

B. Talco dei guanti

Come in qualsiasi sistema di reagenti, il talco eccessivo in alcuni guanti può causare la contaminazione delle provette aperte. Si consigliano guanti privi di talco.

Controllo della qualità

Il risultato di una sessione analitica o di un campione biologico può essere annullato da un operatore se durante l'esecuzione del test si riscontrano problemi tecnici o difficoltà riconducibili all'operatore o allo strumento e tali difficoltà vengono documentate. In questo caso, i campioni biologici devono essere ritestati.

Calibrazione del test

Per generare risultati validi è necessario completare la calibrazione del test. Un singolo calibratore positivo viene analizzato in triplicato tutte le volte che un kit reagenti viene caricato sul Panther System. Una volta stabilita, la calibrazione è valida per un periodo massimo di 24 ore. Il software del Panther System avvisa l'operatore quando è necessario eseguire la calibrazione. L'operatore esegue la scansione di un coefficiente di calibrazione riportato nel foglio dei codici a barre dei lotti master fornito con ciascun kit reagenti.

Durante il trattamento, i criteri per l'accettazione del calibratore vengono verificati automaticamente dal software del Panther System. Se risultano validi meno di due dei replicati del calibratore, il software annulla automaticamente la sessione analitica. I campioni di una sessione analitica annullata devono essere rianalizzati utilizzando calibratore e controlli preparati al momento.

Controlli positivi e negativi

Per generare risultati validi è necessario analizzare un set di controlli del test. È necessario analizzare un replicato del controllo negativo, del controllo positivo basso e del controllo positivo alto tutte le volte che un kit reagenti viene caricato sul Panther System. Una volta stabiliti, i controlli sono validi per un periodo massimo di 24 ore. Il software del Panther System avvisa l'operatore quando è necessario utilizzare i controlli.

Durante il trattamento, i criteri per l'accettazione dei controlli vengono verificati automaticamente dal software del Panther System. Per generare risultati validi, il controllo negativo deve dare un risultato di "Non rilevato" e i controlli positivi devono dare risultati rientranti nei parametri predefiniti (target nominale LPC: 2,7 Log₁₀ IU/ml, target nominale HPC: 4,6 Log₁₀ IU/ml). Se uno qualsiasi dei controlli genera risultati non validi, il software annulla automaticamente la sessione analitica. I campioni di una sessione analitica annullata devono essere rianalizzati utilizzando calibratore e controlli preparati al momento.

Calibratore interno/Controllo interno

Ciascun campione contiene un calibratore interno/controllo interno (IC). Durante il trattamento, i criteri di accettazione IC sono verificati automaticamente dal software del Panther System. Se il risultato IC risulta non valido, il risultato del campione viene annullato. Ciascun campione con un risultato IC non valido deve essere rianalizzato per ottenere un risultato valido.

Il software del Panther System è realizzato per verificare accuratamente i processi quando vengono eseguite procedure attenendosi alle istruzioni fornite in questo foglietto illustrativo e il *Panther System Operator's Manual* (Manuale per l'operatore del Panther System).

Interpretazione dei risultati

Il Panther System determina automaticamente la concentrazione del DNA dell'HBV nei campioni biologici e nei controlli mettendo a confronto i risultati con una curva di calibrazione. Le concentrazioni di DNA dell'HBV vengono riportate in IU/ml e \log_{10} IU/ml. L'interpretazione dei risultati è inclusa nella Tabella 1. Se si usa l'opzione di diluizione per i campioni biologici diluiti, il Panther System calcola automaticamente la concentrazione di HBV per il campione biologico non diluito moltiplicando la concentrazione diluita per il fattore di diluizione e i campioni diluiti vengono contrassegnati come tali.

Nota: per i campioni biologici diluiti, i risultati riportati come "Non rilevato" o "<10 rilevati" possono essere generati diluendo un campione biologico con una concentrazione superiore, ma vicina al LoD o al LLoQ (limite di rilevamento o limite inferiore di quantificazione). Se non si ottiene un risultato quantitativo, si consiglia di raccogliere e analizzare un altro campione biologico non diluito.

Tabella 1: Interpretazione dei risultati

Risultato Aptima HBV Quant Assay riportato		Interpretazione
IU/ml	Valore ^a Log ₁₀	
Non rilevato	Non rilevato	DNA HBV non rilevato.
<10 rilevati	<1,0	Il DNA dell'HBV è stato rilevato, ma a un livello inferiore al LLoQ.
da 10 a 1.000.000.000	da 1,0 a 9,0	La concentrazione di DNA dell'HBV rientra nel range lineare compreso fra 10 e 1.000.000.000 IU/ml.
>1.000.000.000	>9,0	La concentrazione di DNA dell'HBV è superiore all'ULoQ.
Non valido ^b	Non valido ^b	Si è verificato un errore nella generazione del risultato. Il campione biologico deve essere rianalizzato.

^a Il valore viene troncato a due cifre decimali.

^b I risultati non validi vengono visualizzati in blu.

Nota: per i campioni diluiti con concentrazioni di campioni non diluiti maggiori dell'ULoQ, i risultati saranno riportati utilizzando la notazione scientifica.

Limiti

- L'uso di questo test va limitato al personale che è stato addestrato nella relativa procedura. La mancata osservanza delle istruzioni fornite in questo foglietto illustrativo può determinare risultati erranei.
- L'affidabilità dei risultati è subordinata alla raccolta, al trasporto, alla conservazione e al trattamento adeguati del campione.
- Sebbene siano rare, le mutazioni all'interno delle regioni altamente conservate del genoma virale coperto dai primer e/o le sonde nel test Aptima HBV Quant Assay potrebbero comportare una quantificazione inferiore del virus o un errore nel rilevamento di quest'ultimo.

Prestazioni

Limite di rilevamento utilizzando il Terzo Standard Internazionale dell'OMS

Si definisce limite di rilevamento (LoD) la concentrazione di DNA dell'HBV rilevata con una probabilità del 95% o maggiore in conformità alle linee guida CLSI EP17-A2.¹²

Il LoD è stato determinato analizzando pannelli che consistevano di diluizioni del Terzo Standard Internazionale dell'OMS per il DNA del virus dell'epatite B (NIBSC 10/264) in plasma e siero umano negativi all'HBV. Un minimo di 36 replicati di ciascuna diluizione è stato analizzato con ciascuno dei tre lotti di reagenti per un minimo di 108 replicati per ciascuna diluizione. È stata eseguita l'analisi Probit per generare i limiti di rilevamento previsti. I valori LoD mostrati nella Tabella 2 sono i risultati del lotto di reagenti con il limite di rilevamento previsto più alto. Il LoD per l'Aptima HBV Quant Assay utilizzando il Terzo Standard Internazionale dell'OMS è 5,58 IU/ml per il plasma e 4,29 IU/ml per il siero.

Tabella 2: Limite di rilevamento utilizzando il Terzo Standard Internazionale dell'OMS per l'HBV

Limite di rilevamento previsto	Concentrazione (IU/ml)	
	Plasma	Siero
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

Limite di rilevamento nei genotipi dell'HBV

Il LoD è stato determinato analizzando le diluizioni dei campioni clinici positivi all'HBV per i genotipi A, B, C, D, E, F, G e H in plasma e siero umano negativi all'HBV. Le concentrazioni sono state determinate utilizzando un test di confronto con marcatura CE e licenza Health Canada. Un minimo di 24 replicati di ogni elemento del pannello è stato analizzato con ciascuno dei due lotti di reagenti per un minimo di 48 replicati per ogni elemento del pannello. L'analisi Probit è stata eseguita per generare limiti di rilevamento previsti del 50% e 95%. I valori LoD mostrati nella Tabella 3 sono i risultati del lotto di reagenti con il limite di rilevamento previsto più alto.

Tabella 3: Limite di rilevamento nei genotipi dell'HBV utilizzando campioni biologici clinici

Genotipo	Limite di rilevamento previsto	Concentrazione (IU/ml)	
		Plasma	Siero
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

Range lineare

Il range lineare è stato stabilito analizzando pannelli di DNA dell'HBV diluito in plasma e siero umani negativi all'HBV in conformità alle linee guida CLSI EP06-A.¹³ La concentrazione dei pannelli era compresa fra 0,86 log IU/ml e 9,26 log IU/ml. Aptima HBV Quant Assay ha dimostrato linearità nel range analizzato con un limite superiore di quantificazione (ULoQ) di 9 log IU/ml come mostrato nella Figura 6.

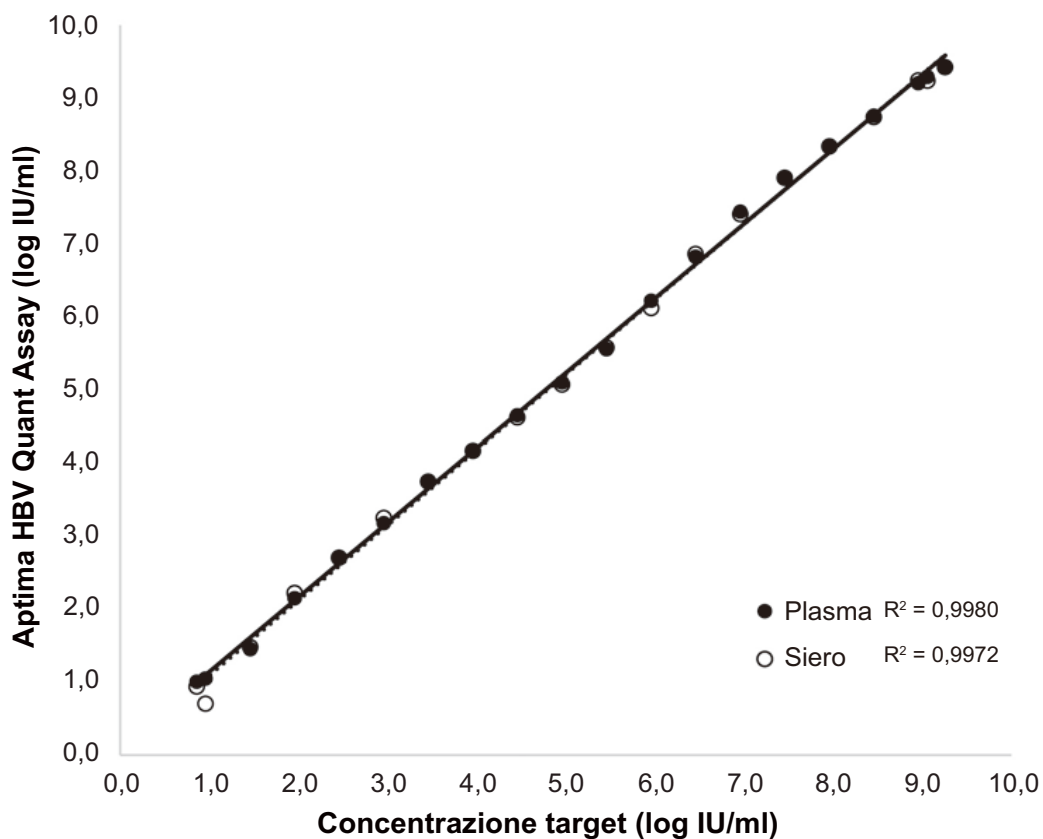


Figura 6. Linearità nel plasma e nel siero

Linearità nei genotipi dell'HBV

La risposta lineare per i genotipi A, B, C, D, E, F, G e H è stata confermata dall'analisi dei pannelli costituiti da DNA dell'HBV diluito in tampone a concentrazioni comprese fra 1,44 log IU/ml e 8,44 log IU/ml. La linearità è stata dimostrata nel range testato per tutti i genotipi analizzati come illustrato nella Figura 7.

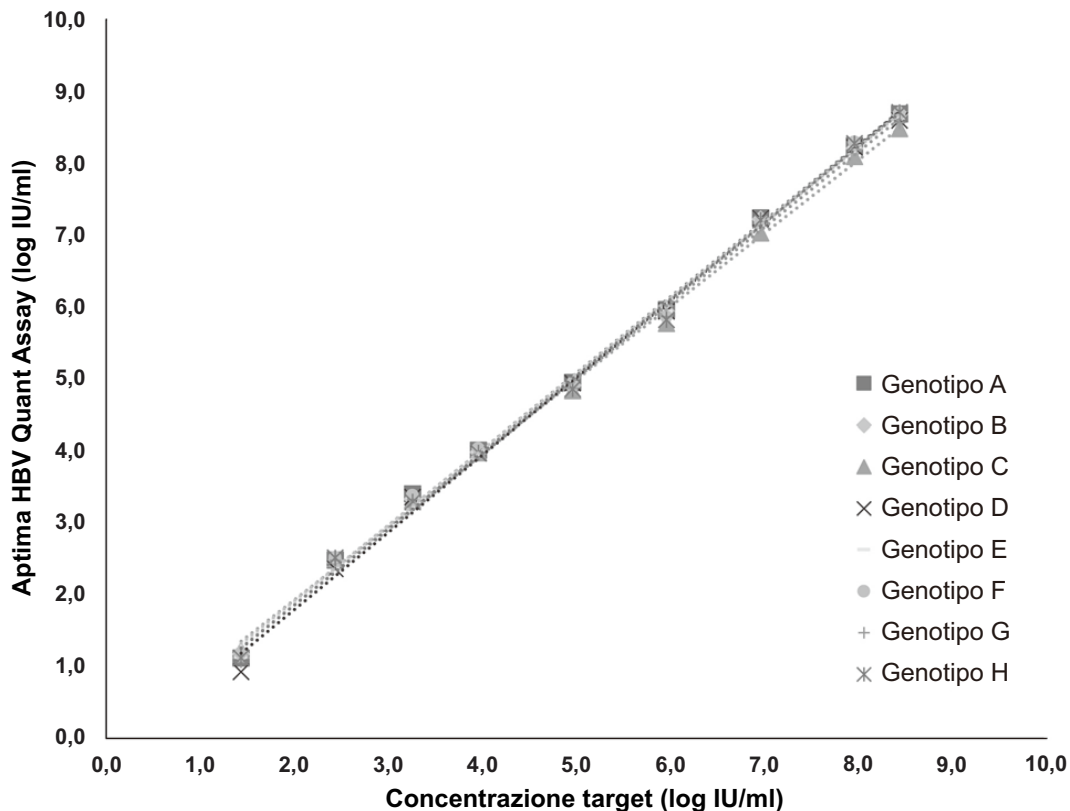


Figura 7. Linearità nei genotipi dell'HBV da A ad H

Limite inferiore di quantificazione utilizzando il Terzo Standard Internazionale dell'OMS

Si definisce limite inferiore di quantificazione (LLoQ) la concentrazione più bassa alla quale il DNA dell'HBV viene quantificato in modo affidabile nei limiti di un errore totale in conformità alle linee guida CLSI EP17-A2.¹² L'errore totale è stato calcolato tramite due metodi: Errore totale analitico (TAE) = |bias| + 2DS ed Errore totale (TE) = SQRT(2) x 2DS. Per garantire l'accuratezza e la precisione delle misurazioni, l'errore totale di Aptima HBV Quant Assay è stato impostato a 1 log IU/ml (vale a dire che al LLoQ, la differenza tra due misurazioni di più di 1 log IU/ml ha significatività statistica).

Il LLoQ è stato determinato analizzando pannelli che consistevano di diluizioni del Terzo Standard Internazionale dell'OMS per l'RNA del virus dell'epatite B (NIBSC 10/264) in plasma e siero umano negativi all'HBV. Un minimo di 45 replicati di ciascuna diluizione è stato analizzato con ciascuno dei tre lotti di reagenti per un minimo di 135 replicati per ciascuna diluizione. I risultati dei tre lotti di reagenti sono mostrati nella Tabella 4 per quanto riguarda il plasma e nella Tabella 5 per quanto riguarda il siero. I risultati per la concentrazione minima osservata che ha soddisfatto l'obiettivo di accuratezza (TE ≤ 1 log IU/ml e TAE ≤ 1 log IU/ml) con un rilevamento del 100% sono ombreggiati in entrambe le tabelle e riepilogati nella Tabella 6.

Il LLoQ calcolato per il Terzo Standard Internazionale dell'OMS per il virus dell'epatite B è pari a 4,80 IU/ml per il plasma e 6,34 IU/ml per il siero e si basa sulla concentrazione più elevata calcolata fra i tre lotti di reagente. Per il plasma, poiché il LLoQ calcolato è inferiore al LoD calcolato pari a 5,58 IU/ml, il LLoQ per il plasma è pari a 5,58 IU/ml per il Terzo Standard Internazionale dell'OMS, in conformità a EP 17-A2.

Tabella 4: Determinazione di LLoQ utilizzando il Terzo Standard Internazionale dell'OMS per l'HBV diluito nel plasma

Lotto reagenti	Concentrazione target		Aptima HBV Quant (log IU/ml)	DS (log IU/ml)	Bias (log IU/ml)	TE calcolato (log IU/ml)	TAE calcolato (log IU/ml)
	(IU/ml)	(log IU/ml)					
1	7	0,85	0,63	0,27	0,22	0,75	0,75
	8	0,90	0,68	0,28	0,22	0,78	0,77
	9	0,95	0,79	0,25	0,17	0,70	0,66
2	7	0,85	0,48	0,20	0,37	0,57	0,77
	8	0,90	0,47	0,18	0,44	0,51	0,79
	9	0,95	0,61	0,19	0,34	0,54	0,73
3	7	0,85	0,53	0,21	0,32	0,59	0,74
	8	0,90	0,52	0,21	0,38	0,61	0,81
	9	0,95	0,70	0,23	0,25	0,65	0,71

DS = deviazione standard

Tabella 5: Determinazione di LLoQ utilizzando il Terzo Standard Internazionale dell'OMS per l'HBV diluito nel siero

Lotto reagenti	Concentrazione target		Aptima HBV Quant (log IU/ml)	DS (log IU/ml)	Bias (log IU/ml)	TE calcolato (log IU/ml)	TAE calcolato (log IU/ml)
	(IU/ml)	(log IU/ml)					
1	7	0,85	0,77	0,38	0,08	1,06	0,83
	8	0,90	0,80	0,31	0,10	0,88	0,72
	9	0,95	0,91	0,27	0,05	0,77	0,59
2	7	0,85	0,57	0,20	0,28	0,57	0,68
	8	0,90	0,70	0,22	0,20	0,63	0,64
	9	0,95	0,69	0,23	0,27	0,66	0,73
3	7	0,85	0,65	0,24	0,20	0,67	0,67
	8	0,90	0,65	0,24	0,25	0,68	0,73
	9	0,95	0,67	0,22	0,28	0,63	0,73

DS = deviazione standard

Tabella 6: Riepilogo del LLoQ calcolato utilizzando il Terzo Standard Internazionale dell'OMS per l'HBV

Lotto reagenti	LLoQ plasma		LLoQ siero	
	(log IU/ml)	(IU/ml)	(log IU/ml)	(IU/ml)
1	0,68	4,80	0,80	6,34
2	0,61	4,09	0,57	3,72
3	0,52	3,34	0,65	4,51

DS = deviazione standard

Determinazione del limite inferiore di quantificazione (LLoQ) nei genotipi dell'HBV

Il LLoQ è stato determinato analizzando le diluizioni dei campioni clinici positivi all'HBV per i genotipi A, B, C, D, E, F, G e H in plasma e siero umano negativi all'HBV. Un minimo di 36 replicati di ogni elemento del pannello è stato analizzato con ciascuno dei due lotti di reagenti per un minimo di 72 replicati per ogni elemento del pannello. I risultati del lotto di reagenti con la concentrazione più elevata che soddisfa l'obiettivo di accuratezza ($TE \leq 1 \log \text{ IU/ml}$ e $TAE \leq 1 \log \text{ IU/ml}$) con un rilevamento del 100% sono mostrati nella Tabella 7 per quanto riguarda il plasma e nella Tabella 8 per quanto riguarda il siero. I risultati per la concentrazione minima che ha soddisfatto l'obiettivo di accuratezza con un rilevamento del 100% sono ombreggiati in entrambe le tabelle e riepilogati nella Tabella 9. Il LLoQ calcolato per i genotipi A, B, C, D, E, F, G e H nel plasma e nel siero sono riepilogati nella Tabella 9. Questo stabilisce che il LLoQ complessivo per il test è 10 IU/ml.

Tabella 7: Determinazione del LLoQ nei genotipi nel plasma

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

DS = deviazione standard

Tabella 8: Determinazione del LLoQ nei genotipi nel siero

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

DS = deviazione standard

Tabella 9: Riepilogo del LLoQ nei genotipi nel plasma e nel siero

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

Riproducibilità

Per valutare la riproducibilità è stato realizzato un pannello di 28 elementi diluendo campioni clinici positivi all'HBV (genotipo A e C) o correggendo il DNA dell'HBV (genotipo A e C) nel plasma e nel siero negativi all'HBV. Il pannello è stato analizzato da tre operatori utilizzando tre lotti di reagenti su tre Panther System nell'arco di 20 o più giorni.

La Tabella 10 e la Tabella 11 mostrano la riproducibilità dei risultati del test (in log IU/ml) tra gli strumenti, tra gli operatori, tra i lotti, tra le sessioni analitiche, all'interno delle sessioni analitiche e complessiva. La variabilità totale è dovuta alla variabilità all'interno della sessione analitica (ossia errore casuale).

Tabella 10: Riproducibilità di Aptima HBV Quant Assay per il genotipo A

Matrice	N	Concentrazione media (log IU/ml)	Tra operatori		Fra strumenti		Tra lotti		Tra sessioni analitiche		Nella sessione analitica		Totale	
			DS	CV (%)	DS	CV (%)	DS	CV (%)	DS	CV (%)	DS	CV (%)	DS	CV (%)
Plasma	161	1,24	0,02	1,96	0,02	1,75	0,10	7,88	0,02	1,50	0,21	16,80	0,23	18,80
Plasma	162	1,97	0,01	0,75	0,01	0,71	0,08	3,84	0,02	0,76	0,14	7,36	0,17	8,40
Plasma	162	3,23	0,01	0,29	0,01	0,24	0,04	1,39	0,01	0,22	0,08	2,47	0,09	2,87
Plasma	162	4,14	0,03	0,76	0,01	0,28	0,04	0,90	0,01	0,15	0,06	1,38	0,08	1,84
Plasma	162	5,75	0,02	0,39	0,01	0,20	0,06	0,97	0,01	0,13	0,09	1,51	0,11	1,85
Plasma	162	6,98	0,05	0,79	0,03	0,48	0,06	0,91	0,01	0,11	0,09	1,35	0,13	1,87
Plasma	162	7,69	0,03	0,38	0,02	0,23	0,01	0,15	0,01	0,12	0,10	1,30	0,11	1,39
Siero	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
Siero	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
Siero	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
Siero	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
Siero	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
Siero	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
Siero	162	7,48	0,05	0,62	0,03	0,36	0,02	0,25	0,02	0,23	0,08	1,09	0,10	1,35

CV = coefficiente di variazione, DS = deviazione standard

Nota: la variabilità da alcuni fattori potrebbe risultare numericamente negativa, il che può verificarsi se la variabilità dovuta a quei fattori è molto piccola. Quando ciò si verifica, i valori DS e CV sono uguali a 0.

Tabella 11: Riproducibilità di Aptima HBV Quant Assay per il genotipo C

Matrice	N	Concentrazione media (log IU/ml)	Tra operatori		Fra strumenti		Tra lotti		Tra sessioni analitiche		Nella sessione analitica		Totale	
			DS	CV (%)	DS	CV (%)	DS	CV (%)	DS	CV (%)	DS	CV (%)	DS	CV (%)
Plasma	161	1,28	0,02	1,73	0,02	1,40	0,07	5,39	0,02	1,28	0,18	14,32	0,20	15,52
Plasma	162	1,98	0,02	0,79	0,01	0,68	0,08	4,02	0,01	0,61	0,14	6,91	0,16	8,08
Plasma	162	3,23	0,01	0,31	0,01	0,39	0,05	1,49	0,01	0,18	0,06	1,97	0,08	2,52
Plasma	162	4,13	0,01	0,18	0,01	0,29	0,04	0,90	0,01	0,15	0,07	1,69	0,08	1,95
Plasma	162	5,78	0,01	0,14	0,02	0,41	0,06	1,04	0,01	0,16	0,10	1,70	0,12	2,05
Plasma	162	6,83	0,01	0,20	0,03	0,42	0,03	0,42	0,01	0,08	0,06	0,93	0,08	1,13
Plasma	162	7,75	0,03	0,33	0,02	0,19	0,02	0,24	0,01	0,08	0,07	0,94	0,08	1,04
Siero	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
Siero	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
Siero	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
Siero	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
Siero	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
Siero	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
Siero	162	7,23	0,04	0,55	0,02	0,25	0,05	0,68	0,01	0,13	0,10	1,42	0,12	1,69

CV = coefficiente di variazione, DS = deviazione standard

Nota: la variabilità da alcuni fattori potrebbe risultare numericamente negativa, il che può verificarsi se la variabilità dovuta a quei fattori è molto piccola. Quando ciò si verifica, i valori DS e CV sono uguali a 0.

Sostanze potenzialmente interferenti

È stata valutata la suscettibilità di Aptima HBV Quant Assay a interferenza da livelli elevati di sostanze endogene o da farmaci comunemente prescritti ai soggetti con infezione da HBV. Sono stati analizzati campioni di plasma negativi all'HBV e campioni corretti con HBV a una concentrazione di 4,3 log IU/ml di DNA dell'HBV.

Non è stata osservata interferenza nelle prestazioni in presenza di albumina (90 mg/ml), emoglobina (5 mg/ml), trigliceridi (30 mg/ml) o bilirubina non coniugata (0,2 mg/ml).

Campioni di plasma clinici di pazienti con elevati livelli di sostanze definite o di pazienti affetti dalle patologie elencate nella Tabella 12 sono stati analizzati con Aptima HBV Quant Assay. Non è stata osservata interferenza nelle prestazioni del test.

Tabella 12: Tipi di campioni clinici testati

Tipi di campioni clinici	
1	Anticorpo antinucleare (ANA)
2	Fattore reumatoide (RF)
3	Cirrosi alcolica (AC)
4	Epatite alcolica
5	Epatite non alcolica
6	Epatite autoimmune
7	Alanina aminotransferasi (ALT) elevata
8	Carcinoma epatocellulare (HCC)
9	Sclerosi multipla (MS)
10	Lupus eritematoso sistemico (SLE)
11	Iperglobulinemia
12	Artrite reumatoide (RA)
13	Anticorpo anti-Jo-1 (JO-1)
14	Mieloma multiplo (MM)
15	Emolizzati (emoglobina elevata)
16	Itterici (bilirubina elevata)
17	Lipemici (lipidi elevati)
18	Proteina elevata
19	Anticorpi HBV (vaccinazione)
20	Anticorpi HCV
21	Anticorpi HIV-1 e HIV-2

Non è stata osservata interferenza nelle prestazioni del test in presenza delle sostanze esogene elencate nella Tabella 13 a concentrazioni almeno tre volte superiori a C_{max} (plasma umano).

Tabella 13: Sostanze esogene

Pool di sostanze esogene	Sostanze esogene analizzate
1	Saquinavir, ritonavir, amprenavir, indinavir, lopinavir, nelfinavir mesilato
2	Claritromicina, valganciclovir cloridrato, efavirenz, nevirapina
3	Paroxetina HCl, enfuvirtide, zidovudina, didanosina, abacavir solfato
4	Ribavirin, entecavir, adefovir dipivoxil, tenofovir disoproxil fumarato, lamivudina, ganciclovir, acyclovir
5	Stavudina, ciprofloxacina, fluoxetina, azitromicina, valacyclovir, sertralina, zalcitabina
6	Interferone alfa-2a, interferone alfa-2b, interferone alfa-2b pegilato

Specificità

La specificità è stata determinata utilizzando 292 campioni clinici negativi all'HBV appena preparati e 747 campioni clinici negativi all'HBV congelati. È stato analizzato un totale di 521 campioni di plasma e 518 campioni di siero. La specificità è stata calcolata come percentuale di campioni negativi all'HBV con risultati di "Non rilevato". DNA HBV non rilevato in 1038 campioni. La specificità è stata del 99,9% (1038/1039, IC 95%: 99,5-100%).

Tabella 14: Specificità nei campioni clinici di plasma e di siero

	Plasma appena preparato	Plasma congelato	Plasma totale	Siero appena preparato	Siero congelato	Siero totale	Combinato
Replicati validi (n)	145	376	521	147	371	518	1.039
Non rilevato	145	376	521	147	370	517	1.038
Specificità (IC 95%)	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)

IC = intervallo di confidenza

Specificità analitica

La potenziale reattività crociata con i patogeni elencati nella Tabella 15 è stata valutata nel plasma umano negativo all'HBV in presenza o assenza di 4,3 log IU/ml di DNA dell'HBV. Non è stata osservata alcuna reattività crociata o interferenza nel plasma contaminato con batteri o in campioni di soggetti infetti da altri patogeni trasmissibili tramite il sangue o che erano stati vaccinati contro HBV e influenza.

Tabella 15: Patogeni analizzati per la specificità analitica

Microrganismo/ Agente patogeno	Origine	Microrganismo/ Agente patogeno	Origine
Virus dell'epatite C	Campione clinico	Herpes virus umano di tipo 8	Liquido di coltura
Virus dell'epatite A	Campione clinico	Virus dell'encefalite giapponese	Liquido ascitico
Vaccinazione HBV	Campione clinico	Virus dell'encefalite di Murray Valley	Lisato cellulare
HIV-1 e HIV-2	Campione clinico	Virus dell'encefalite di St. Louis	Liquido di coltura
Virus T-linfotropico umano di tipo 1 e 2	Campione clinico	Vaccinia virus	Lisato cellulare
Parvovirus B19	Campione clinico	Virus della febbre gialla	Liquido di coltura
Citomegalovirus	Campione clinico	<i>Candida albicans</i>	Coltura
Virus Dengue di tipo 1-4	Campione clinico	<i>Chlamydia trachomatis</i>	Coltura
Virus di Epstein-Barr	Campione clinico	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Coltura
Vaccinazione antinfluenzale	Campione clinico	<i>Mycobacterium gordonae</i>	Coltura
Papillomavirus umano	Campione clinico	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	Coltura
Virus dell'herpes simplex 1 e 2	Campione clinico	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Coltura
Rubivirus	Campione clinico	<i>Propionibacterium acnes</i>	Coltura
Virus varicella zoster	Campione clinico	<i>Staphylococcus aureus</i>	Coltura
Virus del Nilo occidentale	Campione clinico	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Coltura
Poliomavirus umano BK	Lisato cellulare	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Coltura
Herpes virus umano 6B	Liquido di coltura	<i>Trichomonas vaginalis</i>	Coltura

Ripetibilità dei campioni clinici

La ripetibilità è stata valutata analizzando tre replicati di campioni clinici di plasma e siero positivi all'HBV infettati naturalmente. La concentrazione media e la deviazione standard dei campioni di plasma e siero analizzati sono riportate nelle Tabelle 16 e 17, rispettivamente.

Tabella 16: Ripetibilità dei campioni di plasma clinici

Campione di plasma	Concentrazione media (log IU/ml)	DS
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

DS = deviazione standard

Tabella 17: Ripetibilità dei campioni di siero clinici

Campione di siero	Concentrazione media (log IU/ml)	DS
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

DS = deviazione standard

Diluizione dei campioni con il diluente dei campioni

Per valutare il recupero del DNA dell'HBV nei campioni diluiti con il diluente dei campioni Aptima, i campioni di plasma e di siero che rientravano nel range lineare sono stati diluiti 1:3 con il diluente dei campioni Aptima. Inoltre, i campioni clinici infettati naturalmente con alto titolo e i campioni corretti con DNA dell'HBV con concentrazioni superiori all'ULoQ sono stati diluiti 1:100 con il diluente dei campioni Aptima. Ogni campione è stato analizzato non diluito e diluito (1:3 o 1:100) in triplicato. Le differenze tra la concentrazione media riportata (fattore di diluizione applicato al risultato del campione diluito) e la concentrazione media del campione non diluito sono indicate nella Tabella 18 per il plasma e nella Tabella 19 per il siero. Le concentrazioni dei campioni sono state accuratamente recuperate nei campioni diluiti.

Tabella 18: Diluizione dei campioni con il diluente dei campioni Aptima nel plasma

Diluizione	Concentrazione media del campione non diluito (log IU/ml)	Concentrazione media riportata ^a (log IU/ml)	Differenza (log IU/ml)
1:3	2,08	1,71	-0,37
	2,98	3,02	0,04
	2,45	2,30	-0,15
	2,32	2,06	-0,26
	2,58	2,46	-0,12
	3,60	3,62	0,02
	3,45	3,36	-0,09
	3,95	3,91	-0,04
	3,81	3,72	-0,09
	4,26	4,24	-0,02
	5,65	5,50	-0,15
	6,32	6,08	-0,24
	6,79	6,40	-0,39
	7,40	7,06	-0,34
8,17	8,05	-0,12	
1:100	8,17	7,82	-0,35
	>9,00 ^b (10,20 ^c)	10,40	0,20

^a La concentrazione riportata è il valore calcolato dopo che è stato applicato il fattore di diluizione.

^b Campione biologico corretto.

^c Valore di concentrazione target, superiore all'ULoQ.

Tabella 19: Diluizione dei campioni con il diluente dei campioni Aptima nel siero

Diluizione	Concentrazione media del campione non diluito (log IU/ml)	Concentrazione media riportata ^a (log IU/ml)	Differenza (log IU/ml)
1:3	1,93	1,50	-0,43
	2,29	2,00	-0,29
	2,78	2,45	-0,33
	1,98	1,50	-0,48
	2,53	2,23	-0,30
	3,53	3,59	0,06
	3,38	3,21	-0,17
	3,77	3,68	-0,09
	3,45	3,35	-0,10
	4,26	4,16	-0,10
	6,31	5,98	-0,33
	5,45	5,24	-0,21
	5,74	5,62	-0,12
	7,44	7,19	-0,25
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 La concentrazione riportata è il valore calcolato dopo che è stato applicato il fattore di diluizione.

^b Campione biologico corretto.

^c Valore di concentrazione target, superiore all'ULoQ.

Correlazione fra metodi

Le prestazioni di Aptima HBV Quant Assay sono state valutate mediante un test di confronto con marcatura CE e licenza Health Canada analizzando campioni clinici non diluiti di pazienti affetti da HBV. Per la regressione lineare è stato utilizzato un totale di 614 campioni clinici nell'ambito del range lineare comune a entrambi i test, come mostrato nella Figura 8.

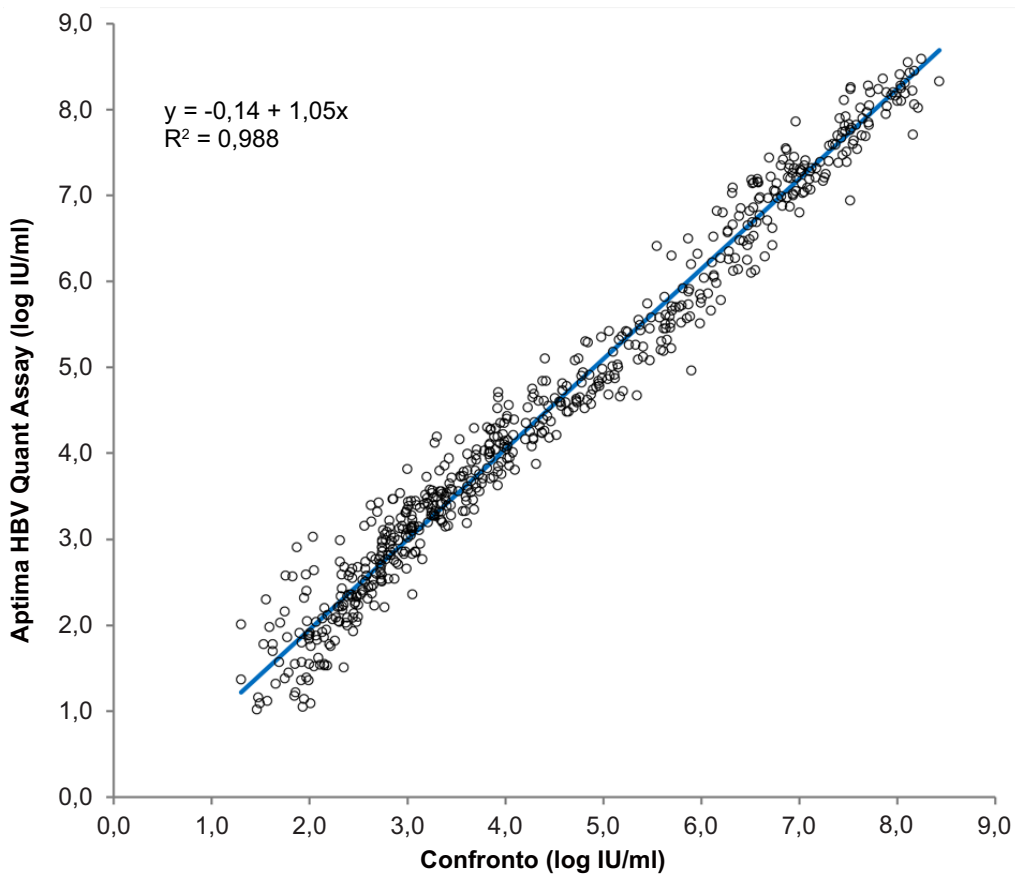


Figura 8. Correlazione fra Aptima HBV Quant Assay e il test di confronto

Contaminazione crociata

Per stabilire che il Panther System riduce al minimo il rischio di risultati falsi positivi causati da contaminazione crociata, è stato condotto uno studio utilizzando pannelli corretti su tre Panther System. La contaminazione crociata è stata valutata utilizzando campioni di plasma corretti con DNA dell'HBV ad alto titolo (8 log IU/ml) disseminati fra campioni negativi all'HBV in una disposizione a scacchiera. L'analisi è stata eseguita nel corso di quindici sessioni analitiche. Il tasso generale di contaminazione crociata era dello 0,0% (0/705).

Bibliografia

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



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

Assistenza clienti: +1 800 442 9892
customersupport@hologic.com

Assistenza tecnica: +1 888 484 4747
molecularsupport@hologic.com

Per ulteriori informazioni di contatto visitare il sito www.hologic.com.



Hologic N.V.
Da Vincilaan 5
1930 Zaventem
Belgium

Hologic, Aptima e Panther sono marchi commerciali e/o marchi registrati di Hologic, Inc. e/o delle aziende consociate negli Stati Uniti e/o in altri Paesi. Tutti gli altri marchi commerciali che possono apparire in questo foglietto illustrativo appartengono ai rispettivi proprietari.

Questo prodotto potrebbe essere protetto da uno o più brevetti statunitensi identificati nel sito www.hologic.com/patents.

© 2016-2018 Hologic, Inc. Tutti i diritti riservati.
AW-13182-701 Rev. 005
2018-09