

Aptima™ CMV Quant Assay

För *in vitro*-diagnostisk användning

Endast för export från USA

Allmän information	2
Avsedd användning	2
Sammanfattning och förklaring av analysen	2
Metodprinciper	2
Varningar och försiktighetsåtgärder	3
Förvaring och hantering av reagens	7
Provtagning och provförvaring	8
Provhantering på Panthersystemet	10
Transport av prover	10
Panther System	11
Medföljande reagens och material	11
Material som krävs men som finns tillgängliga separat	13
Valfritt material	14
Analysmetod för Panther System	14
Metodanmärkningar	20
Kvalitetskontroll	21
Analyskalibrering	21
Negativa och positiva kontroller	21
Intern kalibrator/intern kontroll	21
Tolkning av resultat	22
Begränsningar	23
Resultat	24
Detektionsgräns vid användning av WHO:s första internationella standard	24
Detekteringsgräns för CMV-genotyper och läkemedelsresistenta mutanter	25
Linjärt intervall	27
Linjäritet för CMV-genotyper	29
Nedre kvantifieringsgräns enligt WHO:s första internationella standard	31
Bestämning av nedre kvantifieringsgräns för CMV-genotyper och läkemedelsresistenta mutanter	33
Spårbarhet till WHO:s första internationella standard	36
Precision	38
Potentiellt interfererande substanser	39
Specificitet	40
Analytisk specificitet	41
Korskontamination	42
Metodkorrelation	42
Reproducerbarhet	44
Bibliografi	46
Kontaktinformation	47

Allmän information

Avsedd användning

Aptima CMV Quant Assay (Aptima CMV Quant-analys) är ett in vitro-nukleinsyraamplifieringstest för kvantifiering av DNA av humant cytomegalovirus i EDTA-plasma och helblod från människa i det helautomatiserade Panther-systemet.

Aptima CMV Quant Assay är avsedd att användas som stöd för diagnos och stöd för behandling av Organ eller blodstamcells transplanterade patienter.

Aptima CMV Quant Assay är inte avsedd att användas som en diagnostisk eller screening test.

Sammanfattning och förklaring av analysen

Humant CMV är vanligt förekommande virus med linjärt dubbelsträngat DNA på 240 kb som tillhör familjen herpesvirus. Runt om i världen ligger seroprevalensen för CMV på 45–100 %, beroende på befolkning och geografisk region.^{1,2} Hos immunkompetenta individer är CMV-infektion vanligtvis asymtomatisk och självbegränsad. Men hos immunsupprimerade individer såsom transplantatmottagare och individer med infektion av HIV är CMV en Vanlig orsak till sjuklighet och dödlighet.

På samma sätt som med andra herpesvirus, etablerar CMV efter primärinfektion en livslång latent infektion som kan återaktiveras då och då. Hos transplantatmottagare kan överföring av latent CMV i transplantatet eller återaktivering av latent CMV-infektion hos värden leda till utbredd förökning av virus och spridning till flera organ, vilket ofta är livshotande.³

Ett kvantitativt nukleinsyraamplifieringstest är den rekommenderade metoden för övervaka CMV-infektion och -sjukdom hos transplantatmottagare för att den är så snabb och känslig.⁴ De senaste riktlinjerna rekommenderar att belastningen med CMV övervakas åtminstone varje vecka för att stödja beslut om att starta behandling mot CMV och för att övervaka svaret på behandlingen.^{5,6,8} I allmänhet är högre virusbelastning kopplad med ökad risk för CMV-sjukdom.^{4,9} Därför är kvantifiering av CMV DNA tillsammans med klinisk presentation och andra laboratoriemarkörer kritiskt viktig för behandlingen av patienter med CMV-infektion.

Metodprinciper

Aptima CMV Quant Assay är ett nukleinsyraamplifieringstest som använder sig av transkriptionsmedierad amplifieringsteknik (TMA) i realtid i Panther-systemet* för att kvantifiera genotyperna 1,2,3 och 4 av CMV DNA. Primerutförandet är inriktat på den mycket konserverade UL56-genen för att säkerställa korrekt kvantifiering av CMV DNA. Denna analys uppfyller WHO:s första internationella standard (NIBSC-kod: 09/162) för humant cytomegalovirus²¹.

Aptima CMV Quant Assay består av tre huvudmoment som genomförs i ett och samma provrör i Panther-systemet: target capture, målamplicering genom transkriptionsmedierad amplifiering samt detektering av amplifieringsprodukterna (amplikon) genom fluorescensmärkta prober (torches).

Under target capture isoleras viralt DNA från proverna. Proverna behandlas med en detergent som löser upp virushöljet, denaturerar proteiner och frisläpper viralt genomiskt DNA. Capture-oligonukleotider hybridiserar till väl konserverade områden med CMV DNA, om sådana finns, i provet. Det hybridiserade målet fångas därefter in på magnetiska mikropartiklar som separeras från provet i ett magnetfält. En serie tvättsteg avlägsnar främmande ämnen från reaktionsröret.

*Inklusive varianter på Panther-systemet.

Målamplifiering sker via TMA, en transkriptionsmedierad nukleinsyre-amplifieringsmetod som använder två enzymer, Moloneys musleukemivirus (MMLV) reverse transcriptase och T7 RNA-polymeras. Reverse transcriptase används för att generera en DNA-kopia (innehållande en promotorsekvens för T7 RNA-polymeras) av målsekvensen. T7 RNA-polymeras producerar flera kopior av RNA-amplikon från DNA-mallen.

Detekteringen uppnås med hjälp av enkelsträngade nukleinsyre-torches som är närvarande under amplifieringen av målet och som hybridiseras särskilt till amplikonen i realtid. Varje torch har en fluorofor och en quencher. När torchen inte hybridiseras till amplikonen befinner sig quenchern i fluoroforens närhet och dämpar fluorescensen. När torchen binds till amplikonen flyttas släckaren längre bort från fluoroforen som sänder ut en signal på en särskild våglängd när den exciteras av en ljuskälla. När fler torches hybridiseras till amplikon uppstår en starkare fluorescerande signal. Den tid det tar för den fluorescerande signalen att nå ett angivet tröskelvärde är proportionellt mot startvärdet för CMV-koncentrationen. Varje reaktion har en inre kalibrator/inre kontroll (IC) som kontrollerar för variationer i behandling, amplifiering och detektering av prover. Provets koncentration bestäms av programvaran för Panther-systemet med hjälp av CMV- och IC-signalerna för varje reaktion, vilka sedan jämförs med kalibreringsinformationen.

Analysresultaten konverteras från kopior/mL till IU/mL med användning av en konverteringsfaktor inuti Panther-programvaran. Samma konverteringsfaktor används för både helblods- och plasmaprover. En spädningsfaktor på 4 tillämpas på virusbelastningen med CMV för helblodsprover när konverteringsfaktorn för helblod väljs på Panther.

Varningar och försiktighetsåtgärder

- A. För *in vitro*-diagnostisk användning.
- B. För professionellt bruk.
- C. Minska risken för ogiltiga resultat genom att noggrant läsa bipacksedeln och tillämplig *Panther/Panther Fusion System Operator's Manual (Användarhandledning för Panther/Panther Fusion System)* innan du utför den här analysen.

Laboratorierelaterad

- D. FÖRSIKTIGT: Kontrollerna för den här analysen innehåller plasma från människa. Plasman har Testats negativ för hepatit B-yntigen (hepatitis B surface antigen, HBsAg), antikroppar mot HCV, antikroppar mot HIV-1 och HIV-2 samt HIV-antigen när den analyserades med US Food and Drug Administrations godkända testmetoder. Plasman var dessutom icke-reaktiv för CMV DNA, HBV DNA, HCV RNA och HIV-1 RNA när den testades med godkända nukleinsyratest med användning av poolade prover. Alla ämnen som har varit i kontakt med eller har sitt ursprung i blod från människa ska betraktas som potentiellt smittförande och bör hanteras med allmänt vedertagna försiktighetsåtgärder.^{10,11,12}
- E. Endast personal med adekvat utbildning i användningen av Aptima CMV Quant Assay och hantering av potentiellt smittförande ämnen bör utföra det här momentet. I händelse av spill ska ytan omedelbart desinficeras enligt lämpliga lokala rutiner.
- F. Använd endast medföljande eller föreskriven laboratorieutrustning för engångsbruk.
- G. Iaktta sedvanliga säkerhetsrutiner för arbete i laboratorium. Pipettera inte med hjälp av munnen. Ät, drick och rök inte inom anvisade arbetsytor. Använd puderfria engångshandskar, skyddsglasögon och laboratorierockar vid hantering av prover och reagenskit. Tvätta händerna noga efter hantering av prover och reagenskit.

- H. Arbetsytor, pipetter och annan utrustning måste regelbundet desinficeras med 2,5 % till 3,5 % (0,35 till 0,5 M) natriumhypokloritlösning.
- I. Kassera alla material som har varit i kontakt med prover och reagens i enlighet med tillämpliga lokala föreskrifter eller myndighetsföreskrifter.^{10,11,12,13} Rengör och desinficera alla arbetsytor noggrant.
- J. Kontrollerna innehåller natriumazid som konserveringsmedel. Överför inte reagens med hjälp av metallrör. Om lösningar som innehåller natriumazidföreningar kasseras i avloppssystemet ska de spädas ut och spolade ned tillsammans med rikliga mängder rinnande vatten. Dessa försiktighetsåtgärder rekommenderas i syfte att undvika ansamling av avlagringar i metallrör där explosiva förhållanden kan uppstå.
- K. God standardpraxis för molekylärbiologiska laboratorier inbegriper miljöövervakning. För kontroll av laboratoriemiljön rekommenderas följande förfarande:
1. Hämta en provpinne med bomullstopp och para ihop den med ett Aptima SAT rör.
 2. Märk alla SAT-rör på lämpligt sätt.
 3. Fyll varje SAT-rör med 1 mL Aptima Specimen Diluent.
 4. Samla in prov på ytan genom att fukta provpinnen lätt med nukleasfritt avjoniserat vatten.
 5. Ta prov från ytan av intresse med en vertikal rörelse uppifrån och ned. Vrid provpinnen ungefär ett halvt varv medan du tar provet.
 6. Placera omedelbart provpinnen i röret och virvla den försiktigt i spädningsmedlet för att extrahera potentiellt uppsamlat material. Tryck provpinnen mot transportrörets ena sida för att extrahera så mycket vätska som möjligt. Kassera provpinnen och sätt ett lock på provröret.
 7. Upprepa proceduren med övriga prover.
 8. Testa provet med en molekylär analys.





Provrelaterad

- L. Provmaterialen kan vara smittförande. Vidta allmänt vedertagna försiktighetsåtgärder^{10,11,12} när du genomför den här analysen. Korrekta hanterings- och kasseringsmetoder bör fastställas enligt lokala bestämmelser.¹¹ Endast personal med adekvat utbildning i användningen av Aptima CMV Quant Assay och hantering av smittförande material bör utföra det här analysen.
- M. Upprätthåll korrekta förvaringsförhållanden vid transport av prover för att säkerställa provets kvalitet. Provmaterialets hållbarhet har inte utvärderats under andra fraktförhållanden än de som rekommenderas.
- N. Undvik korskontamination vid provhantering. Var särskilt noga med att undvika förorening genom spridning av aerosoler när locken lossas eller tas av. Prover kan innehålla mycket höga nivåer av organismer. Se till att olika provbehållare inte kommer i kontakt med varandra och kassera använda material utan att flytta dem över öppna behållare. Byt handskar om de kommer i kontakt med prover.

Analysrelaterad

- O. Använd inte reagenskit, kalibrator eller kontroller efter utgångsdatum.
- P. Analysreagens från Kit med olika huvudbatchnummer får inte bytas, blandas eller kombineras. Systemvätskor kan komma från olika batchnummer. Kontroller och kalibratorer kan komma från olika batchnummer.
- Q. Undvik att reagens förorenas med mikrober och nukleas.
- R. Analysreagens ska förvaras med lock på och i specificerade temperaturer. Analysernas prestanda kan påverkas om du använder analysreagens som har förvarats på ett olämpligt sätt. Se *Förvaring och hantering av reagens och Analysmetod för Panther System* för mer information.
- S. Kombinera inte analysreagens eller vätskor såvida du inte har fått särskilda instruktioner att göra det. Fyll inte behållare med ytterligare reagens och vätskor. Panther System kontrollerar reagensnivåerna.
- T. Undvik att TER kommer i kontakt med hud, ögon och slemhinnor. Tvätta med vatten vid kontakt med den här reagensen. Om reagenset spills ut, späd med vatten och följ lämpliga lokala rutiner.
- U. Vissa reagens i detta kit är märkta med risk- och säkerhetssymboler.

Obs! Farokommunikation återspeglar klassificeringar i EU-säkerhetsdatablad (SDS). För information om farokommunikation som är specifik för ditt område, se områdets specifika SDS i Safety Data Sheet Library (bibliotek med säkerhetsdatablad) på www.hologicsds.com

Faroangivelse för EU	
	<p>CMV Kit Controls <i>Plasma från människa 95 – 100 %</i> <i>Natriumazid < 1 %</i></p>
	<p>VARNING H312 - Skadligt vid hudkontakt H412 - Skadliga långtidseffekter för vattenlevande organismer EUH032 - Utvecklar mycket giftig gas vid kontakt med syra P273 - Undvik utsläpp till miljön P280 - Använd ögon-/ansiktsskydd</p>
	<p>Target Enhancer Reagent (TER) <i>Litiumhydroxidmonohydrat 5 – 10 %</i></p>
	<p>FARA H302 - Skadligt vid förtäring H314 - Orsakar allvarliga frätskador på hud och ögon P260 - Inandas inte damm/rök/gaser/dimma/ångor/sprej P280 - Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd P303 + P361 + P353 - VID HUDKONTAKT (även håret): Ta omedelbart av alla nedstänkta kläder. Skölj huden med vatten/duscha P305 + P351 + P338 - VID KONTAKT MED ÖGONEN: Skölj försiktigt med vatten i flera minuter. Ta ur eventuella kontaktlinser om det går lätt. Fortsätt att skölja P310 - Kontakta genast GIFTINFORMATIONSCENTRAL eller läkare</p>

Faroangivelse för Australien

**CMV Kit Controls**

*Plasma från människa 95 – 100 %
Natriumazid < 1%*

**VARNING**

H312 - Skadligt vid hudkontakt
H412- Skadliga långtidseffekter för vattenlevande organismer
EUH032 - Utvecklar mycket giftig gas vid kontakt med syra
P273 - Undvik utsläpp till miljön
P280 - Använd ögon-/ansiktsskydd

**Target Enhancer Reagent (TER)**

Litiumhydroxidmonohydrat 5–10 %

**FARA**

H302 - Skadligt vid förtäring
H314 - Orsakar allvarliga frätskador på hud och ögon
P260 – Inandas inte damm/rök/gaser/dimma/ångor/sprej
P280 - Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd
P303 + P361 + P353 - VID HUDKONTAKT (även håret): Ta omedelbart av alla nedstänkta kläder. Skölj huden med vatten/duscha
P305 + P351 + P338 - VID KONTAKT MED ÖGONEN: Skölj försiktigt med vatten i flera minuter. Ta ur eventuella kontaktlinser om det går lätt. Fortsätt att skölja
P310 - Kontakta genast GIFTINFORMATIONSCENTRAL eller läkare

Satskalibrator

*HEPES 15-20%
Litiumhydroxid, monohydrat 1–5 %
Bärnstenssyra 1–5 %*

—
—
H312 - Skadligt vid hudkontakt
H412- Skadliga långtidseffekter för vattenlevande organismer
EUH032 - Utvecklar mycket giftig gas vid kontakt med syra
P273 - Undvik utsläpp till miljön
P280 - Använd ögon-/ansiktsskydd

Förvaring och hantering av reagens

A. Följande tabell visar förvaringsförhållanden och stabilitet för reagens, kontroller och kalibrator.

Reagens	Förvaring, öppnat	Öppnad sats (rekonstituerad)	
		Förvaring	Stabilitet
qCMV-amplifieringsreagens	2 °C till 8 °C		
qCMV-amplifieringsrekonstitutionslösning	2 °C till 8 °C	2 °C till 8 °C	30 dagar ^a
qCMV-enzymreagens	2 °C till 8 °C		
qCMV-enzymrekonstitutionslösning	2 °C till 8 °C	2 °C till 8 °C	30 dagar ^a
qCMV-promotorreagens	2 °C till 8 °C		
qCMV-promotorrekonstitutionslösning	2 °C till 8 °C	2 °C till 8 °C	30 dagar ^a
qCMV Target Capture-reagens	2 °C till 8 °C	2 °C till 8 °C	30 dagar ^a
qCMV PCAL (positiv kalibrator)	-15 °C till -35 °C	15 °C till 30 °C	Ampull för engångsbruk Använd inom 24 timmar
qCMV NC CONTROL – (negativ kontroll)	-15 °C till -35 °C	15 °C till 30 °C	Ampull för engångsbruk Använd inom 24 timmar
qCMV LPC CONTROL + (låg positiv kontroll)	-15 °C till -35 °C	15 °C till 30 °C	Ampull för engångsbruk Använd inom 24 timmar
qCMV HPC CONTROL + (hög positiv kontroll)	-15 °C till -35 °C	15 °C till 30 °C	Ampull för engångsbruk Använd inom 24 timmar
qCMV Target Enhancer Reagent	15 °C till 30 °C	15 °C till 30 °C	30 dagar ^a

^a Reagens som avlägsnas från Panther-systemet ska omedelbart återbördas till lämpliga förvaringstemperaturer.

- B. Kassera eventuella oanvända rekonstituerade reagens, Target Capture-reagens (TCR) och Target Enhancer-reagens (TER) efter 30 dagar eller efter huvudbatchens utgångsdatum, beroende på vilket som inträffar först.
- C. Reagens som förvaras i Panther System har 96 timmars hållbarhet i instrumentet. Reagens kan laddas i Panther-systemet upp till 8 gånger. Panther System loggar varje tillfälle då reagensen laddas.
- D. När kalibratorm har tinats upp måste lösningen vara klar, dvs. den får inte vara grumlig eller ha utfällningar. Se till att utfällningar löses upp. Använd inte kalibratorm om det förekommer gelering, utfällning eller grumlighet.
- E. Frystorkat promotorreagens och rekonstituerat promotorreagens är ljuskänsliga. Skydda dessa reagens från ljus under förvaring och beredning för användning.
- F. qCMV Target Enhancer-reagenset måste ha en temperatur på 15 °C till 30 °C innan det används.

Provtagning och provförvaring

Obs! Hantera alla prover som om de innehåller potentiellt smittförande ämnen. Vidta allmänt vedertagna försiktighetsåtgärder.

Obs! Undvik korskontamination under hantering av prover. Använt material ska exempelvis kasseras utan att passera över öppna rör.

Obs! Endast sekundära rör av plast rekommenderas för förvaring av prov.

Helblodsprover som har samlats in i följande glas- eller plaströr kan användas för att förbereda plasma:

- Rör som innehåller EDTA-antikoagulantia
- Plasmaberedningsrör (PPT rör).

A. Provtagning

1. Plasma: Helblod kan förvaras i 2 °C till 30 °C och måste centrifugeras inom 24 timmar efter provtagningen. Separera plasma från de pelleterade röda blodkropparna i enlighet med tillverkarens anvisningar för det provrör som används. Plasma kan testas i Panther-systemet i ett primärt rör eller överföras till ett sekundärt rör, som Aptima provalikvotrör (SAT). För att erhålla en provvolym på 500 µL är minimivolymen plasma för primärt provtagningsrör upp till 1200 µL. För sekundärt rör är minimivolymen 700 µL för att erhålla samma 500 µL i provvolym. Följande tabell identifierar dödvolumkrav för varje primär och sekundär rörtyp.

Rör (storlek och typ)	Dödvolum på Panther
Aptima Sample Aliquot Tube (provalikvotrör (SAT))	0,2 mL
12x75 mm	0,5 mL
13X100 mm	0,5 mL
13x100 mm med gel	0,3 mL
16x100 mm med gel	0,7 mL

Plasma som inte analyseras omedelbart kan förvaras i enlighet med nedanstående anvisningar. Plasma som överförs till SAT kan frysas ned i -20 °C eller -70 °C. Överskrid inte tre nedfrysnings/upptiningscykler. Frys inte plasmaprov i EDTA primärt provtagningsrör.

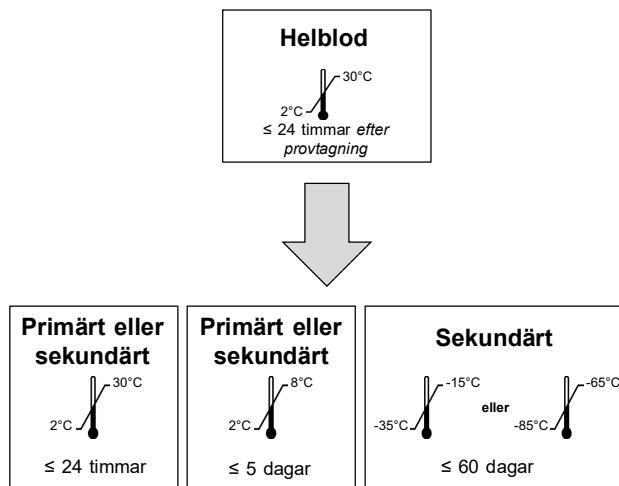
2. Helblod måste behandlas med förfyllda Whole Blood Diluent-rör innan det testas på Panther-systemet. Överskrid inte tre nedfrysnings/upptiningscykler för obehandlade helblodsprover.

B. Förvaringsförhållanden för prover

1. EDTA-plasmaprov

Helblod kan förvaras i 2 °C till 30 °C och måste centrifugeras inom 24 timmar efter provtagningen. Plasma kan sedan förvaras under något av följande förhållanden:

- I det primära provtagningsröret eller ett sekundärt rör vid 2 °C till 30 °C i upp till 24 timmar,
- I det primära provtagningsröret eller ett sekundärt rör vid 2 °C till 8 °C i upp till 5 dagar, eller
- I det sekundära röret vid -20 °C eller -70 °C i upp till 60 dagar.

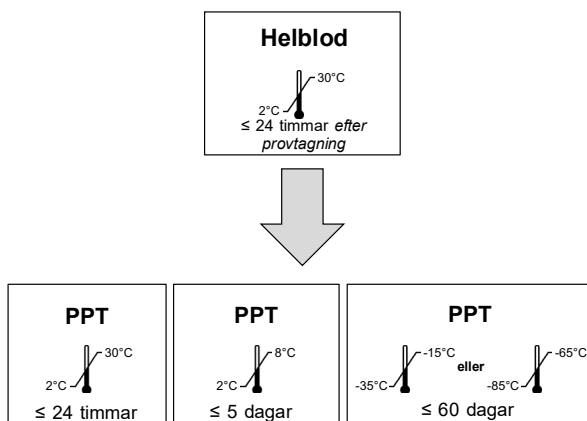


Figur 1. Förvaringsförhållanden för EDTA-rör

2. PPT-prover

Helblod kan förvaras i 2 °C till 30 °C och måste centrifugeras inom 24 timmar efter provtagningen. Plasma kan sedan förvaras under något av följande förhållanden:

- I PPT vid 2 °C till 30 °C i upp till 24 timmar,
- I PPT eller SAT vid 2 °C till 8 °C i upp till 5 dagar, eller
- I PPT vid -20 °C eller -70 °C i upp till 60 dagar.

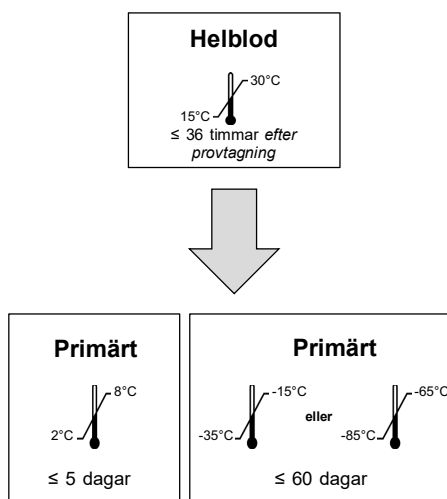


Figur 2. Förvaringsförhållanden för PPT-enheter

3. Helblodsprover

Helblod kan förvaras i 15 °C till 30 °C i upp till 36 timmar efter provtagningen. Efter provtagning kan helblodsprover förvaras under något av följande förhållanden:

- I det primära provtagningsröret vid 2 °C till 8 °C i upp till 5 dagar eller
- I det primära provtagningsröret vid -20 °C eller -70 °C i upp till 60 dagar.



Figur 3. Förvaringsförhållanden för helblodsprover

Provhantering på Panthersystemet

Plasma och behandlade helblodsprov kan lämnas kvar i Panther-systemet utan lock i upp till 8 timmar. Prover kan tas ut från Panther-systemet och analyseras så länge den totala tiden i instrumentet inte överstiger 8 timmar före pipettering av provet i Panther System.

Transport av prover

Se till att följa de provförvaringsförhållanden som beskrivs i *Provtagning och provförvaring*.

Obs! *Prov måste fraktas i enlighet med tillämpliga nationella, internationella och regionala transportbestämmelser.*

Panther System

Reagens för Aptima CMV Quant Assay anges nedan för Panther-systemet. Symboler för identifiering av reagens anges även bredvid respektive reagensnamn.

Medföljande reagens och material

Aptima CMV Quant Assay Kit, 100 tester, artikelnummer PRD-05074)
(1 analysbox, 1 kalibratorsats, 1 kontrollsats och 1 box med Target Enhancer Reagent)

Box med Aptima CMV Quant Assay

(förvaras i 2 °C till 8 °C efter leverans)

Symbol	Komponent	Antal
A	qCMV-amplifieringsreagens <i>Icke-smittförande nukleinsyror torkade i buffrad lösning.</i>	1 ampull
E	qCMV-enzymreagens <i>Reverse transcriptase och RNA-polymeras som torkats i HEPES-buffrad lösning.</i>	1 ampull
PRO	qCMV-promotorreagens <i>Icke-smittförande nukleinsyror torkade i buffrad lösning.</i>	1 ampull
AR	qCMV-amplifieringsrekonstitutionslösning <i>Vattenlösning innehållande glycerol och konserveringsmedel.</i>	1 x 7,2 mL
ER	qCMV-enzymrekonstitutionslösning <i>HEPES-buffrad lösning innehållande ett surfaktant ämne och glycerol.</i>	1 x 5,8 mL
PROR	qCMV-promotorrekonstitutionslösning <i>Vattenlösning innehållande glycerol och konserveringsmedel.</i>	1 x 4,5 mL
TCR	qCMV Target Capture-reagens <i>Nukleinsyror i buffrad saltlösning innehållande icke smittförande nukleinsyror i fast fas samt en intern kalibrator.</i>	1 x 72,0 mL
	Rekonstitutionskragar	3
	Streckkodsblad för huvudbatch	1 blad

Aptima CMV Quant-kalibratorsats (artikelnummer PRD-05075)

(förvaras i -15 till 35 °C efter leverans)

Symbol	Komponent	Antal
PCAL	qCMV-positivkalibrator <i>Plasmid-DNA i buffrad lösning.</i>	5 x 2,5 mL
	Streckkodsetikett för kalibrator	—

Aptima CMV Quant-kontrollsats (artikelnummer PRD-05076)
(förvaras i –15 °C till 35 °C efter leverans)

Symbol	Komponent	Antal
NC	qCMV negativ kontroll <i>CMV-negativ defibrinerad plasma från människa innehållande gentamicin och 0,2 % natriumazid som konserveringsmedel.</i>	5 x 0,8 mL
LPC	qCMV låg positiv kontroll <i>Inaktiverat CMV i defibrinerad plasma från människa innehållande gentamicin och 0,2 % natriumazid som konserveringsmedel.</i>	5 x 0,8 mL
HPC	qCMV hög positiv kontroll <i>Inaktiverat CMV i defibrinerad plasma från människa innehållande gentamicin och 0,2 % natriumazid som konserveringsmedel.</i>	5 x 0,8 mL
	Streckkodsetikett för kod	—

Box med Aptima CMV Quant Target Enhancer Reagent
(förvaras i 15 °C till 30 °C efter leverans)

Symbol	Komponent	Antal
TER	qCMV Target Capture Reagent <i>En koncentrerad litiumhydroxid-lösning.</i>	1 x 46,0 mL

Material som krävs men som finns tillgängliga separat

Obs! Material som finns tillgängliga hos Hologic anges med respektive artikelnummer om inget annat anges.

Material	Art. nr.
Panther [®] System	—
Panther Run Kit for Real Time Assays (endast för realtidsanalyser)	PRD-03455 (5 000 analyser)
<i>Aptima™ Assay Fluids Kit (benämns även Universal Fluids Kit) innehåller Aptima Wash Solution, Aptima Buffer for Deactivation Fluid, och Aptima Oil Reagent</i>	303014 (1000 analyser)
<i>Multirörsenheter (MTU-enheter)</i>	104772-02
<i>Panther Waste Bag Kit</i>	902731
<i>Panther Waste Bin Cover</i>	504405
Eller, Panther System Run Kit <i>(vid körning av TMA-analyser som inte utförs i realtid, parallellt med TMA-analyser i realtid) innehåller MTU-enheter, avfallspåsar, lock till avfallsbehållare, Auto Detect och analysvätskor</i>	303096 (5 000 analyser)
Whole Blood Diluent-rör (endast för behandling av helblodsprover)	PRD-06783 (100 förfyllda rör per påse)
Spetsar, 1000 µL filtrerade, ledande, vätskeavkännande och för engångsbruk <i>Alla produkter är inte tillgängliga i alla regioner. Kontakta din representant för regionsspecifik information</i>	901121 (10612513 Tecan) 903031 (10612513 Tecan) MME-04128 MME-04134 (30180117 Tecan)
Blekmedel, 5 % till 8.25 % (0,7 M till 1,16 M) natriumhypokloritlösning	—
Pudarfria engångshandskar	—
Ogenomträngliga utbyteslock	103036A
Utbyteslock Hologic Solid Caps (engångslock till rör för behandling av helblod)	PRD-06720
Utbyteslock till reagens <i>Amplifierings-, enzym- och promotorreagens rekonstitutionsflaska</i>	CL0041 (100 lock)
<i>TCR-flaska</i>	CL0040 (100 lock)
<i>TER-flaska</i>	903302 (100 lock)
Skyddspapper för laboratoriebänk med plastad baksida	—
Luddfria dukar	—
Pipett	—
Spetsar	—
Alternativ för primärt provtagningsrör:	—
<i>13 mm x 100 mm</i>	
<i>13 mm x 75 mm</i>	
<i>16 mm x 100 mm</i>	
Centrifug	—
Vortexblandare	—

Valfritt material

Material	Art. nr.
Alternativ för sekundära rör:	
12 mm x 75 mm	—
13 mm x 100 mm	—
16 mm x 100 mm	—
Aptima-provalikvotrör (SAT) (100-pack)	503762
Lock till transportrör (100-pack)	504415
Lock till SAT-rör	
Aptima Specimen Diluent	PRD-03003
Aptima Specimen Diluent Kit	PRD-03478
<i>innehåller Aptima Specimen Diluent, 100 SAT:er och 100 lock</i>	
Överföringspipetter	—
Provpinnar med bomullstopp	—
Provrörsvagga	—

Analysmetod för Panther System

Obs! Se användarhandledningen för Panther/Panther Fusion System för ytterligare information om förfaranden.

A. Beredning av arbetsytan

1. Rengör arbetsytan där reagens ska beredas. Torka av arbetsytorna med 2,5 % till 3,5 % (0,35 M till 0,5 M) natriumhypokloritlösning. Låt natriumhypokloritlösningen verka minst en minut på arbetsytorna och skölj sedan med avjoniserat vatten. Låt inte natriumhypokloritlösningen torka. Täck bänkytan med rena och absorberande skyddspapper för laboratoriebank med plastad baksida.
2. Rengör en separat bänkyta för beredning av prover. Följ proceduren som beskrivs ovan (steg A.1).
3. Rengör eventuella pipetter. Använd rengöringsproceduren som beskrivs ovan (steg A.1).

B. Bereda kalibrator och kontroller

Låt kalibratoren och kontrollerna nå 15 till 30 °C före bearbetning enligt följande:

1. Ta ut kalibratoren och kontrollerna från förvaringen (-15 till -35 °C) och placera dem i en temperatur på 15 till 30 °C. Vänd försiktigt på varje rör under upptiningsproceduren så att innehållet blandas ordentligt. Kontrollera att provrörsinnehållet är helt upptinat före användning.

Alternativ. Kalibrator- och kontrollrören kan placeras på en provrörsvagga så att innehållet blandas ordentligt. Kontrollera att provrörsinnehållet är helt upptinat före användning.

Obs! Undvik överdriven skumbildning när du vänder på kalibratoren och kontrollerna. Skummet försämrar nivåavkänningsfunktionen i Panther-systemet.

2. När rörinnehållet har tinat upp torkar du rörets utsida med en ren och torr engångsduk.
3. Öppna inte rören i det här stadiet eftersom det kan leda till kontamination av innehållet.

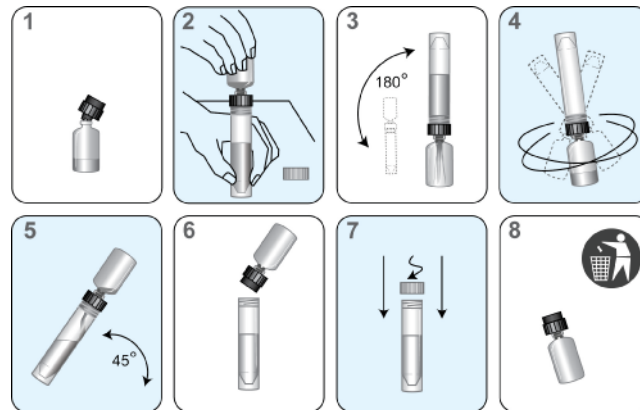
C. Rekonstituera reagens/bereda ett nytt kit

Obs! Innan du börjar arbeta med Panther-systemet ska reagensen rekonstrueras.

1. Så här bereder du Target Capture-reagens (TCR):
 - a. Ta ut TCR från förvaringen (2 °C till 8 °C). Kontrollera att batchnumret på TCR-flaskan motsvarar batchnumret på huvudbatchens streckkodsblad.
 - b. Skaka omedelbart TCR-flaskan kraftigt 10 gånger. Låt TCR-flaskan stå i 15 °C till 30 °C så att den värms upp i minst 45 minuter. Snurra och vänd på TCR-flaskan minst var 10:e minut.

Alternativ. TCR-flaskan kan förberedas på en provrörsvagga enligt följande: Ta ut TCR från förvaringen (2 °C till 8 °C) och skaka det omedelbart 10 gånger kraftigt. Placera TCR-flaskan på en provrörsvagga och låt reagenset värmas upp i minst 45 minuter vid 15 °C till 30 °C.
 - c. Kontrollera att alla utfällningar har lösts upp och att magnetpartiklarna har suspenderats före användning.
2. Så här rekonstruerar du amplifierings-, enzym- och promotorreagens:
 - a. Ta ut frystorkade reagens och motsvarande rekonstitutionslösningar från förvaring (2 °C till 8 °C). Para ihop varje rekonstitutionslösning med respektive frystorkat reagens.
 - b. Se till att rekonstitutionslösningen och det frystorkade reagenset har matchande etikettfärger. Kontrollera batchnumret på huvudbatchens streckkodsblad så att korrekta reagens paras ihop.
 - i. Öppna den frystorkade reagensampullen genom att ta bort metalltätningen och gummistoppet.
 - ii. För bestämt in den skårade änden av rekonstitutionskragen (svart) på ampullen (Figur 4, steg 1).
 - iii. Öppna motsvarande flaska med rekonstitutionslösning och lägg locket på en ren, täckt arbetsyta.
 - iv. Placera flaskan med rekonstitutionslösning på en stabil yta (till exempel bänken). Vänd sedan ampullen med frystorkat reagens över rekonstitutionslösningsflaskan och anslut kragen ordentligt till rekonstitutionslösningsflaskan (Figur 4, steg 2).
 - v. Vänd försiktigt på de hopmonterade flaskorna (ampull ansluten till flaskan med lösning) igen så att lösningen rinner tillbaka in i glasampullen (Figur 4, steg 3).
 - vi. Plocka upp de hopmonterade flaskorna och snurra dem i minst 10 sekunder (Figur 4, steg 4).
 - vii. Vänta i minst 30 minuter tills det frystorkade reagenset har lösts upp i lösningen.
 - viii. När det frystorkade reagenset har lösts upp i lösningen virvlar du de hopmonterade flaskorna i minst 10 sekunder och vagnar sedan lösningen i glasampullen fram och tillbaka så att den blandas ordentligt.
 - c. Luta långsamt de hopmonterade flaskorna på nytt så att all lösning rinner tillbaka in i flaskan med rekonstitutionslösning (Figur 4, steg 5).
 - d. Ta försiktigt bort rekonstitutionskragen och glasampullen (Figur 4, steg 6).
 - e. Sätt tillbaka locket på flaskan. Notera operatörens initialer och rekonstitutionsdatum på etiketten (Figur 4, steg 7).
 - f. Kassera rekonstitutionskragen och glasampullen (figur 5, steg 8).

Varning: Undvik överdriven skumbildning när du rekonstituerar reagens. Skummet försämrar nivåavkänningsfunktionen i Panther-systemet.



Figur 4. Rekonstitutionsprocess för Panther System

3. Ta ut qCMV Target Enhancer-reagenset från förvaringen (15 °C till 30 °C). Notera operatörens initialer och öppningsdatum på etiketten. Kontrollera att batchnumret på TER-flaskan motsvarar batchnumret på huvudbatchens strekkodsblad.

D. Reagensberedning av tidigare beredda reagens

1. Ta ut tidigare beredda reagens från förvaring (2 °C till 8 °C). Tidigare beredda amplifierings-, enzym- och promotorreagens samt TCR måste nå 15 °C till 30 °C innan analysen påbörjas.
2. Ta ut TER från förvaring (15 °C till 30 °C).
3. För tidigare berett TCR utför du steg C.1 ovan före laddning i systemet.
4. Virvla och vänd på amplifierings-, enzym- och promotorreagensen så att de blandas ordentligt innan de laddas i systemet. Undvik överdriven skumbildning när du vänder på reagens.

Alternativ. Reagens som beretts tidigare kan förberedas på en provrörsvagga enligt följande: Ta ut reagens från förvaringen (2 °C till 8 °C). Placera reagens i en provrörsvagga och låt värmas upp i minst 30 minuter vid 15 °C till 30 °C.

5. Fyll inte på reagensflaskorna. Panther System känner av och avvisar flaskor med mer reagens än beräknat.

E. Hantering av plasmaprover

1. Se till att behandlade prover i primära rör eller utspädda prover i sekundära rör har förvarats korrekt enligt *Provtagning och provförvaring*.
2. Frysta prover måste tinas upp ordentligt. Vortexblanda de tinade proverna i 3 till 5 sekunder så att de blandas ordentligt.
3. Låt proverna nå 15 °C till 30 °C före bearbetning. Se *Provhantering på Panthersystemet* för ytterligare information om hantering av prover i instrumentet.
4. Se till att varje primärt provtagningsrör innehåller upp till 1200 µL provmaterial eller att varje sekundärt rör innehåller minst 700 µL provmaterial. Se tabellen i *Provtagning* för att identifiera dödvolymskrav för varje primär och sekundär rörtyp.
5. Alla prover ska centrifugeras i 1000 till 3000g i 10 minuter innan de laddas i provstället. Ta inte av locken vid det här steget.

Se steg G.2 nedan för information om laddning av ställ och borttagning av lock.

F. Hantering av helblodsprov

1. Se till att obehandlade prover i primära rör förvaras korrekt enligt *Provtagning och provförvaring*.
2. Frysta prover måste tinas upp ordentligt. Låt proverna nå 15 °C till 30 °C före bearbetning. Se *Provhantering på Panthersystemet* för ytterligare information om hantering av prover i instrumentet.
3. Vänd försiktigt helblodsrör minst 3 gånger eller blanda försiktigt i provrörsvagga tills blodet är homogent.
4. Utför följande procedur på varje prov för provbehandling.
 - a. Blod i primärt rör måste blandas ordentligt genom vändning och provet ska överföras omedelbart till röret med spädningsmedel för helblod.
 - b. Tillsätt 500 µL helblodsprov till det förfyllda Whole Blood Diluent-röret.
 - c. Sätt på locket igen och vortexblanda provet i minst 5 sekunder.Se steg G.2 nedan för information om laddning av ställ och borttagning av lock.

G. Beredning av system

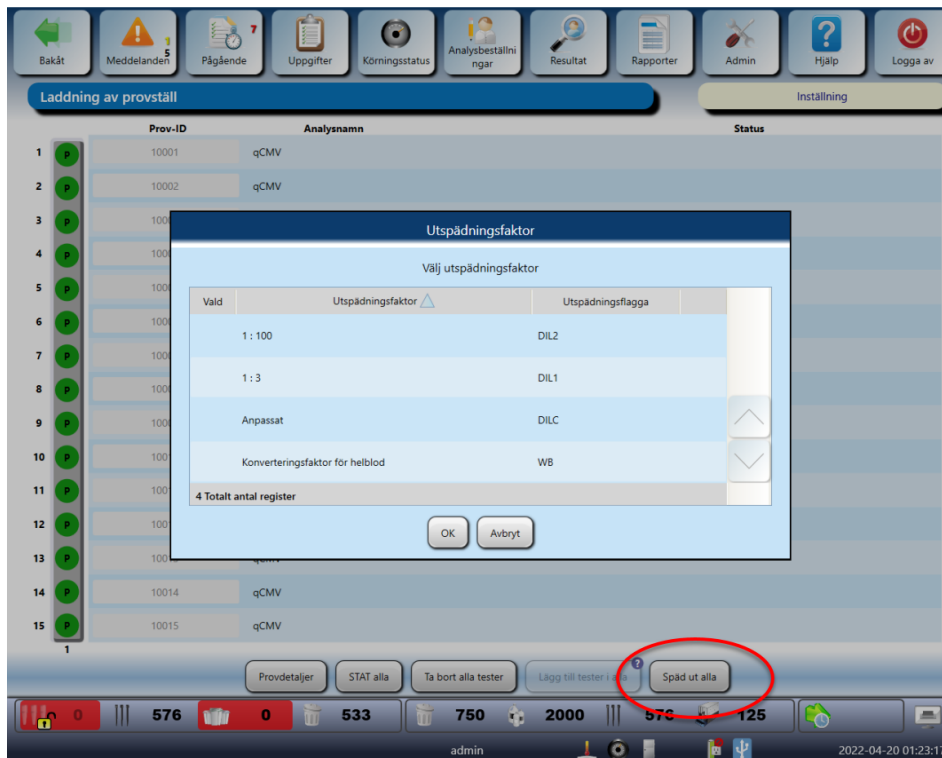
1. Konfigurera systemet enligt anvisningarna i *Användarhandledning för Panther/Panther Fusion System* och *Metodanmärkningar*. Se till att använda reagensställ och TCR-adaptrar av lämplig storlek.
2. Ladda proverna i provstället. Utför följande steg för varje provrör (prov, och, om nödvändigt, kalibrator och kontroller):
 - a. Lossa på ett av provrörslocken, men ta inte bort det ännu.
Obs! Var särskilt noga med att undvika förorening genom spridning av aerosoler. Lossa försiktigt locken på proverna.
 - b. Ladda provröret i provstället.
 - c. Upprepa steg 2.a och 2.b för varje återstående prov.
 - d. När proverna har laddats i provstället tar du bort och kasserar varje provrörslock i ett provställ. Håll inte lock ovanför andra provställ eller provrör eftersom det kan leda till kontamination.
 - e. Använd om så krävs en ny överföringspipett för engångsbruk för att avlägsna eventuella bubblor eller skum. Bubblor i provrören försämrar nivåavkänningsfunktionen i Panther-systemet.
 - f. När det sista locket har tagits bort laddar du provstället i provfacket.
Obs! Om du kör andra analyser och provtyper samtidigt måste du säkra provhållaren innan provstället laddas i provfacket.
 - g. Upprepa steg 2.a till 2.f med nästa provställ.

H. Beredning av system - Tillämpa konverteringsfaktor för helblod

1. Konfigurera systemet enligt anvisningarna i *Användarhandledning för Panther System*.
2. Ladda provställ.
3. Tillämpa konverteringsfaktor för helblod för att analysera testorder för helblodsprover.
Obs! Konverteringsfaktor för helblod kan tillämpas på ett helt ställ eller en enskilda testorder.

För att tillämpa konverteringsfaktorn för helblod på ett helt ställ med helblodsprover:

- a. Dubbelklicka på önskat laddat ställ på skärmen *Sample Rack Bay* (provställsfack). Skärmen *Sample Rack Loading* (provställsladdning) visas för det valda stället.
- b. Välj **Dilute All (späd ut alla)**.
Fönstret Dilution Factor (utspädningsfaktor) visas.

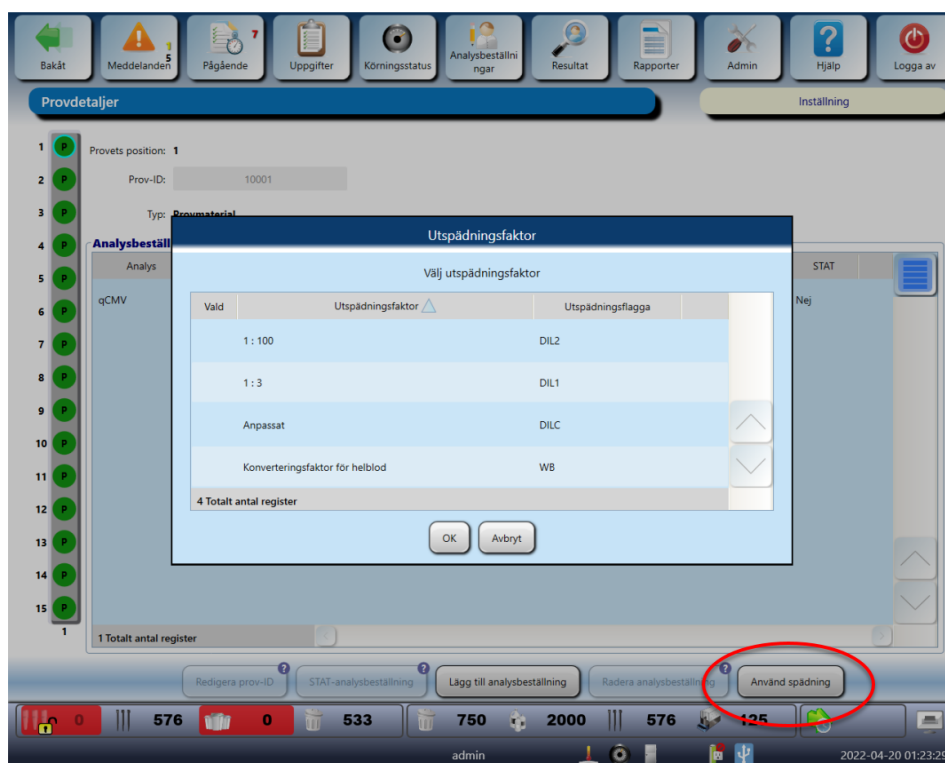


Figur 5. Dilution Factor-fönstret i *Sample Rack Loading*-skärmen (exempel)

- c. Välj **Whole Blood Conversion Factor (konverteringsfaktor för helblod)**.
- d. Välj **OK**.
Fönstret *Set Dilution Factor for Rack* (ställ in utspädningsfaktorn för stället) visas.
- e. Välj **Yes (ja)** för att tillämpa flaggan för konverteringsfaktorn för helblod på hela stället med helblodsprover.

För att tillämpa konverteringsfaktorn för helblod på en enstaka testorder (se bild nedan):

- a. Dubbelklicka på det laddade stället med önskat prov på skärmen *Sample Rack Bay* (provställsfack).
Skärmen *Sample Rack Loading* (ladda provställ) öppnas för det valda provstället.
- b. Dubbelklicka på önskat prov på skärmen *Sample Rack Loading* (ladda provställ).
Skärmen *Sample Details* (provinformation) öppnas med de aktuella analysbeställningarna för valt prov.
- c. Välj den analysbeställning som önskas från panelen *Test Orders* (analysbeställningar).
- d. Välj **Apply Dilution (tillämpa utspädning)**



Figur 6. Dilution Factor-fönstret i Sample Details-skärmen (exempel)

- e. Välj **Whole Blood Conversion Factor (konverteringsfaktor för helblod)**.
 - f. Välj **OK** för att tillämpa flaggan för konverteringsfaktorn för helblod på alla valda analysbeställningar.
4. Vid behov kan helblodsfaktorn tas bort från analysbeställningar innan bearbetningen börjar.

För att radera konverteringsfaktorn för helblod på ett helt ställ:

1. Dubbelklicka på önskat laddat ställ på skärmen *Sample Rack Bay* (provställsfack). Skärmen *Sample Rack Loading* (provställsladdning) visas för det valda stället.
2. Välj **Dilute All (späd ut alla)**.
3. Avmarkera **Whole Blood Conversion Factor (konverteringsfaktor för helblod)** i fönstret för *Dilution Factor* (utspänningsfaktor).
4. Välj **OK**.

Fönstret *Set Dilution Factor for Rack* (ställ in utspänningsfaktorn för stället) visas.

5. Välj **Yes** För att radera konverteringsfaktorn för helblod på ett helt ställ.

För att radera analysbeställningarna med konverteringsfaktorn för helblod:

1. Dubbelklicka på det laddade stället med önskat prov på skärmen *Sample Rack Bay* (provställsfack). Skärmen *Sample Rack Loading* (ladda provställ) öppnas för det valda provstället.
2. Dubbelklicka på önskat prov på skärmen *Sample Rack Loading* (ladda provställ).

Skärmen *Sample Details* (provinformation) visas med de aktuella analysbeställningarna för valt prov.

3. Välj den analysbeställning önskas från panelen *Test Orders* (analysbeställningar).
4. Välj **Apply Dilution. (tillämpa utspädning)**
5. Avmarkera **Whole Blood Conversion Factor (konverteringsfaktor för helblod)** i fönstret *Dilution Factor* (utspädningsfaktor).
6. Välj **OK** för att radera konverteringsfaktorn för helblod från analysbeställningen.

Metodanmärkningar

A. Kalibrator och kontroller

1. Rören för qCMV positiv kalibrator, qCMV låg positiv kontroll, qCMV hög positiv kontroll och qCMV negativ kontroll kan laddas i alla positioner i provstället och i alla provfackbanor i Panther-systemet. Provpipettering inleds när ett av följande två villkor är uppfyllt:
 - a. Systemet bearbetar kalibratoren och kontrollerna.
 - b. Systemet registrerar giltiga resultat för kalibratoren och kontrollerna.
2. När kalibrator- och kontrollrören har pipetterats och bearbetas kan proverna testas med motsvarande rekonstituerad kit i upp till 24 timmar, **såvida inte**:
 - a. kalibrator- eller kontrollresultaten är ogiltiga,
 - b. Den tillhörande kit avlägsnas från systemet.
 - c. Tillhörande kit har passerat stabilitetsgränsen.
3. Kalibratoren och varje kontrollrör kan användas en gång. Om du försöker använda röret mer än en gång kan processfel uppstå.

B. Puder från handskar

Precis som i alla reagenssystem kan stora mängder puder på vissa handskar orsaka kontamination i öppna rör. Puderfria handskar rekommenderas.

Kvalitetskontroll

Körningar eller provresultat kan ogiltigförklaras av en operatör om tekniska, operativa eller instrumentrelaterade problem observeras och dokumenteras i samband med analysen. I det här fallet måste proverna analyseras igen.

Prover med ogiltiga resultat måste analyseras på nytt för att ett giltigt resultat ska kunna erhållas.

Analyskalibrering

För att få fram giltiga resultat måste en analyskalibrering utföras. En enskild positiv kalibrator körs i tre replikat varje gång ett kit laddas i Panther-systemet. En utförd kalibrering gäller i upp till 24 timmar. Programvaran i Panther-systemet meddelar operatören när en kalibrering krävs. Operatören skannar en kalibreringskoefficient som finns på strekkodsbladet för huvudbatchen som medföljer varje kit

Under behandlingen verifierar Panther System-programvaran automatiskt acceptanskriterier för kalibratören. Om färre än två kalibratorreplikater är giltiga ogiltigförklaras körningen automatiskt av programvaran. Prover i ogiltigförklarade körningar måste analyseras på nytt med hjälp av nyberedda kalibratörer och kontroller.

Negativa och positiva kontroller

För att kunna erhålla giltiga resultat måste en uppsättning analyskontroller testas. Ett replikat av den negativa kontrollen, den låga positiva kontrollen och den höga positiva kontrollen måste analyseras varje gång ett kit laddas i Panther-systemet. En utförd kontroll gäller i upp till 24 timmar. Programvaran i Panther-systemet meddelar operatören när kontroller krävs.

Under bearbetningen verifierar Panther-systemets programvara automatiskt acceptanskriterier för kontrollerna. För att generera giltiga resultat måste den negativa kontrollen ge resultatet "Ej detekterat" och de positiva kontrollerna måste ge resultat inom på förhand definierade parametrar. Om någon av kontrollerna ger ett ogiltigt resultat kommer programvaran automatiskt att ogiltigförklara körningen. Prover i ogiltigförklarade körningar måste analyseras på nytt med hjälp av nyberedda kalibratörer och kontroller.

Intern kalibrator/intern kontroll

Varje prov innehåller en intern kalibrator/intern kontroll (IC). Under behandlingen verifierar Panther System programvara automatiskt acceptanskriterier för IC. Om ett IC-resultat är ogiltigt blir även provresultatet ogiltigförklarat. Alla prover med ogiltiga IC-resultat måste analyseras på nytt för att ett giltigt resultat ska kunna erhållas.

Programvaran för Panther-systemet har utformats för att korrekt verifiera processer när förfaranden utförs enligt instruktionerna som finns med i denna bipacksedel och i *Användarhandledning för Panther/Panther Fusion System*.

Tolkning av resultat

Panther-systemet fastställer automatiskt koncentrationen av CMV DNA för prover och kontroller genom att jämföra resultaten med en kalibreringskurva. CMV DNA-koncentrationer rapporteras i IU/mL och \log_{10} IU/mL. Tolkningen av resultaten ges i Tabell 1 och Tabell 2.

Tabell 1: Tolkning av resultat för plasma

Rapporterat Aptima CMV Quant Assay-resultat		Tolkning
IU/mL	Log ₁₀ -värde	
Ej detekterat	Ej detekterat	CMV DNA ej detekterat.
<53 detekterat	<1,72	CMV DNA har detekterats, men på en nivå som är under nedre kvantifieringsgränsen (LLoQ).
53 till 10 000 000	1,72 till 7,00	CMV DNA-koncentrationen är inom det kvantitativa intervallet mellan LLoQ och ULoQ IU/mL.
>10 000 000	>7,00	CMV DNA-koncentrationen är över övre kvantifieringsgränsen (ULoQ).
Ogiltigt ^a	Ogiltigt ^a	Det uppstod ett fel när resultatet genererades. Provet bör analyseras på nytt.

^aOgiltiga resultat visas med blå text.

Tabell 2: Tolkning av helblodsresultat

Rapporterat Aptima CMV Quant Assay-resultat		Tolkning
IU/mL	Log ₁₀ -värde	
Ej detekterat	Ej detekterat	CMV DNA ej detekterat.
<176 detekterat	<2,24	CMV DNA har detekterats, men på en nivå som är under nedre kvantifieringsgränsen (LLoQ).
176 till 10,000,000	2,24 till 7,00	CMV DNA-koncentrationen är inom det kvantitativa intervallet mellan LLoQ och ULoQ IU/mL.
>10 000 000	>7,00	CMV DNA-koncentrationen är över övre kvantifieringsgränsen (ULoQ).
Ogiltigt ^a	Ogiltigt ^a	Det uppstod ett fel när resultatet genererades. Provet bör analyseras på nytt.

^aOgiltiga resultat visas med blå text.

Begränsningar

- A. Den här analysen får endast utföras av personal med utbildning på proceduren. Om anvisningarna i bipacksedeln inte följs finns det risk för felaktiga resultat.
- B. Pålitliga resultat förutsätter att prover tas, transporteras, förvaras och behandlas på ett korrekt sätt.
- C. Mutationer, även om de är ovanliga, inom de väl konserverade områdena av det virala genomet som täcks av primrarna eller proberna i Aptima CMV Quant Assay, kan leda till underkvantifiering av eller omöjlighet att detektera viruset.

Resultat

Detektionsgräns vid användning av WHO:s första internationella standard

Detekteringsgränsen (LoD) för analysen definieras som den CMV DNA-koncentration som detekteras vid en sannolikhet på 95 % eller högre, i enlighet med CLSI EP17-A2.¹⁴

Detektionsgräns i plasma med WHO-standard

LoD fastställdes genom paneltest med WHO:s första internationella standard (NIBSC-kod 09/162) för CMV²¹ utspädd i CMV-negativ plasma från människa. 60 replikat av varje utspädning testades med var och en av de tre reagensbatcherna för totalt 180 replikat per utspädning. En probit-analys utfördes i syfte att generera förväntade detekteringsgränser. LoD-värdena som visas i Tabell 3 utgör resultaten från reagensbatchen med den översta förväntade detekteringsgränsen. LoD för Aptima CMV Quant Assay med användning av WHO:s första internationella standard är 40,7 IU/mL för plasma.

Tabell 3: Detektionsgräns för plasma vid användning av WHO:s första internationella standard för CMV

Förväntad detekteringsgräns	Koncentration (IU/mL)
10 %	1,9
20 %	2,9
30 %	4,0
40 %	5,3
50 %	6,9
60 %	9,1
70 %	12,2
80 %	17,1
90 %	27,5
95 %	40,7

Detektionsgräns i helblod med WHO-standard

LoD fastställdes genom paneltest med WHO:s första internationella standard för CMV utspädd i CMV-negativt helblod. 60 replikat av varje utspädning testades med var och en av de tre reagensbatcherna för totalt 180 replikat per utspädning. En probit-analys utfördes i syfte att generera förväntade detekteringsgränser. LoD-värdena som visas i Tabell 4 utgör resultaten från reagensbatchen med den översta förväntade detekteringsgränsen. LoD för Aptima CMV Quant Assay med användning av WHO:s första internationella standard är 131,0 IU/mL för plasma.

Tabell 4: Detektionsgräns för helblod vid användning av WHO:s första internationella för CMV

Förväntad detekteringsgräns	Koncentration (IU/mL)
10 %	8,8
20 %	13,2
30 %	17,7
40 %	22,7
50 %	28,7
60 %	36,2
70 %	46,5
80 %	62,4
90 %	93,7
95 %	131,0

Detekteringsgräns för CMV-genotyper och läkemedelsresistenta mutanter

Detekteringsgräns för CMV-genotyper och läkemedelsresistenta mutanter i plasma

LoD verifierades för tre olika genotyper baserat på glykoprotein-B-sekvens⁷ (gB-2, gB-3 och gB-4) och läkemedelsresistenta mutanter genom att testa olika CMV-koncentrationer kring fastställd LoD för plasma med WHO-standard (genotyp gB-1). Tester utfördes med 30 replikat per panelmedlem per reagensbatch med två batcher Aptima CMV Quant-reagenter. Högsta LoD som verifierades för alla tre genotyper och läkemedelsresistenta mutanter var 40 IU/mL med båda reagensbatcherna.

Obs! Resultaten med Aptima CMV Quant Assay med läkemedelsresistenta mutanter av cytomegalovirus utvärderades endast i plasmaprover.

Tabell 5: Detekteringsgräns för CMV-genotyper och läkemedelsresistenta mutanter i plasma

Genotyp	Koncentration (IU/mL)
gB-2	40
gB-3	40
gB-4	35
Läkemedelsresistent mutant UL54 and UL97*	35
Läkemedelsresistent mutant UL56**	35

*UL54-genmutationer kan leda till korsresistens mot flera antivirala läkemedel för behandling av CMV-infektion, t.ex. ganciclovir (GCV), cidofovir (CDV) och foscarnet (PFA).
UL97-genmutationer leder även till resistens mot ganciclovir (GCV).

**UL56-genmutationer leder till resistens mot letermovir (LET).

Sammantaget är LoD i plasma 40,7 IU/mL.

Detektionsgräns i helblod för CMV-genotyper

LoD verifierades för tre olika glykoprotein-B-genotyper (gB-2, gB-3 och gB-4) genom att testa olika CMV-koncentrationer kring fastställd LoD för helblod med WHO-standard (genotyp gB-1). Tester utfördes med 30 replikat per panelmedlem per reagensbatch med två batcher Aptima CMV Quant-reagenter. Högsta LoD som verifierades för alla tre genotyper var 150 IU/mL med båda reagensbatcherna.

Tabell 6: Detektionsgräns i helblod för CMV-genotyper

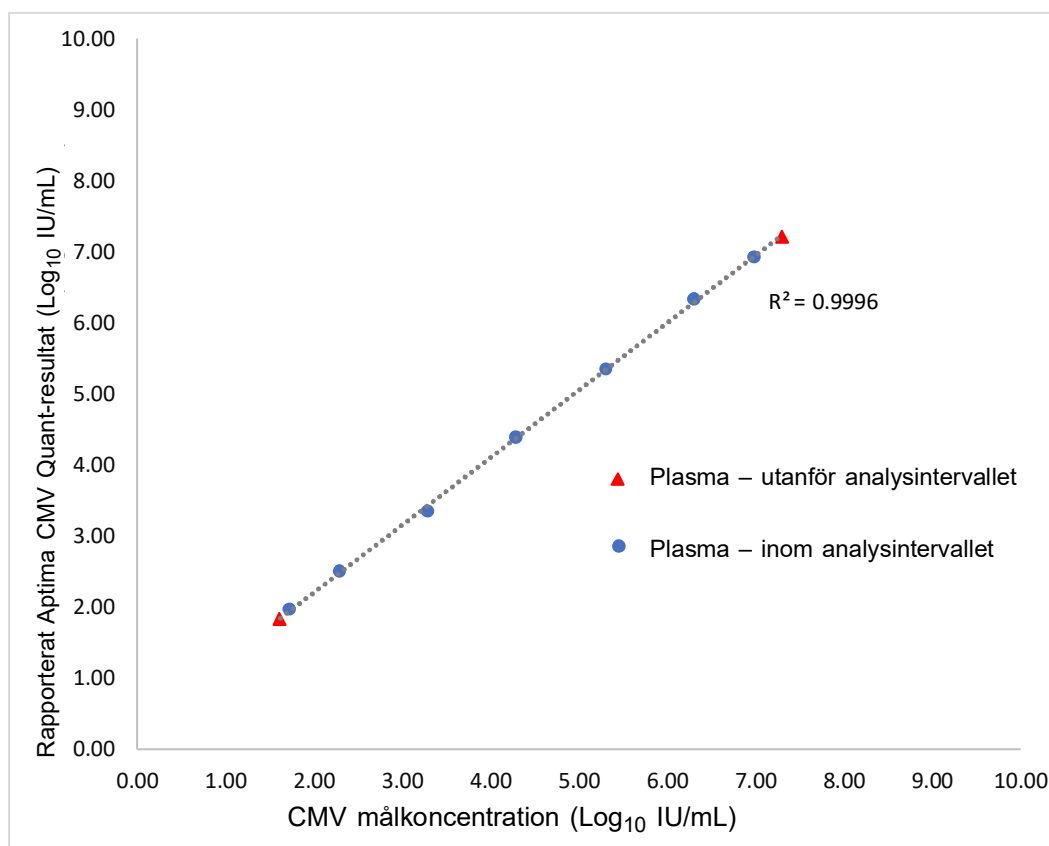
Genotyp	Koncentration (IU/mL)
gB-2	150
gB-3	150
gB-4	130

Sammantaget är LoD i helblod 150 IU/mL.

Linjärt intervall

Linjärt intervall i plasma

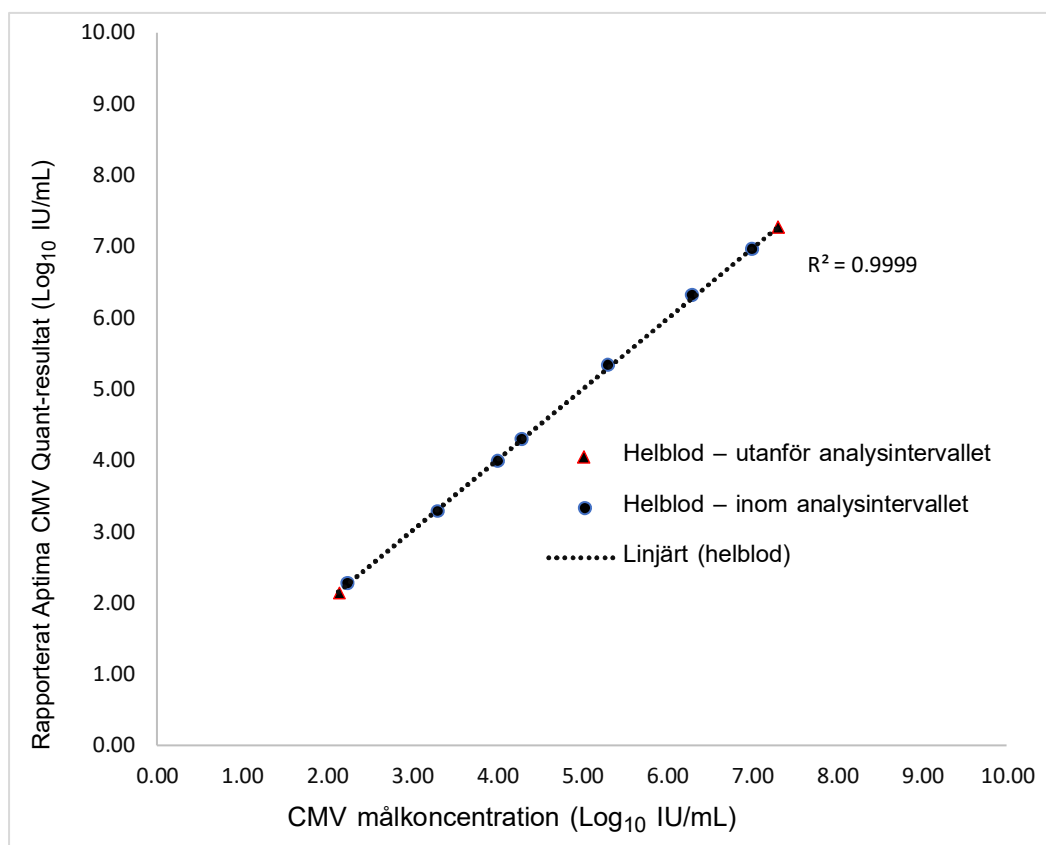
Det linjära intervallet fastställdes genom att testa CMV-paneler utspädda med CMV-negativ plasma från människa och serum enligt CLSI EP06-A.¹⁵ Panelernas koncentration sträckte sig från 1,62 log IU/mL till 7,30 log IU/mL. Aptima CMV Quant Assay visade linjäritet på det testade intervallet. Analysens övre kvantifieringsgräns (ULoQ) är 7 Log IU/mL, se Figur 7.



Figur 7. Linjäritet i plasma

Linjärt intervall i helblod

Det linjära intervallet fastställdes genom att testa CMV-paneler utspädda med CMV-negativt helblod från människa enligt CLSI EP06-A.¹⁵ Panelernas koncentration låg mellan 2,15 log IU/mL till 7,3 log IU/mL för helblod. Aptima CMV Quant Assay visade linjäritet på det testade intervallet. Analysens övre kvantifieringsgräns (ULoQ) är 7 log IU/mL, se Figur 8.

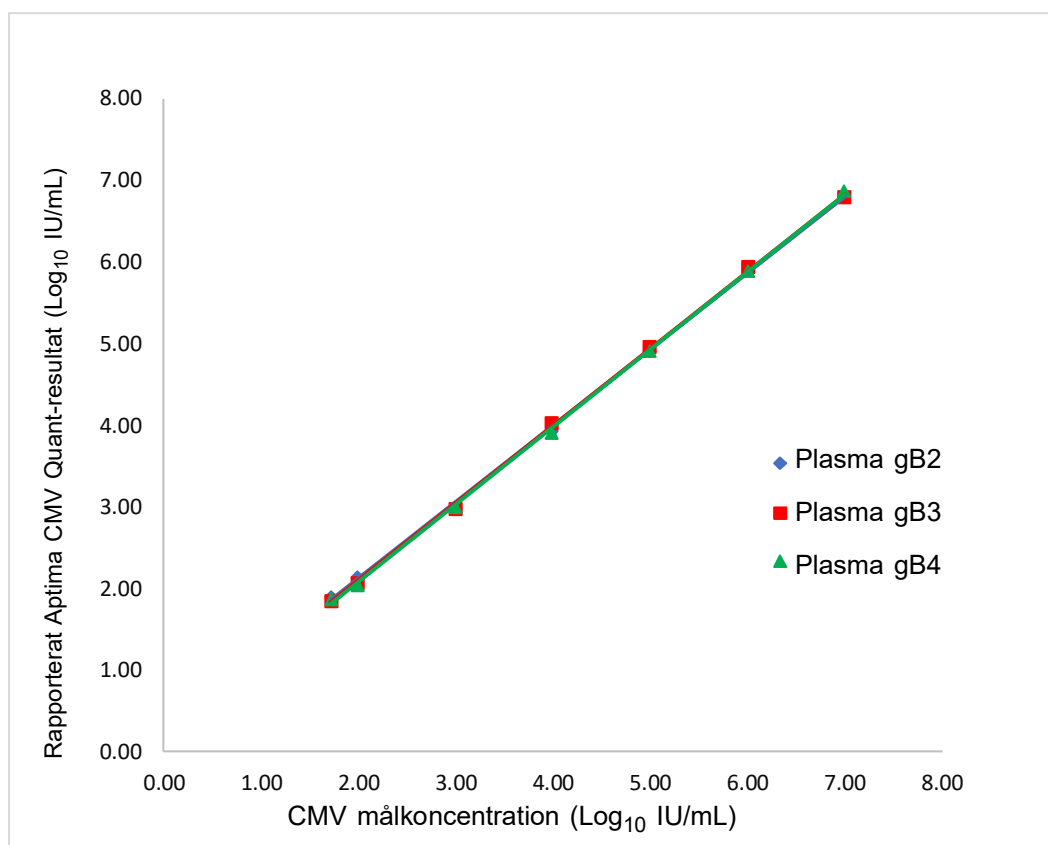


Figur 8. Linjäritet i helblod

Linjäritet för CMV-genotyper

Linjäritet i plasma för CMV-genotyper

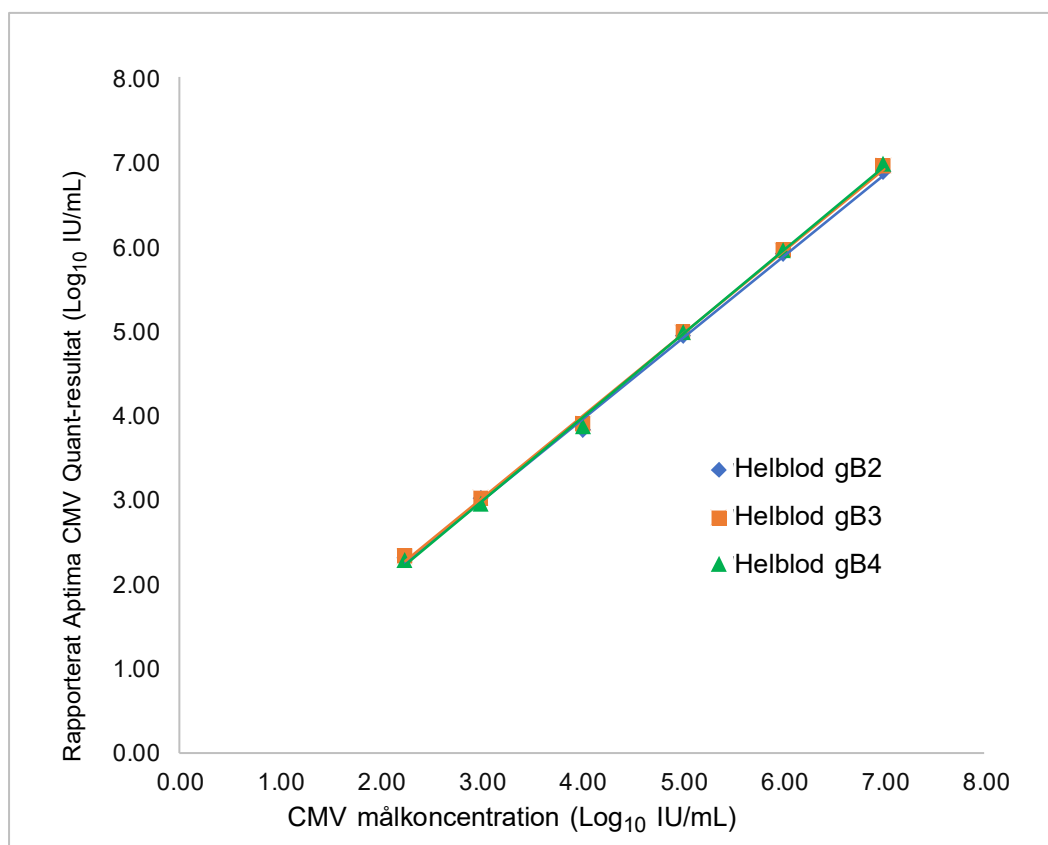
Linjäritet för glykoprotein-genotyperna gB-2, gB-3 och gB-4 verifierades genom att testa CMV-paneler utspädda med CMV-negativ plasma vid koncentrationer från 1,72 log IU/mL till 7,00 log IU/mL. Linjäritet påvisades i det intervallet för alla testade genotyper, se Figur 9.



Figur 9. Linjäritet för CMV-genotyper gB-2, gB-3 och gB-4 in plasma

Linjäritet i helblod för CMV-genotyper

Linjäritet för glykoprotein-genotyperna gB-2, gB-3 och gB-4 verifierades genom att testa CMV-paneler utspädda med CMV-negativt helblod vid koncentrationer från 2,25 log IU/mL till 7,00 log IU/mL. Linjäritet påvisades i det intervallet för de tre genotyper som testades, se Figur 10.



Figur 10. Linjäritet för CMV-genotyper gB-2, gB-3 och gB-4 i helblod

Nedre kvantifieringsgräns enligt WHO:s första internationella standard

LLOQ definieras som den lägsta koncentration vid vilken CMV DNA är tillförlitligt kvantifierat inom en felmarginal – enligt CLSI EP17-A2¹⁴ Felmarginalen (total error) uppskattades med hjälp av Westgard-modellen: Total Error (TE) = |bias| + 2SD. För att garantera mätningarnas exakthet och precision bestämdes felmarginalen för Aptima CMV Quant Assay till 1 log IU/mL (det vill säga att vid LLOQ är en skillnad på mer än 1 log IU/mL mellan två mätningar statistiskt signifikant).

Nedre kvantifieringsgräns i plasma enligt WHO:s andra standard

LLOQ fastställdes genom paneltest med WHO:s första internationella standard (NIBSC-kod 09/162, genotyp gB-1) för CMV DNA utspädd i CMV-negativ plasma från människa. 60 replikat av varje utspädning testades med var och en av de tre reagensbatcherna för totalt 180 replikat per utspädning. LLOQ-resultaten för de tre reagensbatcherna visas i Tabell 7. Resultaten från reagensbatchen med den högsta koncentration som uppfyller TE-kraven och med detektering $\geq 95\%$ sammanfattas i Tabell 8. Den LLOQ som tas fram med WHO:s första internationella standard för CMV i plasma är 53 IU/mL.

Tabell 7: Bestämning av LLOQ vid användning av WHO:s första internationella standard för CMV utspädd i plasma

Reagensbatch	N	N detekterat	Målkoncentration	Aptima CMV Quant	SD	Bias	Beräknat TE
			(log IU/mL)	(log IU/mL)	(log IU/mL)	(log IU/mL)	(log IU/mL)
1	60	56	1,48	1,64	0,36	0,16	0,87
	60	59	1,54	1,72	0,29	0,18	0,76
	60	59	1,60	1,74	0,28	0,14	0,70
	60	59	1,70	1,85	0,19	0,15	0,53
2	60	56	1,48	1,56	0,29	0,09	0,67
	60	58	1,54	1,61	0,27	0,07	0,60
	60	58	1,60	1,69	0,28	0,09	0,64
	60	60	1,70	1,83	0,24	0,14	0,62
3	60	56	1,48	1,67	0,26	0,19	0,71
	60	58	1,54	1,67	0,24	0,13	0,60
	60	60	1,60	1,78	0,19	0,18	0,55
	60	60	1,70	1,87	0,22	0,17	0,61

SD = standardavvikelse

Panelmedlemmar som uppfyllde målet för noggrannhet (TE är ≤ 1) och $\geq 95\%$ detektering för reagensbatcher 1, 2 och 3 har skuggats.

Tabell 8: Sammanfattning av LLoQ för plasma vid användning av WHO:s första internationella standard för CMV.

Reagensbatch	(IU/mL)	(log IU/mL)
1	53	1,72
2	41	1,61
3	47	1,67

Nedre kvantifieringsgräns i helblod enligt WHO:s standard

LoD fastställdes genom paneltest med WHO:s första internationella standard för CMV DNA utspädd i CMV-negativt helblod från människa. 60 replikat av varje utspädning testades med var och en av de tre reagensbatcherna för totalt 180 replikat per utspädning. Resultaten för de tre reagensbatcherna visas i Tabell 9. Resultaten från reagensbatchen med den högsta koncentration som uppfyller TE-kraven och med detektering $\geq 95\%$ sammanfattas i Tabell 9. Den LLoQ som tas fram med WHO:s första internationella standard för CMV i helblod är 176 IU/mL.

Tabell 9: Bestämning av LLoQ vid användning av WHO:s första internationella standard för CMV utspädd i helblod

Reagensbatch	N	N detekterat	Målkoncentration	Aptima CMV Quant	SD	Bias	Beräknat TE
			(log IU/mL)	(log IU/mL)	(log IU/mL)	(log IU/mL)	(log IU/mL)
1	60	58	2,11	2,06	0,47	0,06	1,00
	60	59	2,16	2,04	0,51	0,12	1,14
	60	60	2,20	2,14	0,44	0,06	0,94
	60	59	2,24	2,28	0,26	0,04	0,56
2	60	60	2,11	2,02	0,42	0,09	0,93
	60	60	2,16	2,12	0,26	0,04	0,56
	60	59	2,20	2,14	0,30	0,07	0,67
	60	60	2,24	2,26	0,26	0,02	0,53
3	60	59	2,11	2,25	0,43	0,13	1,00
	60	59	2,16	2,34	0,27	0,18	0,72
	60	60	2,20	2,38	0,30	0,17	0,77
	60	60	2,24	2,39	0,30	0,15	0,74

SD = standardavvikelser

Panelmedlemmar som uppfyllde målet för noggrannhet ($TE \leq 1$) och $\geq 95\%$ detektering för reagensbatcher 1, 2 och 3 har skuggats.

Tabell 10: Sammanfattning av LLoQ för helblod vid användning av WHO:s första internationella standard för CMV.

Reagensbatch	(IU/mL)	(log IU/mL)
1	138	2,14
2	106	2,02
3	176	2,25

Bestämning av nedre kvantifieringsgräns för CMV-genotyper och läkemedelsresistenta mutanter

Nedre kvantifieringsgräns för genotyper och läkemedelsresistenta mutanter i plasma

Den LLoQ som fastställts med WHO-standarderna verifierades genom att testa utspädningar av CMV-genotyper gB-2, gB-3 och gB-4 och läkemedelsresistenta mutanter i CMV-negativ plasma från människa. 60 replikat på varje panelmedlem testades med en reagensbatch. Resultaten visas i Tabell 11. Den beräknade LLoQ för genotyper gB-2, gB-3, gB-4 och läkemedelsresistenta mutanter från reagensbatchen med den högsta koncentration som uppfyller TE-kraven och med detektering $\geq 95\%$ sammanfattas i Tabell 12. Sammantaget är LLoQ i plasma i den här analysen 53 IU/mL.

Obs! Resultaten med Aptima CMV Quant Assay med läkemedelsresistenta mutanter av cytomegalovirus utvärderades endast i plasmaprover.

Tabell 11: Bestämning av LLoQ för genotyper och läkemedelsresistenta mutanter i plasma

Genotyp	N	% Detekterat	Målkoncentration	Aptima CMV Quant	SD	Bias	Beräknat TE
			(log ₁₀ IU/mL)	(log ₁₀ IU/mL)	(log ₁₀ IU/mL)	(log ₁₀ IU/mL)	(log ₁₀ IU/mL)
gB-2	60	93,3	1,48	1,38	0,41	0,10	0,92
	60	96,7	1,54	1,39	0,39	0,16	0,95
	60	93,3	1,60	1,49	0,38	0,11	0,87
	60	96,7	1,65	1,70	0,24	0,04	0,51
	60	95,0	1,70	1,54	0,32	0,16	0,80
gB-3	60	91,7	1,48	1,27	0,38	0,20	0,97
	60	91,7	1,54	1,27	0,40	0,27	1,07
	60	88,3	1,60	1,31	0,47	0,29	1,23
	60	93,3	1,65	1,46	0,34	0,20	0,88
	60	91,7	1,70	1,57	0,29	0,13	0,71
	60	98,3	1,74	1,55	0,30	0,19	0,79

Tabell 11: Bestämning av LLoQ för genotyper och läkemedelsresistenta mutanter i plasma (continued)

Genotyp	N	% Detekterat	Målkonzentration	Aptima CMV Quant	SD	Bias	Beräknat TE
			(log ₁₀ IU/mL)	(log ₁₀ IU/mL)	(log ₁₀ IU/mL)	(log ₁₀ IU/mL)	(log ₁₀ IU/mL)
gB-4	60	96,7	1,48	1,38	0,39	0,09	0,88
	60	98,3	1,54	1,51	0,33	0,03	0,69
	60	95,0	1,60	1,66	0,36	0,06	0,79
	60	98,3	1,65	1,66	0,29	0,01	0,59
	60	100,0	1,70	1,70	0,24	0,00	0,48
Läkemedels-resistent mutant (UL54 och UL97)	60	95,0	1,48	1,57	0,32	0,10	0,74
	60	98,3	1,54	1,58	0,32	0,04	0,68
	60	98,3	1,60	1,72	0,33	0,12	0,79
	60	100,0	1,65	1,74	0,22	0,08	0,51
	60	100,0	1,70	1,83	0,24	0,14	0,61
Läkemedels-resistent mutant (UL56)	60	95,0	1,48	1,54	0,28	0,07	0,64
	60	96,7	1,54	1,60	0,30	0,06	0,65
	60	100,0	1,60	1,69	0,26	0,08	0,60
	60	100,0	1,65	1,78	0,29	0,12	0,71
	60	100,0	1,70	1,74	0,27	0,05	0,58

SD = standardavvikelser

Panelmedlemmar som uppfyllde målet för noggrannhet (TE ≤ 1) och ≥ 95 % detektering för reagensbatcher 1, 2 och 3 har skuggats.

Tabell 12: Sammanfattning av LLoQ för genotyper och läkemedelsresistenta mutanter i plasma

Genotyp	LLoQ	
	(IU/mL)	(log ₁₀ IU/mL)
gB-2	50	1,70
gB-3	35	1,55
gB-4	24	1,38
Läkemedelsresistent mutant UL54 och UL97*	38	1,57
Läkemedelsresistent mutant UL56**	35	1,54

*UL54-genmutationer kan leda till korsresistens mot flera antivirala läkemedel för behandling av CMV-infektion, t.ex. ganciklovir (GCV), cidofovir (CDV) och foscarnet (PFA). UL97-genmutationer leder även till resistens mot ganciclovir (GCV).

**UL56-genmutationer leder till resistens mot letermovir (LET).

Nedre kvantifieringsgräns för genotyper i helblod

Den LLoQ som fastställts med WHO-standarderna verifierades genom att testa utspädningar av CMV-genotyper gB-2, gB-3 och gB-4 i CMV-negativt helblod från människa. 60 replikat på varje panelmedlem testades med en reagensbatch. Resultaten visas i Tabell 13. LLoQ för genotyper gB-2, gB-3 och gB-4 från reagensbatchen med den högsta koncentration som uppfyller TE-kraven och med detektering $\geq 95\%$ sammanfattas i Tabell 14. Sammantaget är LLoQ i helblod i den här analysen 176 IU/mL.

Tabell 13: Bestämning av LLoQ i genotyper i helblod

Genotyp	N	N detekterat	Målkoncentration	Aptima CMV Quant	SD	Bias	Beräknat TE
			(log IU/mL)	(log IU/mL)	(log IU/mL)	(log IU/mL)	(log IU/mL)
gB-2	60	56	2,08	1,77	0,43	0,30	1,16
	60	56	2,15	1,87	0,39	0,27	1,06
	60	56	2,20	1,80	0,59	0,40	1,58
	60	58	2,26	1,97	0,41	0,28	1,11
	60	59	2,30	2,06	0,50	0,24	1,24
	60	57	2,34	2,01	0,52	0,33	1,38
	60	59	2,38	2,11	0,36	0,27	1,00
	60	60	2,41	2,19	0,30	0,23	0,84
gB-3	60	46	2,08	1,73	0,59	0,35	1,53
	60	54	2,15	1,78	0,50	0,36	1,37
	60	54	2,20	1,87	0,50	0,33	1,34
	60	58	2,26	2,02	0,52	0,23	1,27
	60	58	2,30	2,02	0,32	0,28	0,92
gB-4	60	55	2,08	1,78	0,53	0,30	1,37
	60	57	2,15	1,97	0,40	0,18	0,97
	60	58	2,20	2,09	0,39	0,12	0,89

SD = standardavvikelser

Tabell 14: Bestämning av LLoQ i genotyper i helblod

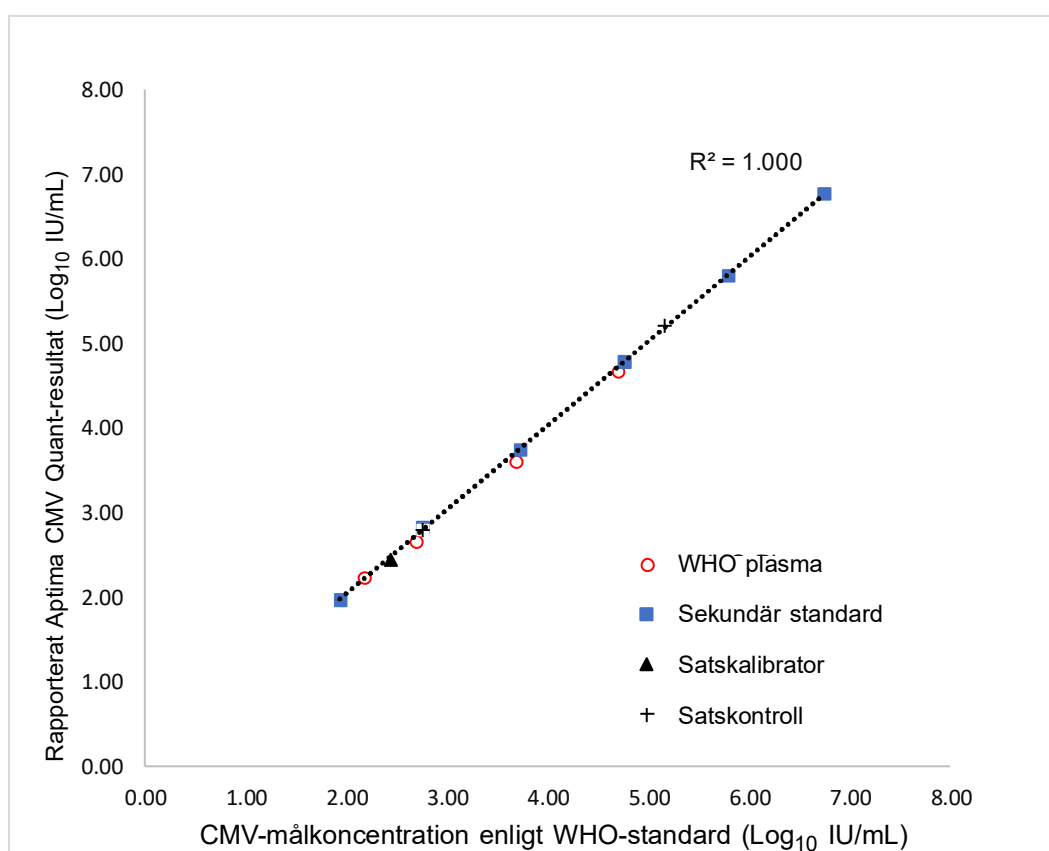
Genotyp	LLoQ	
	(IU/mL)	(log IU/mL)
gB-2	129	2,11
gB-3	104	2,02
gB-4	93	1,97

Spårbarhet till WHO:s första internationella standard

En serie sekundära standarder med kända koncentrationer användes genomgående i produktutvecklingen och produkttillverkningen för att etablera spårbarhet till WHO-standard. WHO:s CMV-standard späddes ut och testades tillsammans med de sekundära standarderna såväl som analyskontroller och kalibratorer som används i Aptima CMV Quant Assay för att bedöma spårbarhet enligt CLSI EP32-R.¹⁶ För de sekundära standarderna var koncentrationsintervallet 1,80 till 6,60 log₁₀ IU/mL.

Spårbarhet till WHO-standard med plasma

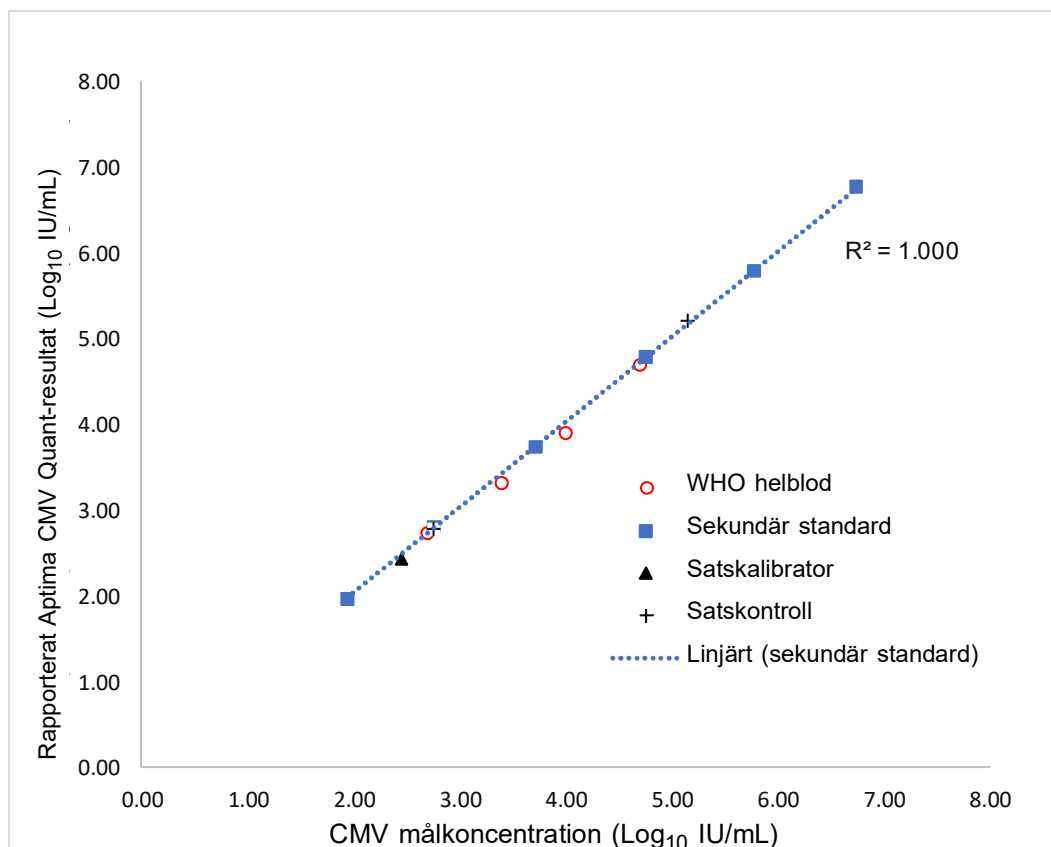
Koncentrationerna som testades för WHO:s CMV-standard låg mellan 2,18 och 4,70 log₁₀ IU/mL. WHO-plasmapanelerna, sekundära standarder, analyskontroller och analyskalibratorer återfanns i enlighet med förväntade värden över analysens linjära intervall, vilket ses i Figur 11.



Figur 11. Spårbarhet mellan WHO:s första CMV-standard för målkoncentrationer och rapporterade koncentrationer i Aptima CMV Quant Assay (WHO-standard utspädd i plasma)

Spårbarhet till WHO-standarden med helblod

Koncentrationerna som testades för WHO:s CMV-standard i helblod låg mellan 2,70 och 4,70 log₁₀ IU/mL. Helblodspanelerna med WHO-standarder, sekundära standarder, analyskontroller och analyskalibratorer återfanns i enlighet med förväntade värden över analysens linjära intervall, vilket ses i Figur 12.



Figur 12. Spårbarhet mellan WHO:s första CMV-standard för målkoncentrationer och rapporterade koncentrationer i Aptima CMV Quant Assay (WHO-standard utspädd i helblod)

Precision

Plasma

För att utvärdera precisionen gjordes en panel med 6 medlemmar genom att späda ut CMV-positiva kliniska provmaterial eller odlad CMV med CMV-negativ plasma. Panelen testades av tre operatörer som använde tre reagensloter på tre Panther-system under 20 eller fler dagar. Varje operatör utförde två körningar per dag och varje panelmedlem testades i duplikat vid varje körning. Studien utformades och analyserades enligt rekommendationer från CLSI EP-05-A3.¹⁷

Tabell 15 visar analysresultatens precision (i form av log IU/mL) mellan instrument, mellan operatörer, mellan reagensbatcher, mellan körningar, mellan dagar, inom körningar och totalt. Den totala variabiliteten berodde primärt på variabilitet inom körningar (dvs. slumpfel).

Tabell 15: Precision hos Aptima CMV Quant Assay i plasma

N	Genomsnittlig koncentration (log IU/mL)	Mellan batcher SD	Mellan instrument SD	Mellan operatörer SD	Mellan dagar SD	Mellan körningar SD	Inom körning SD	Totalt SD
108	2,28	0,02	0,04	0,00	0,00	0,06	0,16	0,18
108	2,82	0,06	0,00	0,00	0,04	0,07	0,11	0,14
108	3,49	0,07	0,00	0,01	0,06	0,06	0,11	0,15
108	4,53	0,04	0,02	0,04	0,00	0,07	0,07	0,11
108	5,57	0,06	0,00	< 0,001	0,04	0,02	0,09	0,12
108	6,67	0,06	0,03	0,00	0,00	0,00	0,10	0,12

SD = standardavvikelse

Obs! Variabiliteten för vissa faktorer kan vara numeriskt negativ, vilket kan inträffa om variabiliteten på grund av dessa faktorer är mycket liten. När detta sker visas SD som 0.

Helblod

För att utvärdera precisionen gjordes en panel med 6 medlemmar genom att späda ut CMV-positiva kliniska provmaterial med eller tillsats av odlad CMV i CMV-negativt helblod. Panelen testades av tre operatörer som använde tre reagensloter på tre Panther-system under 20 eller fler dagar. Varje operatör utförde två körningar per dag och varje panelmedlem testades i duplikat vid varje körning

Tabell 16 visar analysresultatens precision (i form av log IU/mL) mellan instrument, mellan operatörer, mellan batcher, mellan körningar, mellan dagar, inom körningar och totalt. Den totala variabiliteten berodde primärt på grund av variabilitet inom körningar (det vill säga slumpfel).

Tabell 16: Precision hos Aptima CMV Quant Assay i helblod

N	Genomsnittlig koncentration (log IU/mL)	Mellan batcher SD	Mellan instrument SD	Mellan operatörer SD	Mellan dagar SD	Mellan körning SD	Inom körning SD	Totalt SD
108	2,78	0,00	0,01	0,05	0,00	0,08	0,14	0,17
108	3,38	0,03	0,00	0,04	0,00	0,00	0,13	0,14
108	3,95	0,06	0,00	0,07	0,05	0,05	0,13	0,18
108	4,76	0,03	0,01	0,08	0,00	0,07	0,12	0,16
108	5,64	0,01	0,00	0,07	0,00	0,00	0,11	0,13
108	6,74	0,03	0,00	0,05	0,00	0,04	0,09	0,12

SD = standardavvikelse

Obs! Variabiliteten för vissa faktorer kan vara numeriskt negativ, vilket kan inträffa om variabiliteten på grund av dessa faktorer är mycket liten. När detta sker visas SD som 0.

Potentiellt interfererande substanser

Aptima CMV Quant Assays känslighet för interferens från förhöjda nivåer av endogena substanser, antikoagulantia och läkemedel som ofta ordinerats till transplantationspatienter utvärderades. Testkoncentrationerna för vardera av substanserna som kan interferera valdes baserat på tillgängliga referenser från litteraturen samt riktlinjer från CLSI EP07¹⁸ och EP37¹⁹. CMV-negativa plasmaprover och prover med CMV-tillsats till en koncentration av 2,22 log IU/mL och 3,30 log IU/mL testades. CMV-negativa helblodsprouver och prover med CMV-tillsats till en koncentration av 2,72 log IU/mL och 4,00 log IU/mL CMV DNA testades för hemoglobin.

Ingen interferens observerades för plasmaproven gällande resultaten för analysen i närvaro av albumin (60 mg/mL), hemoglobin (10 mg/mL), triglycerider (15 mg/mL), okunjungerat bilirubin (0,4 mg/mL) eller genomiskt DNA från människa (2 mg/mL). För helblodsprouver observerades ingen interferens med analysresultaten vid närvaro av tillsats av hemoglobin på 100 mg/mL i helblodsprouver.

Kliniska plasmaprover från patienter med förhöjda nivåer av specifika substanser eller från patienter med de sjukdomar som anges i Tabell 17 testades med Aptima CMV Quant Assay. Ingen interferens observerades gällande analysens resultat.

Tabell 17: Kliniska provtyper som testats

	Kliniska provtyper	Antal kliniska prover som testats
1	Antinukleär antikropp (ANA)	10
2	Systemisk lupus erythematosus (SLE)	10
3	Ledgångsreumatism (RA)	10

Ingen interferens observerades gällande resultaten för analysen i närvaro av de exogena substanser som anges i Tabell 18 vid koncentrationer på minst tre gånger C_{max} för läkemedel i plasma från människa.

Tabell 18: Exogena substanser

Exogen substanspool	Analyserade exogena substanser
1	Cefotetan, kaliumklavulanat, Ticarcillin disodium, vancomycin
2	Piperacillin
3	Sulfametoxazol
4	Tazobaktam som natriumsalt, trimetoprim, fluconazol
5	Ganciclovir, valganciclovir, cidofovir, foscarnet, valacyclovir, acyclovir, letermovir
6	Azathioprin, ciklosporin, mykofenolatmofetil, mykofenolsyra
7	Sirolimus, tacrolimus, prednison, everolimus
8	Natriumcitrat, EDTA, heparin

Specificitet

Specificitet fastställdes genom att testa 780 frysta CMV-negativa kliniska provmaterial. Specificiteten beräknades som procentandelen av CMV-negativa prov med resultat "Ej detekterat" jämfört med totala antalet prov som testats för varje provtyp.

CMV DNA detekterades ej i 389 prov för plasma och 390 prov för helblod. Specificiteten var 99,7 % (389/390, 95 % CI: 98,6–100 %) för plasma och 100 % (390/390, 95 % CI: 99,3–100 %). Kombinerad specificitet hos Aptima CMV Quant Assay för plasma och helblod var 99,9 % (779/780, 95 % CI: 99,3–100 %).

Tabell 19: Specificitet i plasma- och helblodsprov

	Plasma	Helblod	Plasma & helblod
Giltiga replikat (n)	390	390	780
Ej detekterat	389	390	779
Specificitet (95 % CI)	99,7 % (98,6–100)	100 % (99,3–100)	99,9 % (99,3–100)

CI = konfidensintervall

Analytisk specificitet

Potentiell korsreaktivitet för patogenerna i Tabell 20 utvärderades för CMV-negativ plasma från människa i närvaro eller frånvaro av 2,2 log IU/mL och 3,3 log IU/mL CMV. Tre blodparasiter som finns i helblodsprov utvärderades också för CMV-negativt helblod från människa i närvaro eller frånvaro av 2,7 log IU/mL och 4,0 log IU/mL CMV. Patogener testades vid högsta tillgängliga koncentrationen. Ingen korsreaktivitet eller interferens observerades.

Tabell 20: Patogener som har testats för analytisk specificitet

Mikroorganism/patogen	Koncentration	Mikroorganism/patogen	Koncentration
Adenovirus typ 4	1 886 TCID50/mL ^a	<i>Mycobacterium intracellulare</i>	1 000 000 CFU/mL
BK polyomavirus	1 000 000 cp/mL ^b	<i>Mycoplasma genitalium</i>	1 000 000 CFU/mL
Epstein-Barrvirus	1 000 000 cp/mL	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	1 000 000 CFU/mL
Hepatit B-virus	1 000 000 IU/mL ^c	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1 000 000 CFU/mL
Hepatit C-virus	1 000 000 cp/mL	<i>Propionibacterium acnes</i>	1 000 000 CFU/mL
Herpes simplex-virus typ 1	1 428 571 TCID50/mL	<i>Salmonella enterica</i> serovar typhimurium	1 000 000 CFU/mL
Herpes simplex-virus typ 2	147 143 TCID50/mL	<i>Staphylococcus aureus</i>	1 000 000 CFU/mL
HIV-1 subtyp B	1 000 000 cp/mL	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1 000 000 CFU/mL
Mänskligt herpesvirus 6A	1 000 000 cp/mL	<i>Streptococcus agalactiae</i>	1 000 000 CFU/mL
Mänskligt herpesvirus 7	1 428 571 TCID50/mL	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1 000 000 CFU/mL
Mänskligt herpesvirus 8	1 000 000 cp/mL	<i>Streptococcus pyogenes</i>	1 000 000 CFU/mL
Mänskligt metapneumovirus	192 857 TCID50/mL	<i>Aspergillus niger</i>	485 000 CFU/mL
Mänskligt papillomavirus typ 18	1 000 000 cp/mL	<i>Candida albicans</i>	1 000 000 CFU/mL
Mänskligt parainfluenzavirus	944 TCID50/mL	<i>Cryptococcus neoformans</i>	1 000 000 CFU/mL
Influenzavirus	3 857 TCID50/mL	<i>Trichomonas vaginalis</i>	1 000 000 celler/mL
Rhinovirus	7 257 TCID50/mL	<i>Leishmania major</i> *	1 000 000 celler/mL
Varicella zoster-virus	1 000 000 cp/mL	<i>Babesia microti</i> *	1 000 000 celler/mL
Zikavirus	29 286 TCID50/mL	<i>Plasmodium falciparum</i> *	1 000 000 celler/mL
<i>Chlamydia trachomatis</i>	1 000 000 CFU/mL ^d	^a TCID50 U/mL = Infektiös dos i vävnadskultur, enheter per mL	
<i>Clostridium perfringens</i>	1 000 000 CFU/mL	^b cp/mL = Viruspartiklar (copies) per mL	
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	1 000 000 CFU/mL	^c IU/mL = Internationella enheter per mL	
<i>Enterococcus faecalis</i>	1 000 000 CFU/mL	^d CFU/mL = Kolonibildande enheter per mL	
<i>Escherichia coli</i>	1 000 000 CFU/mL	*testats med helblodsprovtyp	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1 000 000 CFU/mL		
<i>Listeria monocytogenes</i>	1 000 000 CFU/mL		

Korskontamination

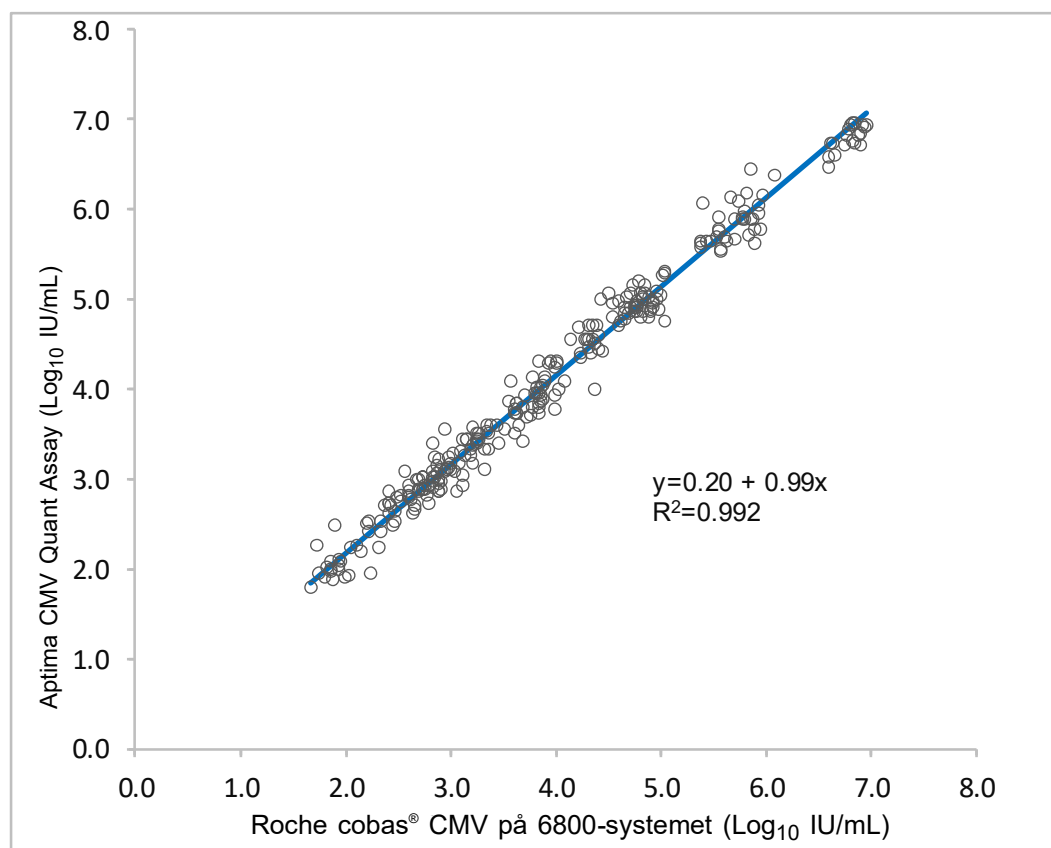
Korskontamination har utvärderats för Panther-systemet med plasma som provtyp med hjälp av andra virusbelastningsanalyser (Aptima HIV-1 Quant Dx Assay, Aptima HCV Quant Assay, Aptima HBV Quant Assay). Ingen korskontamination observerades vid tidigare testande. För att fastställa att Panther-systemet minimerar risken för falska positiva resultat på grund av överförd kontamination i helblodsprovtypen, genomfördes en studie med paneler med tillsatser på tre Panther-system. Korskontamination utvärderades med helblodsprover med tillsats av CMV DNA med höga titrer (6 log IU/mL) spridda mellan CMV-negativa prover i ett schackrutigt mönster. Testet gjordes över tolv körningar. Sammantaget var korskontaminationsfrekvensen 0,24 % (1/423).

Metodkorrelation

Studien utformades i enlighet med CLSI EP09c.¹⁹

Metodkorrelation för plasma

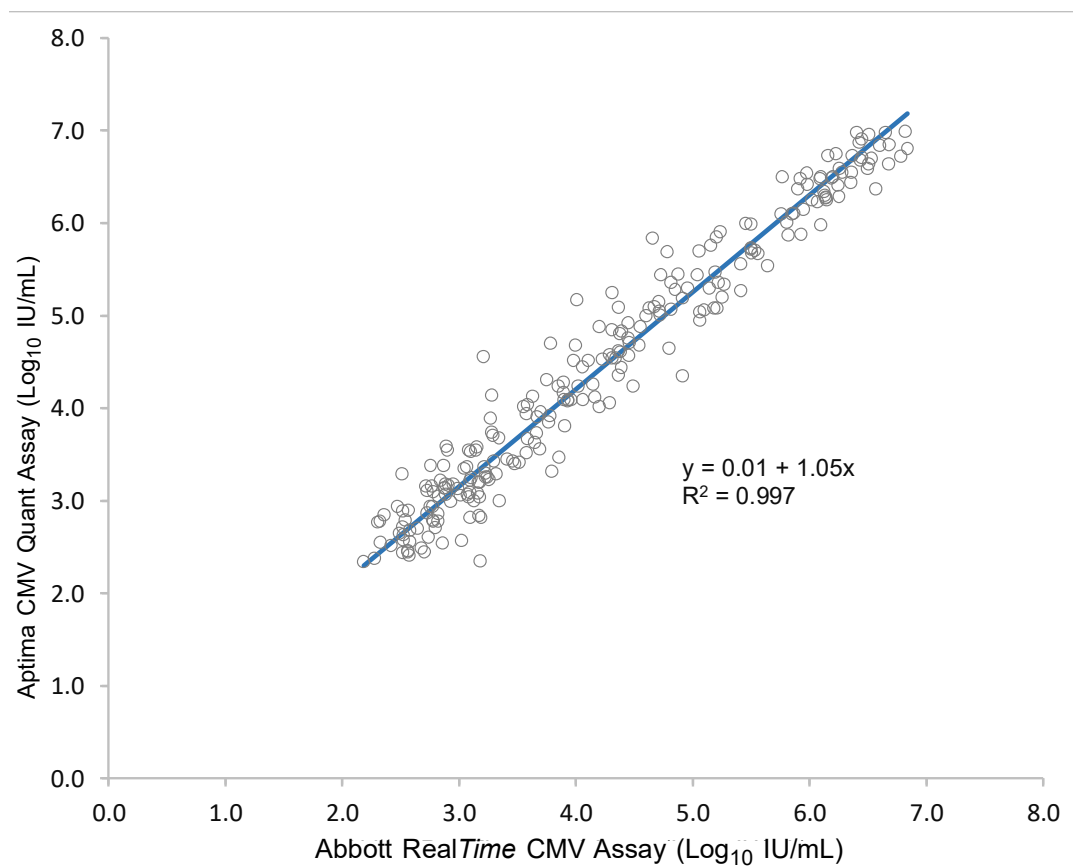
Resultaten med Aptima CMV Quant Assay utvärderades gentemot Roche cobas® CMV på cobas® 6800-systemet genom att testa utspädda kliniska prov från CMV-positiva patienter och konstruerade prov bestående av diverse stammar av odlat virus från alla fyra genotyper tillsatta i EDTA plasma från individuella donatorer. Sammanlagt 160 kliniska prov och 115 konstruerade prov inom det linjära intervall som är gemensamt för båda analyserna användes för Deming-regression, så som visas i Figur 13.



Figur 13. Korrelation mellan CMV-belastning med Aptima CMV Quant Assay och Roche cobas® CMV Assay vid test av plasmavprov

Metodkorrelation för helblod

Resultaten med Aptima CMV Quant Assay utvärderades gentemot Abbott CMV RealTime Assay på m2000-plattformen genom att testa utspädda kliniska prov från CMV-positiva patienter och konstruerade prov gjorda med odlad virus tillsatt i EDTA helblod från individuella negativa donatorer. Sammanlagt 159 kliniska prover och 83 konstruerade prov inom det linjära intervall som är gemensamt för båda analyserna användes för Deming-regression, så som visas i Figur 14.



Figur 14. Korrelation mellan CMV-belastning med Aptima CMV Quant Assay och Abbott RealTime CMV Assay vid test av helblodsprov

Reproducerbarhet

Reproducerbarhet i plasmaprover

Reproducerbarhet hos Aptima CMV Quant Assay i plasma utvärderades på tre externa platser. Två operatörer utförde testning på respektive plats. Varje operatör utförde en analys per dag i 5 dagar, med en reagenbatch under testningens gång. Varje analys hade tre replikat av varje panelmedlem.

Reproducerbarheten testades med användning av panelmedlemmar som preparerats genom att späda ut CMV-positiva kliniska provmaterial eller odlad CMV med CMV-negativ EDTA plasma. DNA-koncentrationerna av CMV låg inom analysens linjära intervall.

Tabell 21 visar reproducerbarheten och precisionen hos analysresultaten för varje positiv panelmedlem mellan platser, mellan operatörer, mellan dagar, mellan körningar, inom körningar samt totalt. Variationskoefficienten beräknades med hjälp av följande ekvation där σ^2 är variansen i provet för data efter \log_{10} -transformation.

$$\%CV = 100 \times \sqrt{10^{\sigma^2} \times \ln(10) - 1}$$

Tabell 21: Reproducerbarhet hos DNA-nivåerna hos CMV i Aptima CMV Quant Assay på Panther System hos positiva panelmedlemmar i plasma

N	Observerat medelvärde		Bidrag till total varians SD (%CV ²)					Total varians SD (%CV)
	IU/mL	Log ₁₀ IU/mL	Mellan Platser	Mellan Operatörer	Mellan Dagar	Mellan analyser	Inom analyser	
90	198,33	2,26	0,05 (11,19)	0,00 (0)	0,06 (12,94)	0,00 (0)	0,17 (39,59)	0,18 (43,68)
90	603,27	2,76	0,02 (3,99)	< 0,01 (2,22)	0,07 (15,68)	0,04 (10,25)	0,12 (27,04)	0,14 (33,67)
90	2428,54	3,36	0,06 (12,83)	0,00 (0)	0,09 (21,42)	0,06 (12,83)	0,11 (24,69)	0,16 (38,27)
90	27623,02	4,42	0,07 (15,98)	0,00 (0)	0,04 (9,29)	0,06 (13,85)	0,08 (19,38)	0,13 (30,63)
90	284107,74	5,44	0,07 (15,58)	0,00 (0)	0,04 (10,22)	0,00 (0)	0,09 (21,66)	0,12 (28,90)
90	3821364,62	6,57	0,08 (19,12)	0,00 (0)	0,06 (14,22)	0,02 (4,02)	0,08 (17,45)	0,13 (30,25)

%CV=log-normal variationskoefficient, SD=standardavvikelse (log₁₀ IU/mL)

Obs! Variabiliteten från vissa faktorer kan vara numeriskt negativ. Detta kan ske om variabiliteten är mycket liten på grund av dessa faktorer. I dessa fall visas SD och %CV som 0.

Reproducerbarhet i helblodsprover

Reproducerbarhet hos Aptima CMV Quant Assay i helblod utvärderades på tre externa platser. Två operatörer utförde testning på respektive plats. Varje operatör utförde en analys per dag i 5 dagar, med en reagenbatch under testningens gång. Varje analys hade tre replikat av varje panelmedlem.

Reproducerbarheten testades med användning av panelmedlemmar som preparerats genom att späda ut CMV-positiva kliniska provmaterial eller odlad CMV med CMV-negativt EDTA-helblod. DNA-koncentrationerna av CMV låg inom analysens linjära intervall.

Tabell 22 visar reproducerbarheten och precisionen hos analysresultaten för varje positiv panelmedlem mellan platser, mellan operatörer, mellan dagar, mellan körningar, inom körningar samt totalt, exklusive ett observerat avvikande värde (0,2 %, 1/533). Variationskoefficienten beräknades med hjälp av följande ekvation där σ^2 är variansen i provet för data efter \log_{10} -transformation.

$$\%CV = 100 \times \sqrt{10^{\sigma^2 \times \ln(10)} - 1}$$

För alla CMV-positiva och CMV-negativa panelmedlemmar var överensstämmelsevärdena 100 %.

Tabell 22: Reproducerbarhet hos DNA-nivåerna hos CMV i Aptima CMV Quant Assay på Panther System hos positiva panelmedlemmar i helblod

N	Observerat medelvärde		Bidrag till total varians SD (%CV ²)					Total varians SD (%CV)
	IU/mL	Log ₁₀ IU/mL	Mellan Platser	Mellan Operatörer	Mellan Dagar	Mellan analyser	Inom analyser	
89	604,32	2,73	0,00 (0)	0,00 (0)	0,00 (0)	0,11 (25,39)	0,18 (43,23)	0,21 (51,32)
89	2188,59	3,32	< 0,01 (0)	0,00 (0)	0,00 (0)	0,07 (15,25)	0,11 (25,34)	0,13 (29,83) ^a
89	7830,84	3,87	0,04 (8,75)	0,04 (8,16)	0,00 (0)	0,08 (17,71)	0,13 (30,28)	0,16 (37,70)
88	48897,12	4,66	0,03 (7,11)	0,00 (0)	0,00 (0)	0,10 (22,47)	0,11 (24,99)	0,15 (34,89)
88	375626,91	5,56	0,04 (9,59)	0,04 (9,96)	0,00 (0)	0,05 (12,04)	0,09 (21,18)	0,12 (28,34)
89	4609046,44	6,64	0,08 (18,15)	0,00 (0)	0,05 (11,42)	0,03 (6,32)	0,10 (22,74)	0,14 (32,39)

%CV=log-normal variationskoefficient, SD=standardavvikelse (log₁₀ IU/mL)

Obs: Variabiliteten från vissa faktorer kan vara numeriskt negativ. Detta kan ske om variabiliteten är mycket liten på grund av dessa faktorer. I dessa fall visas SD och %CV som 0.

^aTotalt variansresultat exklusive det avvikande resultatet som eventuellt kan bero på problem med provberedningen.

Bibliografi

1. **Bate SL, Dollard SC, Cannon MJ.** Cytomegalovirus Seroprevalence in the United States: The National Health and Nutrition Examination Surveys, 1988-2004. *Clinical Infectious Diseases* 2010; 50:531-540.
2. **Cannon MJ, Schmid DS, Hyde TB.** Review of Cytomegalovirus Seroprevalence and Demographic Characteristics Associated with Infection. *Reviews in Medical Virology* 2010;20:202-213.
3. **Wills MR, Poole E, Lau B, Krishna B, Sinclair JH.** The immunology of human cytomegalovirus latency: could latent infection be cleared by novel immunotherapeutic strategies *Cell and Mol Immunol.* 2015;12:128-138.
4. **Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, et al.** The Third International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid Organ Transplantation. *Transplantation.* 2018;102(6):900-931.
5. **Emery VC, Sabin CA, Cope AV, et al.** Application of Viral-Load Kinetics to Identify Patients who Develop Cytomegalovirus Disease After Transplantation. *Lancet.* 2000; 10;355(9220):2032-6.
6. **Humar A, Gregson D, Caliendo AM, et al.** Clinical Utility of Quantitative Cytomegalovirus Viral Load Determination for Predicting Cytomegalovirus Disease in Liver Transplant Recipients. *Transplantation.* 1999 ; 15;68(9):1305-11.
7. **Humar A, Kumar D, Gilbert C, et al.** Cytomegalovirus (CMV) Glycoprotein B Genotypes and Response to Antiviral Therapy, in Solid-Organ–Transplant Recipients with CMV Disease. *The Journal of Infectious Diseases.* 2003;188(4):581–4,
8. **Razonable RR, Hayden RT.** Clinical Utility of Viral Load in Management of Cytomegalovirus Infection After Solid Organ Transplantation. *Clinical Microbiology Reviews.* 2013; 26(4):703-727.
9. **de la Cámara R.** CMV in Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases.* 2016; 20;8(1):e2016031.
10. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2005. Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods; Approved Guideline. CLSI Document MM13-A. Wayne, PA.
11. **29 CFR Part 1910.1030.** Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens; current version.
12. **Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health.** Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL); current version.
13. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2002. Clinical Laboratory Waste Management. CLSI Document GP5-A2. Villanova, PA.
14. **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.
15. **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.
16. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2006. Metrological Traceability and Its Implementation; A Report. CLSI document EP32-R. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
17. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2014. Evaluation of Precision of Quantitative Measurement Procedures; Approved Guideline – Third Edition. CLSI document EO05-03. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
18. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2018. Interference testing in Clinical Chemistry – Third Edition. CLSI document EP07, 3rd Ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
19. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2018. Supplemental Tables for Interference Testing in Clinical Chemistry. CLSI document EP37, 1st Ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
20. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2018. Measurement Procedure Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples. CLSI document EP09c, 3rd Ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
21. **1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus (HCMV) for Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC 09/162),** Merlin strain

Kontaktinformation

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



Hologic (Australia & New Zealand) Pty
Ltd Macquarie Park NSW 2113

För landsspecifika e-postadresser och telefonnummer för tekniskt stöd och kundtjänst, besök www.hologic.com/support.

Hologic, Aptima och Panther är varumärken eller registrerade varumärken som tillhör Hologic, Inc. och/eller dess dotterbolag i USA och/eller andra länder.

Andra varumärken som kan förekomma i denna bipacksedel tillhör respektive ägare.

Den här produkten omfattas eventuellt av ett eller flera USA-patent som anges på www.hologic.com/patents.

© 2022 Hologic, Inc. Med ensamrätt.

AW-25509-1601 Rev. 003

2022-06