

# Xpert<sup>®</sup> HCV Viral Load

**REF** GXHCV-VL-CE-10 |  
GXHCV-VL-IN-10

# **Xpert HCV Viral Load**

Pouze k diagnostickému použití *in vitro*.

## **1 Obchodní název**

Xpert HCV Viral Load

## **2 Běžný nebo obvyklý název**

HCV VL

## **3 Použití**

Test Xpert® HCV VL firmy Cepheid využívající systém GeneXpert®, je určen pro rychlou kvantifikaci viru hepatitidy C (HCV) RNA v lidském séru nebo plazmě (EDTA) u HCV-infikovaných jedinců. Test využívá polymerázovou řetězovou reakci s reverzní transkripcí (RT-PCR) za použití fluorescence pro detekci RNA zájmu pro kvantifikaci HCV. Test Xpert HCV VL kvantifikuje genotypy HCV 1-6 v rozsahu 10 až 100.000.000 IU / mL. Test Xpert HCV VL slouží jako pomocná metoda při léčbě pacientů infikovaných HCV podstupujících antivirovou terapii. Test měří hladiny HCV RNA ve výchozím stavu a během léčby a mohou být testy použity k posouzení virologické odpovědi na HCV terapii. Výsledky testu Xpert HCV VL mohou být také použity k potvrzení HCV infekce u anti-HCV pozitivních jedinců. U anti-HCV pozitivních jedinců, u kterých byl test na HCV RNA negativní, použitím jiného anti -HCV testu, může být zjištěn rozdíl mezi skutečnou expozicí HCV a biologicky falešnou pozitivitou. Opakované testování na HCV RNA může být indikováno v případech, kdy jedinec byl v posledních 6 měsících vystaven expozici HCV, nebo má klinické příznaky hepatitidy C. Test není určen jako screeningový test na HCV u dárců krve.

## 4 Přehled a vysvětlení

HCV je členem čeledi Flaviviridae a byl uznán jako hlavní původce chronického onemocnění jater, včetně chronické aktivní hepatitidy, cirhózy a hepatocelulárního karcinomu.<sup>1</sup> Genom HCV se skládá z pozitivní RNA molekuly z přibližně 9500 nukleotidů.<sup>1</sup> HCV je obvykle přenášen perkutánně vystavení infikovanou krví, a to především při užívání drog a intravenózním příjmem nevyšetřených darovaných krevních produktů. Méně často, HCV bylo prokázáno, přenosem při povolání, perinatálním z matky na plod a sexuálním přenosem.<sup>2</sup>

Odhaduje se, že 185 milionů lidí, což je zhruba 3% světové populace, bylo infikováno virem HCV, a více než 80% žije v zemích s nízkým a středním příjmem (LMICs)<sup>3</sup> Onemocnění je nejčastější v rozvojových zemích; nejvyšší hlášená prevalence jsou v Číně (3,2%)<sup>4</sup> Pákistánu (4,8%)<sup>4</sup>, Nigérii (o 18,3%),<sup>5</sup> a Egyptu (22%).<sup>4</sup> Asi 15 milionů dospělých Evropanů je infikováno HCV a většina z těchto lidí si nejsou vědomi své infekce.<sup>6</sup> Každoročně, 350.000 až 500.000 lidí umírá na HCV - související onemocnění jater.<sup>7</sup>

Antivirové léky mohou vyléčit HCV, ale přístup k diagnostice a léčbě je omezený.<sup>7</sup> Léky na HCV infekci u většiny pacientů jsou vysoce efektivní. Bezpečná a přijatelná kombinace orálních přímo působících antivirových (DAAS), po dobu 8-24 týdnů.<sup>5</sup> Eradikace HCV je na prvním místě.<sup>5</sup>

Kvantifikace HCV RNA se osvědčila v poskytování metrického vyhodnocení účinnosti antivirové odpovědi na HCV. Směrnice pro řízení a zpracování HCV doporučuje kvantitativní testování HCV RNA před začátkem antivirové terapie, během terapie, a po ukončení léčby. Primárním cílem léčby je setrvalá virologická odpověď (SVR), definována jako nedetekovatelná HCV RNA citlivým testem, 12 nebo 24 týdnů po ukončení léčby, v závislosti na anti-HCV terapii.<sup>8</sup>

## 5 Princip stanovení

Systém GeneXpert automatizuje a sjednocuje purifikaci vzorku, amplifikaci nukleové kyseliny a detekci cílové sekvence v jednoduchých nebo komplexních vzorcích pomocí real-time PCR a RT-PCR testů, která využívá fluorescenci pro detekci RNA. Systém se skládá z přístroje, osobního počítače a nainstalovaného softwaru pro spuštění testů u odebraných vzorků a prohlížení výsledků. Systém vyžaduje použití jednorázových zásobníků s reagensiemi (dále jen zásobník) GeneXpert, které obsahují PCR reagensie a ve kterých

probíhá PCR. Protože jsou zásobníky uzavřené, není možná zkřížená kontaminace mezi vzorky. Bližší popis systému je uvedený v návodu k obsluze systému GeneXpert Dx (*GeneXpert Dx System Operator Manual* nebo *GeneXpert Infinity Operator Manual*).

Test Xpert HCV obsahuje reagentie pro detekci RNA HCV ve vzorcích a také dvě vnitřní kontroly pro kvantifikaci HCV RNA. Vnitřní kontroly jsou přidány před zpracováním vzorku a monitoruje oživení a přítomnost inhibitoru(ů) v reakcích RT a PCR. Test také obsahuje kontrolu sondy (Probe Check Control, PCC), která slouží k ověření rehydratace reagentií, integrity sondy a naplnění PCR zkumavek v zásobníku.

## 6 Reagentie a přístroje

### 6.1 Dodávaný materiál

Souprava Xpert HCV VL obsahuje reagentie pro zpracování 10 vzorků od pacientů nebo vzorků pro kontrolu kvality.

Souprava obsahuje:

<b>Xpert HCV zásobníky s integrovanými zkumavkami</b>	<b>10</b>
Kulička 1, kulička 2, kulička 3 (mrazem sušené)	1 v zásobníku
Lyzační reagentie (guanidiniumthiokyanát)	2,0 ml v zásobníku
Promývací reagentie	0,5 ml v zásobníku
Proplachovací reagentie	1,5 ml v zásobníku
Vazebné reagentie	2,4 ml v zásobníku
Proteináza K	0,48 ml v zásobníku
Jednorázové 1 ml pipety	10 v zásobníku
CD	1 v zásobníku
Definiční soubory (ADF)	
Instrukce k importu do ADF GeneXpert softwaru •	
Příbalový leták	

### Poznámky:

Bezpečnostní listy pro všechny reagentie použité v tomto testu jsou k dispozici na

[www.cepheidinternational.com](http://www.cepheidinternational.com)

Bovinní sérový albumin (BSA) použitý v tomto výrobku je vyrobený výhradně z boviní plazmy pocházející z USA. Zpracování BSA rovněž probíhá v USA. Zvířata nebyla krmena žádným proteinem od přežvýkavců ani jiným zvířecím proteinem; před i po úmrtí prošla zvířata testováním. Během zpracování nedošlo ke směšování materiálu s jinými zvířecími materiály.

## **7 Skladování a zpracování**

- Xpert HCV VL zásobníky a reagentie dlouhodobě skladujte při 2 – 28 °C.
- Zásobník neotvírejte, dokud nejste připraveni zahájit testování.
- Nepoužívejte zásobníky, které jsou vyteklé.
- Nepoužívejte reagentie ani zásobníky, který byly již jednou zmrazené.
- Nepoužívejte reagentie ani zásobníky s prošlou lhůtou expirace.

## **8 Požadovaný materiál, který není součástí soupravy**

- GeneXpert Dx Systém nebo GeneXpert Infinity Systems (katalogové číslo se liší podle konfigurace): přístroj GeneXpert, počítač s příslušným GeneXpert Dx Softwarem verze 4.6a nebo vyšší (GeneXpert Dx systems); nebo Xpertise 6.2a nebo vyšší (Infinity -80/Infinity-48s), snímač čárových kódů, návod k obsluze.
- Tiskárna
- Bělidlo nebo chlornan sodný

## **9 Upozornění a bezpečnostní opatření**

- Se všemi biologickými vzorky včetně zásobníků zacházejte jako s možnými přenašeči infekčních agens. Protože není možné vědět, které vzorky by mohly být infekční, je třeba při práci se všemi biologickými vzorky dodržovat univerzální bezpečnostní opatření. Pokyny pro zacházení se vzorky jsou k dispozici v americkém Centru pro kontrolu onemocnění (CDC)<sup>6</sup> a v Úřadu pro klinické a laboratorní standardizace (dříve Národní výbor pro klinické a laboratorní standardy).
- Dodržujte správnou laboratorní praxi a výměnu rukavic mezi manipulacemi se vzorky, aby se zabránilo kontaminaci vzorků nebo reagentií.
- Dodržujte bezpečnostní postupy vaší instituce pro práci s chemikáliemi a zpracování biologických vzorků.
- Nenahrazujte reagentie testu HCV VL jinými reagentiemi.

- Neotvírejte uzávěr zásobníku HCV VL, pouze při přidávání vzorku.
- Nepoužívejte zásobník, který po vyjmutí z obalu spadnul.
- Netřeste zásobníkem. Třepání nebo pád zásobníku po otevření víka může způsobit neplatné výsledky.
- Nepoužívejte zásobník, který má poškozenou reakční zkumavku.
- Nepoužívejte zásobník, který vytekl.
- Každý jednotlivý zásobník HCV VL je určen pro zpracování jednoho testu. Nepoužívejte opakovaně 1 zásobník.
- Jednorázové pipety jsou na jedno použití a používají se pro přenos 1 vzorku. Nepoužívejte znovu již použité pipety.
- Používejte čistý laboratorní plášť a rukavice. Vyměňte si rukavice mezi zpracováním každého vzorku.
- V případě kontaminace pracovního prostoru nebo zařízení se vzorky nebo kontrolami, důkladně vyčistěte kontaminovanou oblast s roztokem 1:10 ředěného chlorového bělidla pro domácnost nebo chlornanu sodného a pak 70% ethanolem nebo 70% Denaturovaným ethanolem. Před pokračováním otřete pracovní plochu a nechte ji zcela vyschnout.
- Poradte se s pracovníky ohledně správné likvidace odpadů. Zkontrolujte územní nebo místní předpisy, protože se mohou lišit od národních předpisů pro likvidaci. Materiál může vykazovat vlastnosti nebezpečných odpadů, které vyžadují zvláštní požadavky na likvidaci. Instituce by měly kontrolovat jejich nebezpečné odpady.

## 10 Chemické nebezpečí

• Signální slovo: VAROVÁNÍ

### Prohlášení o nebezpečnosti UN GHS Hazard

- Může být škodlivý při požití
- Způsobuje podráždění pokožky
- Dráždí oči

### Bezpečnostní prohlášení GHS OSN

#### • Prevence

- Po manipulaci důkladně umyjte ruce.

#### • Reakce

- Pokud dojde k podráždění kůže: Vyhledejte lékařskou pomoc.
- V PŘÍPADĚ OČÍ: Několik minut opatrně vypláchněte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, je-li to možné a je to snadné.
- Pokračujte v oplachování.
- Pokud podráždění očí přetrvává, vyhledejte lékařskou pomoc.
- Pokud se necítíte dobře, navštivte lékaře.

## 11 Odběr, skladování a transport vzorků

Plná krev se odebírá do K2-EDTA zkumavek, EDTA-PPT nebo do sběrných sérových zkumavek a dle pokynů výrobce se odstředěním oddělí plazma / sérum a červené krvinky.

- pro HCV VL test je potřeba minimálně 1 ml plazmy nebo séra. Pokud používáte přenášecí pipetu, která je součástí soupravy, je zapotřebí minimálně 1,2 ml plazmy nebo séra. Případně, pokud používáte přesnou pipetu, minimálně je potřeba 1 ml plazmy nebo séra.
- Plná krev může být skladována při 15-30 ° C po dobu 24 hodin nebo při teplotě 2-8 ° C po dobu až 3 dnů, před přípravou a analyzováním vzorku.
- Plazma a sérum jsou stabilní ve zmrazeném stavu (-70 až -18 ° C) po dobu šesti týdnů.
- Plazma a sérum vzorky jsou stabilní po i po třech cyklech zmrazení / rozmrazení.
- Vzorky plné krve, plazmy nebo séra přepravujte při teplotě 2-8°C.
- Přeprava vzorků plné krve, plazmy nebo séra musí splňovat národní předpisy pro transport etiologických látek.
- Vzorky plazmy a séra musí být rozmražené a přivedeny do rovnovážného stavu na pokojovou teplotu před přenesením do zásobníku.

## 12 Pracovní postup

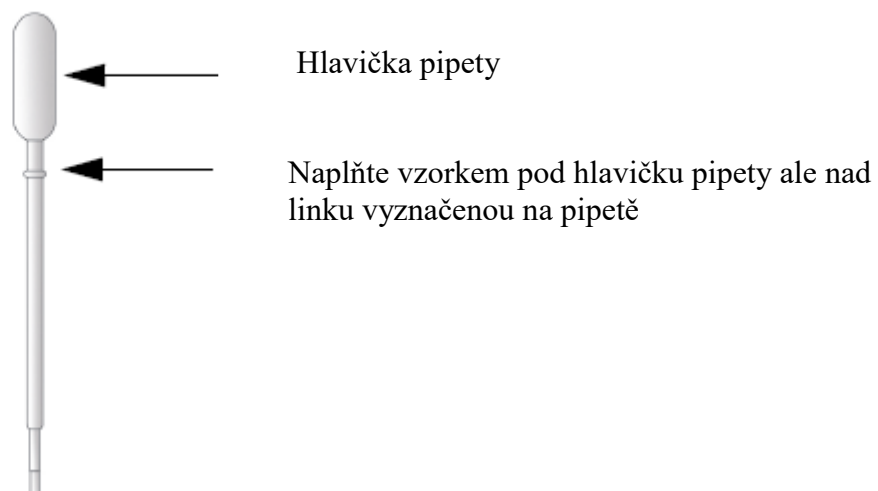
### 12.1 Příprava vzorku

1. Po odstředění vzorků plné krve může být 1 ml vzorku plazmy napipetován přímo do zásobníku. Dostatečný objem je pro získání platných výsledků rozhodující ( viz pokyny v části 12.2 Příprava zásobníku).
2. V případě použití zmrazených vzorků, umístěte vzorky na pokojovou teplotu (20-35 ° C) až do úplného rozmrazení a nechte vzorky před použitím při pokojové teplotě.
3. Vzorky plazmy a séra skladujte při teplotě 2-8 ° C. Před použitím vyjměte vzorky z chladničky a nechte ohřát na pokojovou teplotu.
3. Vzorky plazmy skladované při 2-8°C nebo zamražené rozmrazte a vortexujte 15 sekund před použitím, a je-li vzorek zakalený, odkalte rychlým odstředěním.

### 12.2 Příprava zásobníku

1. Používejte ochranné rukavice na jedno použití.

2. Zkontrolujte, zda zásobník není poškozený. Pokud je poškozený, nepoužívejte jej.
3. Otevřete víko zásobníku.
  - **Možnost 1:** Pokud používáte přenosovou pipetu, která je součástí testu (obrázek 1), doplňte ji těsně pod hlavičku pipety, ale nad linku, pro přenesení **minimálně** 1 ml plazmy nebo séra ze sběrné zkumavky do komory pro vzorek testovaného zásobníku (obrázek 2). Nenalívejte vzorek do komory!
  - **Možnost 2:** Používáte-li automatickou pipetu, přeneste 1 ml plazmy nebo séra do komory pro vzorek v zásobníku (obrázek 2). Nelijte vzorek do komory!



**Obrázek 1. Pipeta a její naplnění**

4. Zavřete víko zásobníku
5. Vložte zásobník do přístroje GeneXpert dx nebo do Infinity Systému.



**Obrázek č. 2 HCV VL zásobník testu (pohled seshora)**



### 12.3 Začátek testu

**Důležité:** před zahájením testu se ujistěte, že požadované stanovení Xpert HCV VL je nadefinováno v softwaru

Poznámka: Následující kroky se mohou lišit v případě, že správce systému změnil výchozí postup v systému.

Tato část uvádí seznam základních kroků v průběhu testu. Detailnější pokyny jsou uvedeny v *Návodu k obsluze systému GeneXpert Dx* nebo v manuálu *GeneXpert Infinity System*.

1. Zapněte přístroj GeneXpert:
  - Používáte-li přístroj GeneXpert Dx, nejprve zapněte přístroj a potom zapněte počítač. GeneXpert Software se automaticky spustí. Pokud se tak nestane, klikněte na ploše Windows® na ikonu zástupce softwaru GeneXpert Dx.  
nebo
  - Pokud používáte přístroj GeneXpert Infinity, zapněte přístroj. Software GeneXpert se spustí automaticky. Pokud se tak nestane, poklepejte na ikonu zástupce softwaru Xpertise na ploše Windows®.
2. Přihlaste se k softwaru GeneXpert Instrument System pomocí svého uživatelského jména a hesla.
3. V okně GeneXpert systému, klepněte na tlačítko **Create Test** (Vytvořit test) (GeneXpert Dx) nebo **Order** (objednat) a **Order Test** (objednat test) (Infinity).
4. Naskenujte ID číslo pacienta (volitelné). Pokud zadáváte ID pacienta, ujistěte se, že ID pacienta je zadáno správně. ID číslo pacienta je propojeno s výsledky testů a ukáže se v okně zobrazení výsledků.
5. Naskenujte nebo zadejte ID číslo vzorku. Pokud zadáváte ID vzorku, ujistěte se, že ID vzorku je zadáno správně. ID vzorku je propojeno s výsledky testů a ukáže se v okně Zobrazení výsledků a ve všech zprávách. Zobrazí se dialogové okno Scan Cartridge.(naskenovat zásobník testu)
6. Naskenujte čárový kód na zásobníku HCV VL testu. Zobrazí se okno Create test (Vytvořit test). Po načtení čárového kódu software automaticky vyplní políčka pro následující pole: Vybrat test, ID lotu reagentie, výrobní číslo zásobníku testu, datum expirace.
7. Klikněte na tlačítko **Start Test** (GeneXpert Dx) nebo **Submit** (Odeslat) (Infinity). Zadejte heslo, pokud je požadováno.

8. Pro GeneXpert Infinity System, umístěte zásobník na podavač. Zásobník se automaticky načte, spustí se test, a použitý zásobník bude umístěn do odpadního kontejneru.

Nebo

Pro přístroj GeneXpert Dx

- A. Otevřete dvířka přístroje s blikajícím zeleným světlem a vložte zásobník.
- B. Zavřete dvířka. Test se spustí a zelená kontrolka přestane blikat. Po dokončení testu světlo zhasne.
- C. Před otevřením dvířek počkejte, až systém uvolní zámek dveří a vyjměte zásobník.
- D. Použitý zásobník zlikvidujte v souladu s platnými nařízeními vašeho zařízení.

## 13 Prohlížení a tisk výsledků

Podrobné informace k prohlížení a tisku výsledků jsou uvedeny v *Návodu k obsluze systému GeneXpert Dx*.

Tato část obsahuje základní kroky pro prohlížení a tisk výsledků. Podrobnější pokyny o tom, jak zobrazit a vytisknout výsledky jsou uvedeny v *Návodu k obsluze GeneXpert Dx System* nebo v *Návodu GeneXpert Infinity System*, v závislosti na tom, který přístroj používáte.

1. Klepněte na ikonu **View Result** (zobrazit výsledky) pro zobrazení výsledků.
2. Po dokončení testu, klikněte na tlačítko **Report** v okně zobrazení výsledků - k zobrazení a / nebo generování souboru PDF report.

## 14 Kontrola kvality

Každý test obsahuje Sample Volume adequacy kontrolu (SVA), Vnitřní kvantitativní vysokou a nízkou kontrolu (IQS-H a IQS-L, a to i kontrolu pro vzorek [SPC]) a kontrolu sondy (PCC).

- **Sample Volume Adequacy (SVA - Objem přiměřenosti vzorku (SVA) –** zjišťuje, že byl vzorek správně přidán do zásobníku. SVA ověří, zda byl přidán do komory správný objem vzorku. SVA bude úspěšná, pokud splňuje všechny kritéria. V případě, že SVA nebude splněna, zobrazí se ERROR 2096, pokud vzorek chybí nebo ERROR 2097, pokud není k dispozici dostatek vzorku. Systém uživateli zabrání v obnovení testu.
- **Vnitřní kvantitativní standardní vysoká a nízká (IQS-H a IQS-L) -** IQS-H a IQS-L jsou

dvě Armored RNA® konstruovány do formy lyofilizované kuličky, která prochází celým procesem stanovení. IQS-H a IQS-L jsou standardy kalibrované proti standardu 4th WHO pro HCV. Jsou využívány pro kvantifikaci pomocí specifických parametrů pro výpočet koncentrace HCV RNA ve vzorku. Navíc IQS-H a IQS-L detekují se vzorkem spojené inhibiční reakce RT-PCR. IQS-H a IQS-L se považují jako splněné, pokud splňují ověřená kritéria

- **Kontrola sondy** – před zahájením PCR reakce měří systém fluorescenční signál cílového EV a SPC/IC za účelem ověření rehydratace reagensů a naplnění reakčních zkumavek. Kontrola sondy je platná, pokud splňuje validační kritéria.

- **Externí kontroly** - externí kontroly, které nejsou dodávány v soupravě, by měly být použity v souladu s místními, státními nebo federálními předpisy nebo v souladu s požadavky na akreditaci a standardní postupy kontroly kvality vaší laboratoře.

## 15 Interpretace výsledků

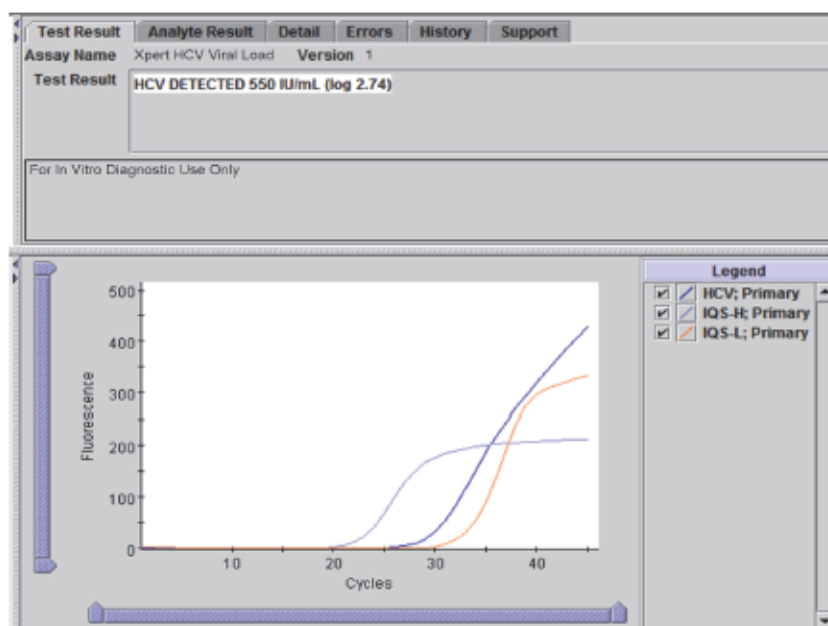
Výsledky jsou k dispozici v systému GeneXpert z naměřených fluorescenčních signálů a vložených výpočtových algoritmů a jsou jasně uvedeny v okně View Results (Obrázek 3 a Obrázek 5). Možné výsledky jsou uvedeny v Tabulce 1.

**Tabulka 1: Výsledky a interpretace testu HCV VL**

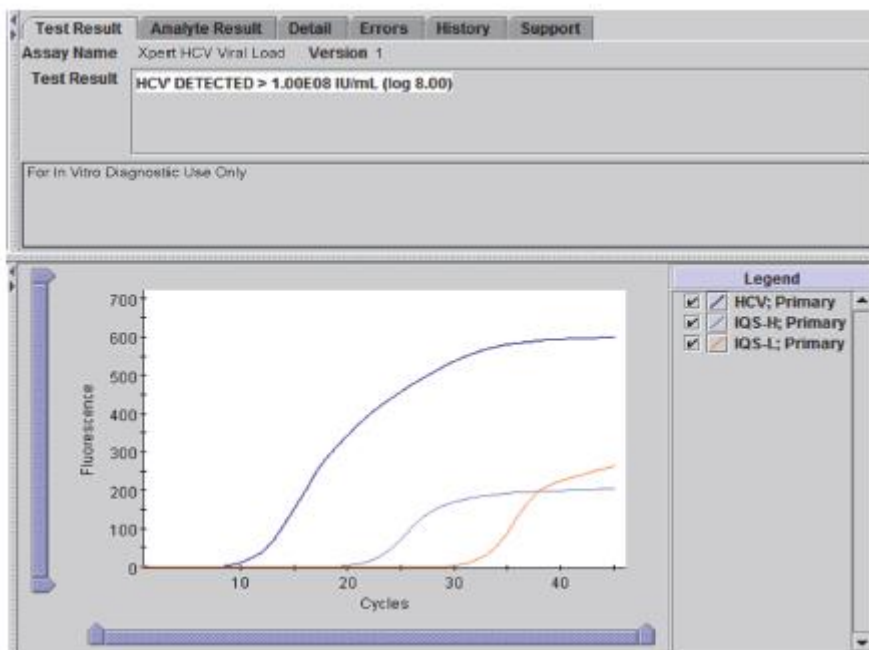
Výsledek	Interpretace
<b>HCV DETECTED XX IU/mL (log X.XX)</b> viz obrázek 3.	HCV RNA je detekováno na XX IU / ml. <ul style="list-style-type: none"> <li>• HCV RNA má v rámci lineárního nastavení rozsahu testu a koncového bodu hodnotu nad minimum.</li> <li>• IQS-H a IQS-L: PASS.</li> <li>• Kontrola sondy: PASS; všechny výsledky kontroly sondy jsou v pořádku.</li> </ul>
<b>HCV DETECTED &gt; 1.00E08 IU/mL</b> Viz obrázek 4.	HCV RNA je detekován nad kvantitativním rozmezí testu. <ul style="list-style-type: none"> <li>• IQS-H a IQS-L: PASS.</li> <li>• Kontrola sondy: PASS; všechny výsledky kontroly sondy jsou v pořádku.</li> </ul>
<b>HCV DETECTED &lt; 10 IU/mL</b> Viz obrázek 5.	HCV RNA je detekován pod kvantitativním rozsahem testu. <ul style="list-style-type: none"> <li>• IQS-H a IQS-L: PASS.</li> <li>• Kontrola sondy: PASS; všechny výsledky kontroly sondy jsou v pořádku.</li> </ul>
<b>HCV NOT DETECTED</b> Viz obrázek 6.	Není detekován HCV RNA. <ul style="list-style-type: none"> <li>• není detekován HCV RNA.</li> <li>• IQS-H a IQS-L: PASS</li> <li>• Kontrola sondy: PASS; všechny výsledky kontroly sondy jsou v pořádku.</li> </ul>
<b>INVALID</b>	Přítomnost nebo nepřítomnost HCV RNA nelze určit. Opakujte test

Viz obrázek 7.	<p>podle pokynů v kapitole 15.2, Opakování testu.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• IQS-H a / nebo IQS-L: SELHALA; Práh cyklu (CTS), nejsou v platném rozsahu a koncový bod je nižší než minimální nastavení.</li> <li>• sondy Kontrola: PASS; všechny výsledky kontroly sondy jsou v pořádku.</li> </ul>
<b>ERROR</b> Viz obrázek 8.	<p>Přítomnost nebo nepřítomnost HCV RNA nelze určit. Opakujte test podle pokynů v kapitole 15.2, Opakování testu.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Kontrola sondy: SELHALA *; všechny nebo jeden z výsledků kontroly sondy se nezdařil.</li> </ul> <p>* Pokud je kontrola sondy prošla, chyba je způsobena maximálním limitem tlaku přesahující přijatelný rozsah nebo selháním některého z komponentů systému.</p>
<b>NO RESULT</b>	<p>Přítomnost nebo nepřítomnost HCV RNA nelze určit. Opakujte test podle pokynů v kapitole 15.2, Opakování testu. NO RESULT výsledek testu nelze získat z důvodu nedostatečných dat. Například operátor zastavil test, který probíhal.</p>

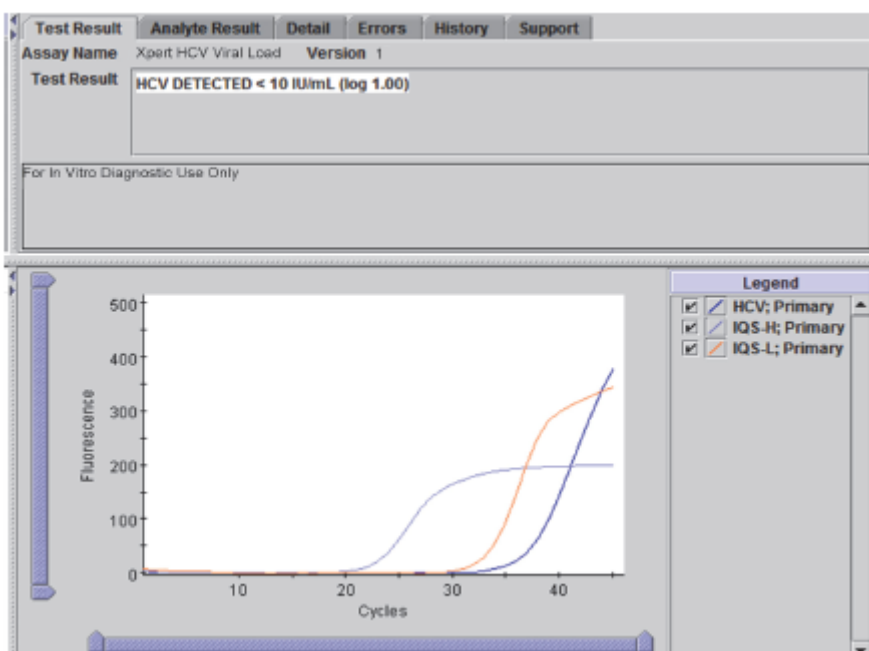
**Poznámka:** Tyto obrazovky jsou pouze pro příklad. Název testu a číslo verze se mohou lišit od obrázků obrazovek uvedených v tomto návodu k použití.



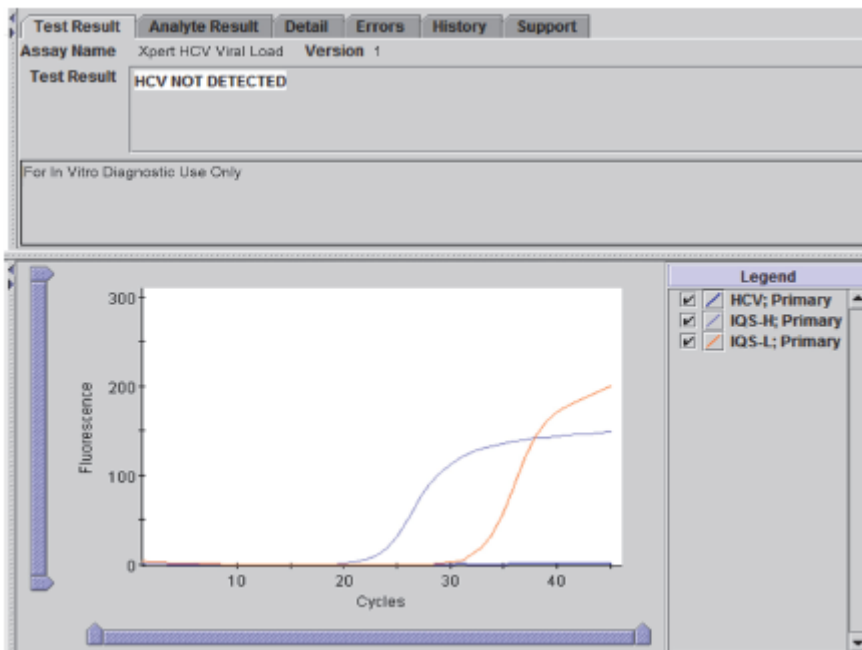
**Obrázek 3: Detekovaný HCV a jeho množství**



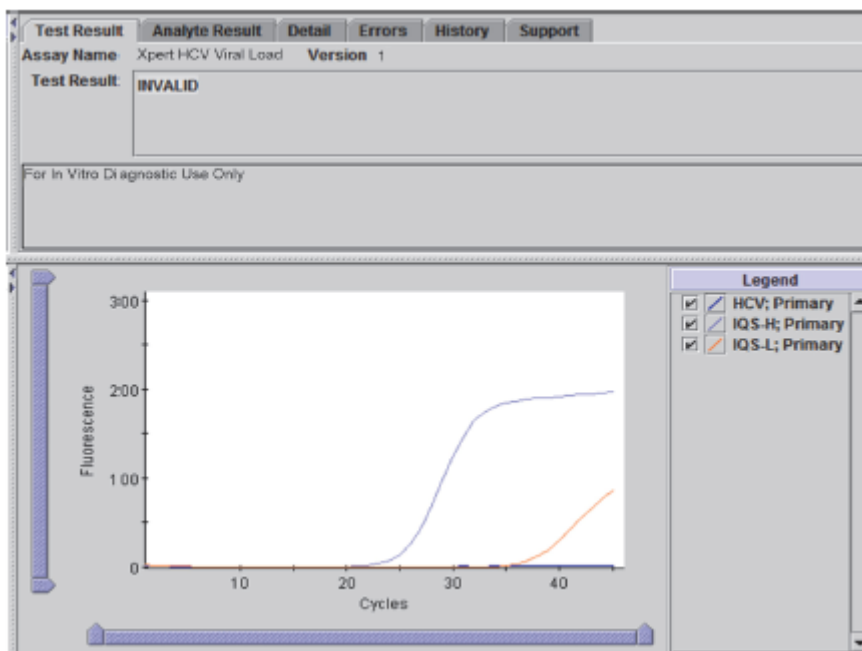
**Obrázek 4: Detekovaný HCV**



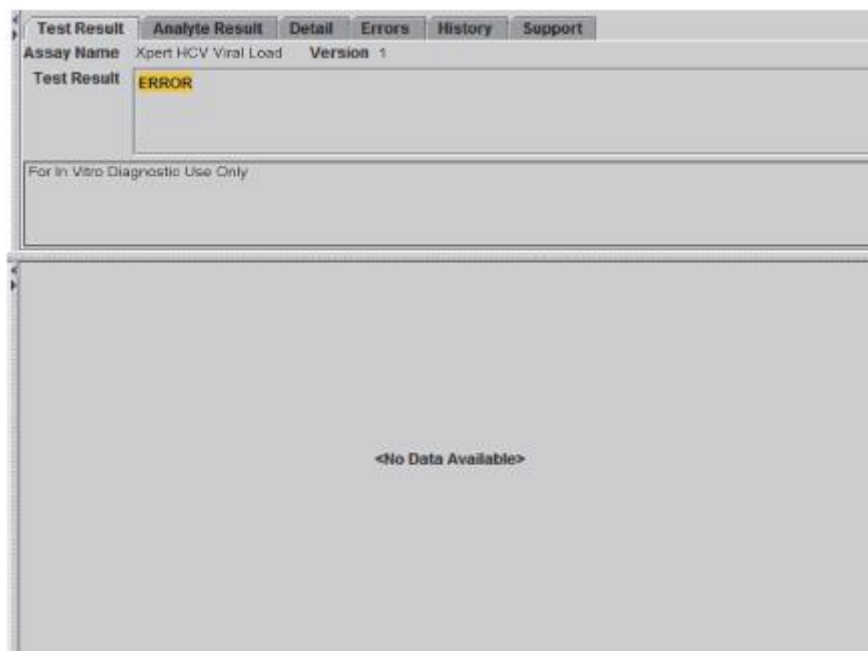
**Obrázek 5: Detekovaný HCV**



**Obrázek 6: Nedetekovaný HCV**



**Obrázek 7: Neplatný**



**Obrázek 8: Error**

## 16 Opakování testu

### 16.1 Důvody pro opakování testu

Pokud dojde k výsledkům některých zkoušek uvedených níže, opakujte test podle instrukcí v kapitole 15.2, Opakování testu

- **INVALID** Neplatný výsledek znamená, jeden nebo více z následujících:
  - IQS-H a / nebo IQS-L KONTROLY nejsou v platném rozsahu.
  - Vzorek nebyl řádně zpracován nebo PCR byla inhibována.
- **ERROR** označuje, že test byl přerušen. Možné příčiny: byl přidán nedostatečný objem vzorku, reakční zkumavka byla naplněna nesprávně, byl zjištěn problém s integritou sondy, nebo byl překročen limit maximálního tlaku.
- **NO RESULT** výsledek testu nelze získat z důvodu nedostatečných dat. Například operátor zastavil test, který probíhal, nebo došlo k výpadku napájení.

## 16.2 Postup opakování testu:

Pro opakování testu s výsledky **NO RESULT, INVALID** nebo **ERROR** použijte nový zásobník (nepoužívejte vícekrát jeden zásobník) a nové reagensy.

1. Vyjměte nový zásobník ze soupravy.
2. Viz kapitola 12 Pracovní postup včetně kapitoly 12.1 Příprava vzorku, kapitola 12.2 Příprava zásobníku a kapitola 12.3 Začátek testu.

## 17. Limitace

Doporučujeme dodržování správné laboratorní praxe a výměnu rukavic mezi manipulací se vzorky, aby se zabránilo kontaminaci reagensů. Mutace nebo polymorfismy ve vazebných oblastech primeru nebo sondy mohou ovlivnit detekci nových nebo neznámých variant HCV a vést k falešně negativním výsledkům.

## 18. Výkonnostní charakteristika

### 18.1 Detekční limit

Mez detekce (LOD) testu HCV VL byla určena testováním osmi různých ředění připravených z HCV referenčního standardu HCV genotypu 1 negativní EDTA v plazmě a séru. Materiálem použitým k určení LOD byl HCV genotypu 1, WHO 4. mezinárodní standard, kód NIBSC 06/102. Mez detekce byla stanovena pro tři různé šarže tří šarže a bylo testováno celkem 72 nebo 73 opakování jedné koncentrace. Jedna velmi nízká úroveň koncentrace byla zahrnuta pro oba druhy vzorků po prvním dnu testování. Počet testovaných replikátů na této úrovni byl tedy menší (49 v plazmě a 53 v séru). Vyhodnocení bylo provedeno podle pokynů CLSI E17-A2. Koncentrace HCV RNA, která může být detekována s pozitivitou vyšší než 95%, byla stanovena regresní Probit analýzou a výsledky pro jednotlivé šarže a vzorky jsou shrnuty v tabulce 2. Maximální Probit analýzou pozorované LOD pro HCV genotypu 1 v EDTA plazmě je 4,0 IU / ml (95% CI 2.8-5.2). Maximální Probit analýzou pozorované LOD pro HCV genotyp 1 v séru je 6,1 IU / ml (95% CI 4.2.-7.9.).



**Tabulka 2: HCV VL LOD odhadované regresní Probit analýzou s 95% horním a dolním konfidenčním intervalem pro HCV genotyp 1 v plasmě a séru na každou šarži.**

Vzorek	Šarže	LoD 95%	95% CI
WHO plasma	1	3,3	2,4 – 4,2
	2	4,0	2,7 – 5,2
	3	4,0	2,8 – 5,2
WHO sérum	1	6,1	4,2 – 7,9
	2	2,6	1,9 – 3,3
	3	2,3	1,8 – 2,9

Hit rate analýza ukazuje pozitivitu > 95% při 6 IU / ml pro testovaný genotyp 1 HCV 1 jak je uvedeno v tabulce 3.

**Tabulka 3. HCV VL LOD pro genotyp 1 HCV v EDTA plasmě a séru**

Vzorek	Koncentrace IU/mL	Opakování	Positivní vzorky	% Pozitivity
WHO Plasma	0.5 <sup>a</sup>	49	24	49
	1	72	47	65
	2	72	61	85
	3	72	69	96
	4	72	67	93
	6	72	71	99
	8	73	73	100
	10	72	72	100
WHO Sérum	0.5 <sup>a</sup>	53	21	40
	1	73	47	64
	2	73	64	88
	3	72	69	96
	4	73	71	97
	6	72	71	99
	8	72	70	97
	10	72	72	100

a.0.5 IU/mL byl přidán 2 den kvůli vysoké míře pozitivitu pozorované při 1 IU/mL po 1 dni.

Bylo provedeno také ředění klinických vzorků reprezentující HCV genotyp 1a, 2b, 3a, 4a, 5a a 6a v negativní lidské EDTA plasmě jedné šarže vždy 24 replikátů na koncentraci. Přiřazení

nominální koncentrace klinických vzorků bylo stanoveno pomocí Abbott Real-Time HCV TM testu. Hit analýza vykazuje míru pozitivitu > 95% v případě všech genotypů s koncentrací 10 IU / ml, jak je uvedeno v tabulce 4. LOD pro test HCV VL je stanovena na 10 IU / ml pro HCV genotypy 1 - 6 v EDTA plazmě a séru.

**Tabulka 4. HCV VL Hit Rate analýza pro genotyp 1-6 vzorky v EDTA plazmě**

Genotyp	Nejnižší koncentrace 95% a výš Hit Rate IU/ml	Hit Rate %
1a	10	100
2b	4	100
3a	6	100
4a	4	100
5a	2	96
6a	4	96

## 18.2 Limit kvantifikace

Celková analytická chyba (TAE) vypočtena za použití odhadů stanovena na základě analýzy dat ze studie LOD (WHO standard) a Studie reprodukovatelnosti/Přesnosti dle CLSI pokynů E17-A2. TAE pro ředění, které měla pozorované koncentrace přesně nebo v blízkosti meze detekce testu 10 IU / ml ( $1,0 \log 10$ ) jsou uvedeny v tabulce 5. TAE byla odhadnuta dvěma různými způsoby.

**Tabulka 5. HCV VL TAE analýza pro determinaci limitu kvantifikace**

Specimen (Study)	DL Lot	N	Concentration (Log <sub>10</sub> IU/mL)		Bias	Total SD	TAE <sup>a</sup> Absolute Bias + 2xSD	TAE <sup>b</sup> 2xSQRT (2)xSD
			Expected	Observed				
Acrometrix (Precision)	DL1	72	1.40	1.31	0.09	0.15	0.38	0.41
	DL2	72	1.40	1.29	0.11	0.14	0.40	0.41
	DL3	72	1.40	1.24	0.16	0.12	0.41	0.35
Acrometrix (Precision)	DL1	72	1.00	0.92	0.08	0.22	0.52	0.62
	DL2	72	1.00	0.82	0.18	0.18	0.54	0.51
	DL3	72	1.00	0.75	0.25	0.19	0.63	0.54
WHO, Plasma (LoD)	DL1	24	1.00	0.91	0.09	0.21	0.51	0.59
	DL2	24	1.00	0.82	0.18	0.30	0.78	0.86
	DL3	24	1.00	0.86	0.14	0.17	0.48	0.48
WHO, Serum (LoD)	DL1	24	1.00	0.96	0.04	0.13	0.30	0.37
	DL2	24	1.00	0.88	0.12	0.23	0.58	0.66
	DL3	24	1.00	0.80	0.20	0.18	0.57	0.52

a TAE počítaná podle modelu CLSI EP17-A2

b TAE založená na rozdílu mezi dvěma měřeními

Výsledky analýzy ukazují, že TAE testu HCV VL může určit, 10 IU / ml (1,0 log 10) s přijatelnou pravdivostí a přesností.

### 18.3 Přesnost / reprodukovatelnost

Přesnost / reprodukovatelnost testu HCV VL byla stanovena analýzou paralelních ředění referenčních materiálů HCV negativní EDTA plazmy. Nominální koncentrace použitého referenčního materiálu byla kalibrována na WHO 4. HCV mezinárodní standard (06/102). Srovnávací studie byla dvojité zaslepená, za použití sedmičlenného panelu HCV referenčního materiálu HCV negativní EDTA plazmy s koncentrací RNA, která pokrývá celý rozsah HCV VL kvantit.

Dva operátoři v každém ze dvou studijních míst testovali jeden panel dvaceti jedna vzorků jednou denně po šest testovacích dní na jednu šarži.

Jedno studijní místo používalo Infinity 80 systém a druhé testovací místo používalo Genexpert Dx systém. Pro studii byly použity tři šarže testu HCV VL. Přesnost / reprodukovatelnost byla hodnocena v souladu s "Evaluation of Precision

Performance of Clinical Chemistry Devices; Approved Guideline” CLSI document EP5-A2. Přesnost výsledků pro každou šarži je uvedena v tabulce 6.

**Tabulka 6. HCV VL přesnost na šarži**

Expected HCV RNA Concentration log <sub>10</sub> IU/mL	Total Precision per Lot					
	Lot 1		Lot 2		Lot 3	
	SD	CV <sup>a</sup>	SD	CV <sup>a</sup>	SD	CV <sup>a</sup>
1.0	0.23	55.8%	0.18	44.2%	0.20	48.1%
1.4	0.15	35.1%	0.15	35.8%	0.13	29.6%
2.7	0.09	20.7%	0.09	20.6%	0.09	20.2%
4.2	0.07	16.4%	0.08	18.9%	0.07	15.3%
5.4	0.12	28.3%	0.09	19.9%	0.07	16.2%
6.9	0.13	31.8%	0.09	20.9%	0.07	17.0%
8.2	0.10	22.7%	0.10	23.7%	0.08	17.8%

a. “CV” is lognormal CV, as obtained using the formula:

$$CV(\text{of the lognormal dist}) = \sqrt{10^{\ln(10) \cdot \sigma^2} - 1}$$

Reprodukovatelnost HCV VL testu byla vyhodnocena pomocí nested ANOVA analýzy rozptylu s podmínkami pro místo/přístroj/šarži/den/operátora a běh, Lot, Day, Operátor / Spustit a sérii. Byla vypočtena standardní odchylka a procento variability pro každou komponentu složku log<sub>10</sub> HCV transformované koncentrace. Výsledky v tabulce 7.

**Tabulka 7: Směrodatná odchylka a kontribuční procento variability pro každé místo a celková přesnost**

HCV RNA Concentration log <sub>10</sub> IU/mL			Contribution to Total Variance SD (CV%)										Total Precision			
Expected	Actual	N	Site/Inst		Lot		Day		Operator/Run		Within-Run		Total			
			SD	(%) <sup>a</sup>	SD	(%) <sup>a</sup>	SD	(%) <sup>a</sup>	SD	(%) <sup>a</sup>	SD	(%) <sup>a</sup>	SD	Lower CI	Upper CI	CV <sup>b</sup>
1.0	0.83	216	0.03	1.8%	0.08	13.2%	0.04	3.5%	0.00	0.0%	0.19	81.6%	0.21	0.18	0.25	51.7%
1.4	1.28	216	0.00	0.0%	0.04	7.1%	0.00	0.0%	0.00	0.0%	0.14	92.9%	0.14	0.13	0.16	34.1%
2.7	2.66	216	0.00	0.0%	0.04	17.2%	0.00	0.0%	0.02	3.2%	0.08	79.5%	0.09	0.08	0.11	22.1%
4.2	4.18	215	0.00	0.0%	0.05	30.9%	0.01	2.6%	0.00	0.0%	0.07	66.5%	0.09	0.07	0.12	20.6%
5.4	5.44	216	0.00	0.0%	0.06	26.5%	0.00	0.0%	0.01	1.3%	0.09	72.2%	0.11	0.09	0.14	25.8%
6.9	6.86	216	0.00	0.0%	0.07	34.0%	0.02	3.4%	0.00	0.0%	0.10	62.5%	0.13	0.10	0.17	29.8%
8.2	8.11	216	0.00	0.0%	0.09	47.9%	0.00	0.0%	0.02	2.6%	0.09	49.5%	0.13	0.10	0.19	30.5%

a. (%) is contribution of variance component to overall lognormal CV

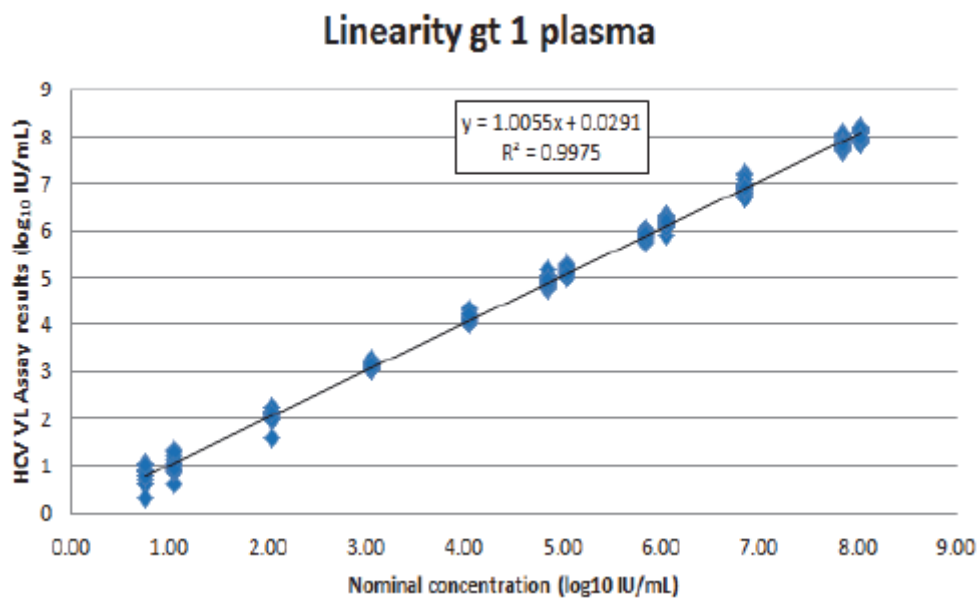
b. “CV” is lognormal CV, as obtained using the formula:

$$CV(\text{of the lognormal dist}) = \sqrt{10^{\ln(10) \cdot \sigma^2} - 1}$$

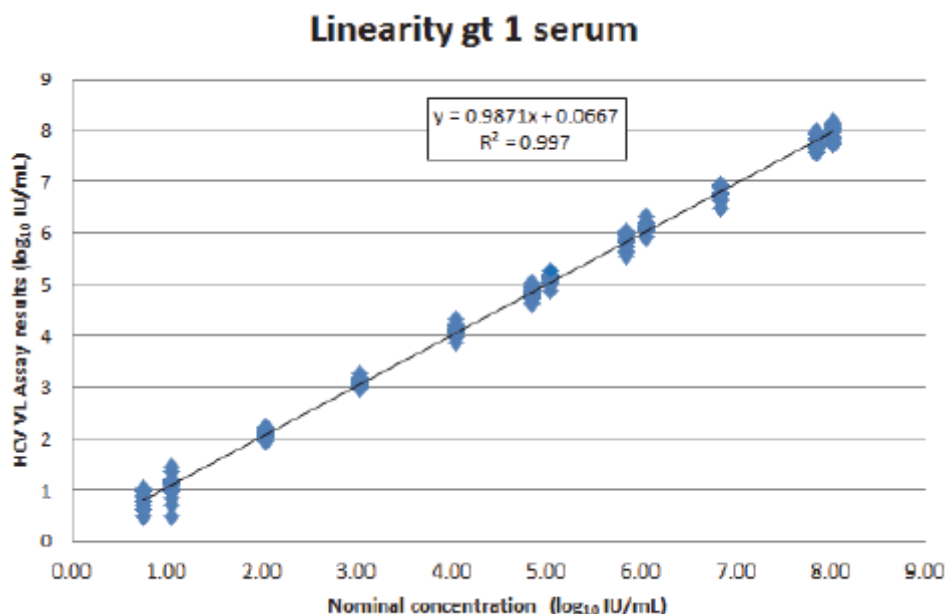
#### 18.4 Lineární rozsah a Inkluzivita

Lineární rozsah testu HCV VL byl stanoven analýzou dvanáctičlenného panelu pokrývajícího rozmezí od  $-5 (0,75) \log_{10}$  až  $\sim 1 \times 10^8 (8 \log_{10})$  IU / ml. Panely byly připraveny paralelním ředěním HCV referenčního materiálu (Armored RNA®) genotyp 1 a genotyp 1 klinických vzorků) v HCV negativní EDTA plazmě a séru. Jmenovitá koncentrace použitý referenční materiál byl kalibrován podle WHO 4. standardu HCV (06/102). Každý člen panelu byl testován v replikátech o čtyřech v každém ze tří testovacích dnů za použití dvou šarží. Celkem bylo testováno 24 replikátů člena panelu a typu vzorku.

Analýza linearity byla provedena podle směrnice CLSI EP06-A. Na obr. 9 a obr. 10 jsou uvedeny kombinované výsledky pro obě šarže. Test HCV VL je lineární v rozmezí 0,8–8,0  $\log_{10}$  IU / ml s hodnotou  $R^2 > 0,997$ .



**Obrázek 9: Linearita genotypu 9 v EDTA plasmě pro HCV VL test**



**Obrázek 10. Linearity Genotypu 1 v seru pro HCV VL test**

Pro potvrzení lineárního rozsahu a vyhodnocení inkluзивity testu HCV VL se panely skládající se z klinických vzorků představující HCV genotyp 2 - 6 a Armored RNA®, pokud jsou k dispozici (pouze genotypy 2 a 3), byly připraveny negativně lidská plazma EDTA. 7 - 13 členů panelu na genotyp pokrývající co nejširší rozsah, pohybující se od ~ 0,9 - 6 log<sub>10</sub> IU / ml pro genotyp 5 až ~ 0,9 - 8,3 log<sub>10</sub> pro genotyp 3, byly připraveny a analyzovány v replikátech po čtyřech na každém ze tří testování dnů pomocí dvou šarží soupravy. Pro každý genotyp bylo testováno 24 replikátů na člena panelu. Jmenovité koncentrace použité referenční materiály byly kalibrovány podle WHO 4. HCV mezinárodního standardu (06/102). Všechny genotypy odpovíděly lineárně s hodnotami R<sup>2</sup> v rozmezí 0,994 - 0,998.

### 18.5. Analytická Specificita a Exkluzivita

Analytická specificita VL testu HCV byla hodnocena přidáním potenciálně zkříženě reagující složky na 1 x 10<sup>5</sup> CFU / Vstupní koncentrace ml, copy / ml nebo TCID<sub>50</sub> / ml do HCV negativní EDTA plazmy a plazmy, která obsahovala ~ 25 IU / ml Referenčního HCV materiálu (klinický vzorek genotyp 1). Testované organismy jsou uvedeny v tabulce 8.

**Tabulka 8. Analytická specificita organismů**

Human Immunodeficiency virus 1
Human Immunodeficiency virus 2
Human T-cell lymphotropic virus I
Human T-cell lymphotropic virus II
<i>Candida albicans</i>
Cytomegalovirus
Epstein-Barr virus
Hepatitis A virus
Hepatitis B virus
Herpes simplex virus 1
Herpes simplex virus 2
Human herpes virus 6
Human herpes virus 8
Varicella Zoster virus
BK Human polyoma virus
Banji virus
Ilheus virus
West Nile virus
Zika virus
Human papilloma virus 16
Human papilloma virus 18
<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>

Žádný z testovaných organismů nevykazoval zkříženou reaktivitu a všechna pozitivní opakování měla koncentrace HCV RNA v rámci  $\pm 0,5$  log od HCV pozitivní kontroly při použití HCV VL testu.

Kromě druhů uvedených v tabulce 8, byl analyzován i Dengue virus a virus vakcínie in silico, protože standardní materiál nelze pro testování získat. Žádná signifikantně významná sekvenční podobnost nebyla mezi analyzovanými viry zjištěna a primery a sondami použitými v testu Xpert HCV VL.

### **18.6 Potenciálně interferující látky**

Byla hodnocena i náchylnost testu HCV VL k interferenci se zvýšenými hladinami endogenních látek, které způsobují léky předepisované HCV infikovaným pacientům a autoimunitními markery onemocnění. Testována byla HCV negativní EDTA plazma a plazma, která obsahovala  $\sim 25$  IU / ml HCV referenčního materiálu (klinický vzorek HCV genotyp 1). Bylo prokázáno, že zvýšené hladiny endogenních látek uvedených v tabulce 9 neinterferují s kvantifikací a neovlivňují jeho specificitu.

**Tabulka 9. Endogenní substance a testované koncentrace**

Testovaná substance	Koncentrace
Bilirubin	20 mg/dL
Human DNA	0.4 mg/dL
Albumin	9 g/dL
Hemoglobin	500 mg/dL
Triglycerides	3.0 mg/dL

Nebyla prokázána interference testu HCV VL s komponentami léčiv, uvedenými v tabulce 10 ani dopad na specificitu testu i při testování až trojnásobku koncentrace pěti poolů léčiv.

**Tabulka 10. Testované pooly léčiv**

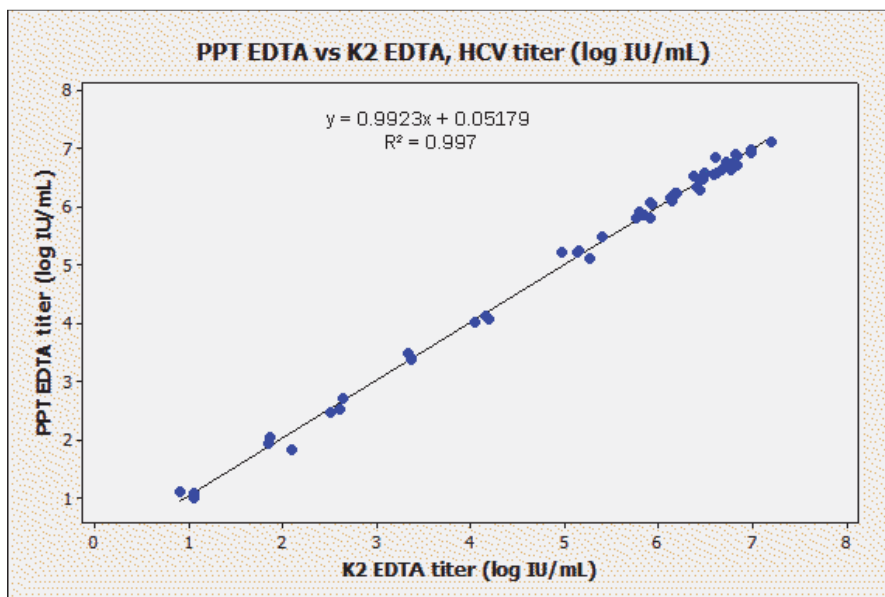
Pool	Drugs
Control	N/A
1	Zidovudine, Saquinavir, Ritonavir, Interferon alfa-2b, Clarithromycin
2	Abacavir sulfate, Fosamperavir Calcium, Peginterferon 2b, Ribavirin
3	Tenofovir disoproxil fumarate, Lamivudine (3TC), Indinavir sulfate, Ganciclovir, Valganciclovir HCl, Acyclovir
4	Stavudine (d4T), Efavirenz, Lopinavir, Enfuvirtide (T-20), Ciprofloxacin
5	Nevirapine, Nelfinavir mesylate, Azithromycin, Valacyclovir HCl

Testování vzorků od deseti jedinců s autoimunitní chorobou taktéž nevykazuje žádnou interferenci testu HCV VL s autoimunitním onemocněním jako např. systémový lupus erythematodes (SLE), anti-nukleární protilátky (ANA), nebo revmatoidní faktor (RF).

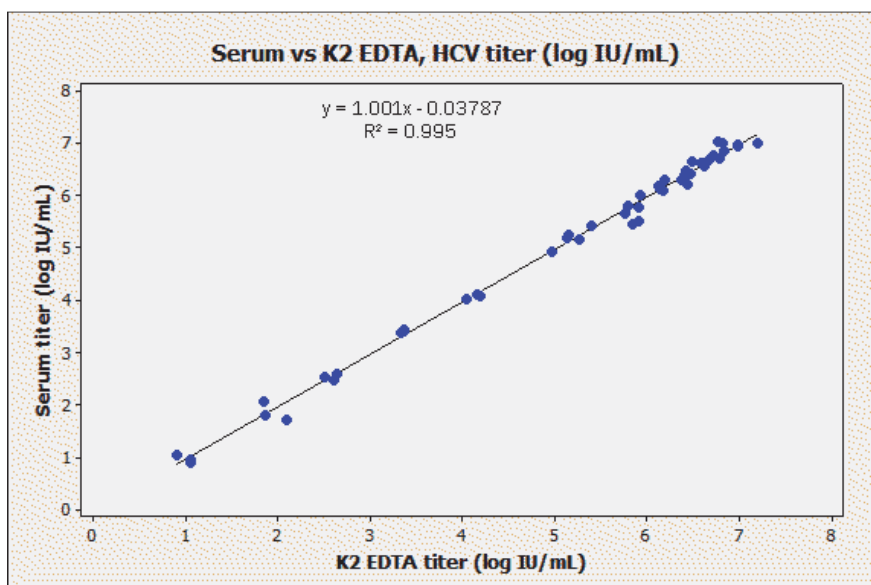


### 18.7 Odběrová média ekvivalence (EDTA, PPT-EDTA a sérum)

Pro každý vzorek odběrového média (EDTA, PPT-EDTA a sérum) vzorky od 50 odpovídajících HCV pozitivních jedinců a 25 odpovídajících HCV negativním vzorkům. Jak je znázorněno na obr. 11 a na obr. 12, byla pro EDTA plazmu versus sérum zobrazena ekvivalentní výkonnost HCV VL testu vzorů a plazma EDTA versus vzorky plazmy PPT-EDTA. Všechny HCV pozitivní vzorky odebrané v séru nebo PPT-EDTA plazmě produkovala koncentrace HCV RNA v rozmezí  $\pm 0,5 \log_{10}$  IU / ml HCV pozitivního vzorku odebraného v EDTA plazmě při testování pomocí testu HCV VL.



Obrázek 11. - Rozptyl Log IU / mL PPT-EDTA proti Log IU / mL EDTA



Obrázek 12. Rozptyl log IU / ml séra proti log IU / ml plazmy EDTA

## 19. Výkonnostní charakteristiky – Klinická výkonost

### Specifita

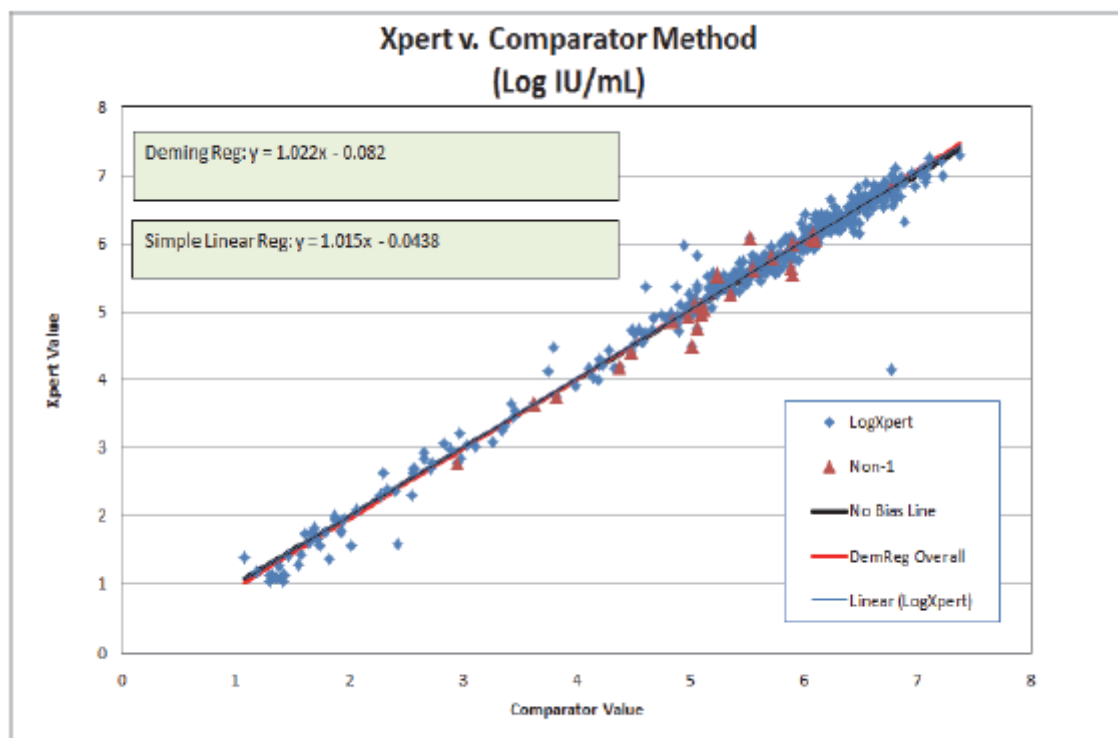
Specifita testu HCV VL byla hodnocena pomocí 100 vzorků plazmy EDTA od dárců krve negativních na HCV. Žádný ze 100 testovaných vzorků nebyl detekován testem HCV VL, což odpovídá 100% specifitě (95% CI = 96,1-100).

### Korelace metody

Byla provedena studie na více místech, aby se vyhodnotila účinnost testu HCV VL ve srovnání s metodou komparátoru s použitím čerstvého vzorku a zmrazených vzorků lidské plazmy nebo séra odebrané od jedinců infikovaných HCV. Každý ze 607 způsobilých vzorků od jedinečných jedinců bylo 408 (67,2%) sebráno od mužů. Průměrný věk byl s věkem  $50,2 \pm 13,2$  let rozmezí 21 až 86 let.

Z 607 vzorků bylo 389 v kvantitativním rozmezí obou testů včetně 23 vzorků, které byly HCV ne-1 genotypy (2, 2a, 2b, 2c, 3, 3a, 4 a 6) a jeden smíšený genotyp (HCV 1 a 6).

Demingova regrese ukazuje velmi dobrou korelaci mezi HCV VL a srovnávací metodou se sklonem 1,022 a se zastavením 0,082. R2 byl 0,986



\*HCV non-1 genotypes are represented as triangles. A single outlier was not included in the analysis.

Obrázek 13. Xpert vs konkurenční metoda

## 20. Reference

1. Di Bisceglie AM. Natural history of Hepatitis C: its impact on clinical management. *Hepatology* 2000; 31:1014-1018.
2. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of Hepatitis C. Consensus Statement. *J. Hepatology* 2011; vol. 55:245-264.
3. Mohd Hanafiah K., Groeger J., Flaxman AD., Wiersma S.T Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology* 2013; 57(4): 1333-1342.
4. Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis* 2005; 5:558-67. doi:10.1016/S1473-3099(05)70216-4 PMID: 16122679.
5. Graham CS., Swan T. A Path to Eradication of Hepatitis C in Low-and-Middle-Income Countries. *Antiviral Res.* 2015 Jan 20; pii: S0166-3542(15)00005-4. doi: 10.1016/j.antiviral.2015.01.004. [Epub ahead of print].
6. Region H Press Release. The number of people living with HIV and hepatitis is on the rise in Europe, Oct 2014. <http://newsite.hiveurope.edu/>
7. Hepatitis C Fact Sheet No 164 Updated April 2014, accessed January 28, 2015 at <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>
8. Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, et al. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology* 2009;49 (4):1335-1374.
9. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (refer to latest edition. <http://www.cdc.gov/biosafety/publications/>
10. Clinical and Laboratory Standards Institute. Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections, Approved Guideline. Document M29 (refer to latest edition).
11. REGULATION (EC) No 1272/2008 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 16 December 2008 on the classification labeling and packaging of substances and mixtures amending and repealing, List of Precautionary Statements, Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC (amending Regulation (EC)).
12. Occupational Safety and Health Standards, Hazard Communication, Toxic and Hazard Substances (March 26, 2012) (29C.F.R., pt. 1910, subpt. Z).

## **21. Sídlo společnosti Cepheid**

### **Severní Amerika**

Pro technickou podporu použijte následující kontakt:

Tel.: +1 888 838 3222, volba 2

Email: [techsupport@cepheid.com](mailto:techsupport@cepheid.com)

Technickou podporu firmy Cepheid můžete kontaktovat od pondělí do pátku od 6 hod. do 17 hod. pacifického času.

### **EU**

Pro technickou podporu použijte následující kontakt:















Tel.: +33 563 82 53 19

Email: [techsupport@cepheideurope.fr](mailto:techsupport@cepheideurope.fr)

## **22. Technická podpora**

Pro technickou podporu kontaktujte firmu Cepheid prostřednictvím jednoho z následujících kontaktů. Ujistěte se, že při telefonátu nebo formou emailu poskytnete sériové číslo přístroje a ID šarže reagensů.

## Tabulka symbolů:

Symbol	Význam
	Katalogové číslo
	Lékařské zařízení pro diagnostiku <i>In vitro</i>
	Nepoužívat opětovně
	Šarže
	Varování
	Nahlédněte do průvodních dokumentů
	Výrobce
	Obsah postačuje na <n> testů
	Použitelné do
	Kontrola
	Značka shody
	Autorizovaný prodejce pro Evropu
	Teplotní omezení
	Biologické riziko

### Výrobce

Cepheid

904 Caribbean Drive

Sunnyvale, CA 94089-1189

USA

### Autorizovaný zástupce

Cepheid Europe

Vira Solelh

81470 Maurens-Scopont / France

Tel.: +33-563-82-53-00 Fax: +33-563-82-53-01

Email: cepheid@cepheideurope.fr