

COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, version 2.0



PARA UTILIZAÇÃO EM DIAGNÓSTICO *IN VITRO*.

COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV
Quantitative Test, v2.0

HCVQTV2

72 Tests

P/N: 05532264 190

COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®
Wash Reagent

PG WR

5.1 Liters

P/N: 03587797 190

ÍNDICE

UTILIZAÇÃO PRETENDIDA.....	1
RESUMO E EXPLICAÇÃO DO TESTE.....	2
PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO.....	2
REAGENTES.....	5
ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES DE PROCEDIMENTO.....	7
REQUISITOS DE ARMAZENAMENTO E MANUSEAMENTO.....	8
MATERIAIS FORNECIDOS.....	8
MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS.....	9
COLHEITA, TRANSPORTE E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS.....	10
INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO.....	10
CONTROLO DE QUALIDADE.....	13
RESULTADOS.....	14
LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO.....	16
SUBSTÂNCIAS INTERFERENTES.....	17
AValiação DO DESEMPENHO NÃO CLÍNICO.....	18
BIBLIOGRAFIA.....	25

UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

O teste quantitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 é um teste de amplificação de ácidos nucleicos *in vitro*, destinado à quantificação dos genótipos 1 a 6 do ARN do vírus da hepatite C (HCV) em soro ou em plasma EDTA humano, utilizando o equipamento COBAS® AmpliPrep para o processamento automático de amostras e o analisador COBAS® TaqMan® ou o analisador COBAS® TaqMan® 48 para a amplificação e detecção automática. O teste destina-se a ser utilizado na gestão de doentes com infeção crónica por HCV em conjunto com marcadores clínicos e laboratoriais da infeção. O teste pode ser utilizado para prever a probabilidade de resposta virológica sustentada (SVR) nas primeiras fases da terapia antiviral, e para avaliar a resposta viral a tratamento antiviral (terapia guiada por resposta) conforme as alterações dos níveis de ARN do HCV em soro ou em plasma EDTA.

O teste quantitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 não se destina a ser utilizado como teste de rastreio para determinar a presença do HCV no sangue ou em produtos derivados do sangue, nem como um teste de diagnóstico para confirmar a presença de infeção pelo HCV.

RESUMO E EXPLICAÇÃO DO TESTE

O vírus da hepatite C é considerado como o principal agente etiológico responsável por 90 a 95% dos casos de hepatite pós-transfusional¹⁻⁴. O HCV é um vírus ARN de cadeia simples, polaridade positiva, apresentando um genoma de aproximadamente 9500 nucleótidos que codificam 3000 aminoácidos. Enquanto vírus transmitido por via sanguínea, o HCV pode ser transmitido através do sangue e de produtos derivados do sangue. A adopção generalizada de medidas de rastreio de HCV no sangue, reduziu significativamente o risco de hepatite associada a transfusões sanguíneas. A incidência de infecção por HCV é mais elevada em associação com o abuso de drogas por via intravenosa e, em menor grau, com outras exposições percutâneas⁴. A prevalência global de infecção por HCV, segundo determinação por imunoserologia, varia entre 0,6%, no Canadá, e 1,5%, no Japão⁵. As taxas de depuração viral espontânea em indivíduos expostos são muito variáveis; foram observadas taxas entre 10 e 60% quando medidas clinicamente por normalização das enzimas hepáticas e depuração de ARN do HCV do plasma⁵.

As partículas virais do HCV não podem ser cultivadas a partir de amostras de sangue infectado; por conseguinte a presença de anticorpos anti-HCV em doentes infectados por HCV deu origem ao desenvolvimento de ensaios imunoserológicos específicos para estes anticorpos. No entanto, a presença de anticorpos-HCV constitui uma medida de exposição anterior a infecção por HCV, mas não pode ser considerada um marcador para uma infecção actual. A medição de níveis de alanina aminotransferase (ALT) é considerada como sendo um indicador de substituição de infecção por HCV, mas não é uma medida directa de viremia.

Em contrapartida, a quantificação do ARN do HCV para determinar as cargas virais da linha de base e para monitorização durante o tratamento foi bem estabelecida na demonstração da eficácia de resposta antiviral à terapêutica combinada de pinterferon mais ribavirina⁶⁻¹⁰. Directrizes actuais para a gestão e tratamento do HCV recomendam que se efectuem testes quantitativos do ARN do HCV antes de se iniciar a terapia antiviral, durante a terapia (terapia guiada por resposta) e geralmente 12 a 24 semanas após o fim do tratamento. O objectivo do tratamento é a ausência de ARN do HCV detectável através de um teste sensível, 24 semanas após o fim do tratamento, a indicar que foi conseguida uma resposta virológica sustentada (SVR)¹¹. Durante a terapia antiviral é geralmente observada uma resposta virológica precoce (EVR), definida como um aumento de 2 log ou mais em ARN de HCV após 12 semanas de terapia. A não obtenção de uma EVR tem um valor preditivo altamente negativo para se obter uma SVR e tem sido incorporada em regras de paragem por futilidade para terapias de interferon peguado e ribavirina¹¹⁻¹³. Uma resposta virológica rápida (RVR) com níveis indetectáveis de ARN do HCV após 4 semanas de terapia, tem um valor preditivo altamente positivo para se obter uma SVR¹⁴. A determinação da cinética viral durante a terapia tem sido utilizada mais recentemente para personalizar ainda mais a duração do tratamento com os novos agentes antivirais de acção directa para o tratamento de infecções crónicas por HCV^{15,16}.

PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

O teste quantitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 é um teste de amplificação de ácidos nucleicos, destinado à quantificação do ARN do vírus da hepatite C (HCV) em soro ou plasma EDTA humano. A preparação de amostras é automatizada utilizando o equipamento COBAS® AmpliPrep, com amplificação e detecção automatizadas utilizando o analisador COBAS® TaqMan® ou o analisador COBAS® TaqMan® 48.

O teste quantitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 baseia-se em três processos principais: (1) preparação de amostras para isolar ARN do HCV; (2) transcrição reversa do ARN alvo para produzir ADN complementar (cADN) e (3) realização simultânea de amplificação por PCR do cADN alvo e detecção das sondas de detecção oligonucleotídicas duplamente marcadas e clivadas específicas do alvo.

Preparação de Amostras

O teste quantitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 efectua a preparação automática de amostras no equipamento COBAS® AmpliPrep através de uma técnica genérica de captura à base de sílica. O volume de entrada de amostra é de 650 µl, enquanto que o procedimento processa 500 µl de plasma EDTA ou soro. As partículas virais do HCV são sujeitas a lise por incubação a uma temperatura elevada com protease e lise caotrópica/tampão de ligação para libertar ácidos nucleicos e proteger o ARN do HCV libertado de RNases no soro ou plasma EDTA. Introduz-se em cada amostra protease e um número conhecido de moléculas de ARN do Padrão de Quantificação (PQ) do HCV, juntamente com o reagente de lise e partículas magnéticas de vidro. Subsequentemente, a mistura é incubada e o ARN do HCV e o ARN do PQ do HCV ligam-se à superfície das partículas magnéticas de vidro. As substâncias não ligadas, tais como sais, proteínas e outras impurezas celulares, são removidas lavando as partículas magnéticas de vidro. Depois da separação das esferas e conclusão dos passos de lavagem, os ácidos nucleicos adsorvidos são eluídos a uma temperatura elevada com uma solução aquosa. A amostra processada, contendo o ARN do HCV e o ARN do PQ do HCV libertados, é adicionada à mistura de amplificação e transferida para o analisador COBAS® TaqMan® ou para o analisador COBAS® TaqMan® 48.

Transcrição reversa e amplificação por PCR

O teste quantitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 utiliza transcrição reversa do ARN do HCV para produzir ADN complementar (cADN) e amplificação por PCR do cADN utilizando iniciadores que definem uma sequência dentro da região 5' não traduzida, altamente conservada do genoma do HCV¹⁷. A sequência de nucleótidos dos iniciadores foi otimizada para se obter uma amplificação comparável dos genótipos 1 a 6 do HCV. A reacção de transcrição reversa e amplificação por PCR é efectuada com uma mistura otimizada de enzimas termostáveis recombinantes: polimerase do ADN Z05 e Z05D. Na presença de manganês (Mn^{2+}) e sob condições de tamponamento apropriadas, a Z05 e a Z05D apresentam uma actividade simultaneamente de transcriptase reversa e de polimerase do ADN. Isto permite que a transcrição reversa e a amplificação por PCR ocorram em conjunto com a detecção em tempo real do amplicon.

As amostras processadas são adicionadas à mistura de amplificação em tubos de amplificação (tubos-K) nos quais têm lugar a transcrição reversa e a amplificação por PCR. A mistura de reacção é aquecida para permitir que um iniciador a jusante se ligue especificamente ao ARN alvo do HCV e ao ARN do PQ do HCV. Na presença de Mn^{2+} e de trifosfatos de desoxinucleósidos (dNTPs) em excesso, incluindo trifosfatos de desoxiadenosina, de desoxiguanosina, de desoxicitidina e de desoxiuridina, as polimerases Z05 e Z05D alongam os iniciadores ligados formando a uma cadeia de ADN complementar do ARN alvo.

Amplificação do Alvo

Após a transcrição reversa do ARN alvo do HCV e do ARN do PQ do HCV, o termociclador do analisador COBAS® TaqMan® ou do analisador COBAS® TaqMan® 48 aquece a mistura de reacção para desnaturar os híbridos ARN:cADN e expor as específicas sequências alvo do iniciador. À medida que a mistura arrefece, os iniciadores ligam-se ao cADN alvo. As polimerases de ADN termostáveis (Z05 e Z05D), na presença de Mn^{2+} e de trifosfatos de desoxinucleósido (dNTPs) em excesso, alongam os iniciadores ligados ao longo do modelo alvo para produzir uma molécula de ADN de dupla cadeia denominada amplicon. O analisador COBAS® TaqMan® ou o analisador COBAS® TaqMan® 48 repete automaticamente este processo durante um determinado número de ciclos, cada um duplicando eficazmente a quantidade de ADN amplicon. O número necessário de ciclos é pré-programado no analisador COBAS® TaqMan® ou no analisador COBAS® TaqMan® 48. A amplificação ocorre apenas na região do genoma do HCV que se encontra entre os iniciadores; não se amplifica todo o genoma do HCV.

Amplificação selectiva

No teste quantitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0, a amplificação selectiva do ácido nucleico alvo da amostra é conseguida com a utilização de uma enzima AmpErase (uracil-N-glicosilase) e de trifosfato de desoxiuridina (dUTP). A enzima AmpErase reconhece e catalisa a destruição de cadeias de ADN que contêm desoxiuridina¹⁸, mas não as de ADN que contêm desoxitimidina. A desoxiuridina não se encontra em ADN existente na natureza, mas está sempre presente no amplicon, devido ao uso de trifosfato de desoxiuridina como um dos dNTPs do reagente de Mistura Principal; por conseguinte, o amplicon é o único que contém desoxiuridina. A desoxiuridina torna o amplicon contaminante susceptível à destruição pela enzima AmpErase antes da amplificação do ADN alvo. Igualmente, qualquer produto não específico formado após a activação inicial da Mistura Principal pelo manganês é destruído pela enzima AmpErase. A enzima AmpErase, que está incluída no reagente de Mistura Principal, catalisa a clivagem de ADN contendo desoxiuridina em resíduos de desoxiuridina, abrindo a cadeia de desoxiribose na posição C1. Quando aquecida no primeiro passo do ciclo térmico, a cadeia de ADN do amplicon quebra-se na posição da desoxiuridina, tornando assim o ADN não amplificável. A enzima AmpErase permanece inactiva durante um longo período de tempo uma vez exposta a temperaturas acima dos 55 °C, ou seja, durante os passos de ciclismo térmico, pelo que não destrói o amplicon alvo formado durante toda a reacção de PCR.

Deteção de sondas duplamente marcadas e clivadas e quantificação do ARN do HCV

O teste quantitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 utiliza tecnologia de PCR em tempo real^{24,25}. A utilização de sondas fluorescentes duplamente marcadas permite a detecção em tempo real da acumulação de produtos da PCR, monitorizando a intensidade da emissão dos corantes sinalizadores fluorescentes libertados durante o processo de amplificação. As sondas consistem em sondas oligonucleotídicas específicas do HCV e do PQ do HCV com um corante sinalizador e um corante supressor. No teste quantitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0, as sondas do HCV e do PQ do HCV estão marcadas com diferentes corantes sinalizadores fluorescentes. Quando estas sondas estão intactas, a fluorescência do corante sinalizador é suprimida pela proximidade do corante supressor devido aos efeitos de transferência de energia do tipo Förster. Durante a PCR, a sonda hibridiza-se para uma sequência alvo e é clivada pela actividade da nuclease 5' → 3' das polimerases do ADN Z05 e Z05D termoestáveis. Uma vez libertados e separados os corantes de sinalização e de supressão, a supressão deixa de ocorrer, e é aumentada a actividade fluorescente do corante sinalizador. As amplificações do ARN do HCV e do ARN do PQ do HCV são determinadas independentemente a diferentes comprimentos de onda. Este processo é repetido durante um número designado de ciclos, sendo a intensidade da emissão dos corantes sinalizadores individuais aumentada eficazmente com cada ciclo, permitindo a identificação independente do ARN do HCV e do ARN do PQ do HCV. O ciclo de PCR onde uma curva de crescimento inicia um crescimento exponencial está relacionada com a quantidade de material iniciador no começo da PCR.

A quantificação do ARN viral do HCV é realizada utilizando o PQ do HCV. Compensa os efeitos de inibição e controla os processos de preparação e amplificação, permitindo uma quantificação mais rigorosa do ARN do HCV presente em cada amostra. O PQ do HCV é uma estrutura de Armored ARN (aARN) não infecciosa que contém fragmentos de sequências de HCV com locais de ligação do iniciador idênticos aos do ARN alvo do HCV e uma região única de ligação da sonda que permite que o amplicon do PQ do HCV se distinga do amplicon alvo do HCV.

O PQ do HCV é adicionado a cada amostra a um número conhecido de cópias e é utilizado na preparação da amostra, transcrição reversa e amplificação por PCR e detecção das sondas de detecção oligonucleotídicas duplamente marcadas e clivadas. O analisador COBAS® TaqMan® ou o analisador COBAS® TaqMan® 48 calcula a concentração do ARN do HCV nas amostras de teste, comparando o sinal do HCV com o sinal do PQ do HCV em cada amostra e controlo.

Durante a fase de prolongamento da PCR no analisador COBAS® TaqMan® ou no analisador COBAS® TaqMan® 48, as amostras são iluminadas e excitadas por luz filtrada, e são recolhidos dados de fluorescência das emissões filtradas para cada amostra. As leituras de cada amostra são então corrigidas tendo em conta as flutuações de equipamentos. Estas leituras de fluorescência são enviadas pelo equipamento para o software AMPLILINK e armazenadas numa base de dados. Verificações prévias são utilizadas para determinar se os dados de ARN do HCV e de ARN do PQ do HCV representam conjuntos válidos, sendo gerados alarmes quando os dados se encontram fora dos limites predefinidos. Depois de concluídas e aprovadas todas as verificações prévias, as leituras de fluorescência são processadas para gerar valores de Ct para o ARN do HCV e para o ARN do PQ do HCV. As constantes de calibração específicas do lote fornecidas com o teste quantitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 são geradas utilizando material de calibração e são utilizadas para calcular o valor do título das amostras e controlos com base na diferença entre os valores de Ct do ARN do HCV e do ARN do PQ do HCV. O teste quantitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 está normalizado de acordo com o Padrão Internacional da OMS para o ARN do vírus da hepatite C para Ensaios de Tecnologia de Amplificação de Ácidos Nucleicos (código NIBSC 96/798)²³, e os resultados dos títulos são referidos em Unidades Internacionais por mililitro (UI/ml).

REAGENTES

COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV

Quantitative Test, v2.0

(P/N: 05532264 190)

HCVQTV2

72 testes

HCV QT v2.0 CS1

(Cassete de Reagente de Partículas Magnéticas de Vidro HCV)

Partículas magnéticas de vidro

Tampão Tris

0,09% de azida sódica

0,1% de metilparabeno

1 x 72 testes

1 x 7,0 ml

HCV QT v2.0 CS2

(Cassete de Reagente de Lise do HCV)

Citrato de sódio dihidratado

42,5% de tiocianato de guanidina

< 6% de polidocanol

0,9% de ditiotretol

1 x 72 testes

1 x 78 ml

HCV QT v2.0 CS3

Cassete Multi-Reagente de HCV contendo:

Pase

(Solução de proteinase)

Tampão Tris

< 0,05% de EDTA

Cloreto de cálcio

Acetato de cálcio

≤ 7,8% de proteinase

Glicerol

1 x 72 testes

1 x 3,8 ml

EB

(Tampão de eluição)

Tampão base Tris

0,09% de azida sódica

1 x 8,1 ml

HCV QT v2.0 CS4

Cassete de Reagente Específica de Teste HCV contendo:

QS

(Padrão de Quantificação do HCV)

Tampão Tris

EDTA

< 0,002% de ARN de Poli rA (sintético)

< 0,001% de estrutura de Armored RNA do HCV

contendo sequências de ligação do iniciador do HCV e

uma região única de ligação da sonda (ARN não

infectioso em bacteriófagos MS2)

0,05% de azida sódica

1 x 72 testes

1 x 3,6 ml

MMX (Mistura Principal HCV) Tampão de tricina Acetato de potássio Hidróxido de potássio < 20% de sulfóxido de dimetilo Glicerol < 0,004% de dATP, dCTP, dGTP, dUTP < 0,002% de iniciadores a montante e a jusante para a região 5' UTR (não traduzida) do HCV < 0,001% de sondas oligonucleotídicas de marcação fluorescente específicas para o HCV e para o Padrão de Quantificação do HCV < 0,001% de aptâmero oligonucleotídico < 0,05% das polimerases do ADN Z05 e Z05D (de origem microbiana) < 0,1% de enzima de AmpErase (uracil-N-glicosilase) (de origem microbiana) 0,09% de azida sódica	1 x 3,5 ml
Mn²⁺ (Solução de Manganês) < 0,5% de acetato de manganês Ácido acético glacial 0,09% de azida sódica	1 x 19,8 ml
HCV H(+)-C, v2.0 (Controlo Positivo Alto do HCV) < 0,001% de estrutura de Armored RNA contendo sequências do HCV (ARN não infeccioso em bacteriófagos MS2) Plasma humano negativo, não reactivo em testes para anticorpos contra HCV, anticorpos contra HIV-1/2, antígeno p24 do HIV e HBsAg; ARN do HIV-1, ARN do HCV e ADN do HBV não detectáveis por métodos de PCR 0,1% de conservante ProClin® 300	6 x 0,85 ml
HCV L(+)-C, v2.0 (Controlo Positivo Baixo do HCV) < 0,001% de estrutura de Armored RNA contendo sequências do HCV (ARN não infeccioso em bacteriófagos MS2) Plasma humano negativo, não reactivo em testes para anticorpos contra HCV, anticorpos contra HIV-1/2, antígeno p24 do HIV e HBsAg; ARN do HIV-1, ARN do HCV e ADN do HBV não detectáveis por métodos de PCR 0,1% de conservante ProClin® 300	6 x 0,85 ml
CTM (-) C [Controlo Negativo (Plasma Humano) COBAS® TaqMan®] Plasma humano negativo, não reactivo em testes para anticorpos contra HCV, anticorpos contra HIV-1/2, antígeno p24 do HIV e HBsAg; ARN do HIV-1, ARN do HCV e ADN do HBV não detectáveis por métodos de PCR 0,1% de conservante ProClin® 300	6 x 1,0 ml

HCV H(+)C, v2.0 Clip

(Clipe de código de barras de Controlo Positivo Alto do HCV)

1 x 6 Clipes

HCV L(+)C, v2.0 Clip

(Clipe de código de barras de Controlo Positivo Baixo do HCV)

1 x 6 Clipes

HCV (–) C, v2.0 Clip

(Clipe de código de barras de Controlo Negativo do HCV)

1 x 6 Clipes

COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® Wash Reagent
 Reagente de Lavagem COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®
 (P/N: 03587797 190)

PG WR

1 x 5,1 l

PG WR

(Reagente de Lavagem COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®)
 Citrato de sódio dihidratado
 < 0,1% de N-Metilisotiazolona-HCl

ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES DE PROCEDIMENTO

À semelhança do que sucede com qualquer procedimento de teste, uma boa técnica laboratorial é essencial para um desempenho adequado deste ensaio. Em virtude da elevada sensibilidade deste teste, deverão ser tomadas as devidas precauções para manter os reagentes e as misturas de amplificação livres de contaminação.

- A. PARA UTILIZAÇÃO EM DIAGNÓSTICO *IN VITRO*.
- B. Este teste destina-se a ser utilizado com soro humano ou plasma colhido no anticoagulante EDTA.
- C. Não pipetar com a boca.
- D. Não comer, beber nem fumar nas áreas de trabalho do laboratório. Usar luvas protectoras descartáveis, batas de laboratório e protecção para os olhos quando manusear amostras e reagentes do kit. Lavar cuidadosamente as mãos após manusear amostras e reagentes do teste.
- E. Evite a contaminação microbiana e por ribonuclease dos reagentes quando remover as alíquotas dos frascos de controlo.
- F. Recomenda-se a utilização de pipetas e de pontas de pipeta isentas de RNase esterilizadas e descartáveis.
- G. Não misture controlos de lotes diferentes nem de frascos diferentes do mesmo lote.
- H. Não misture cassetes de reagente ou controlos de kits diferentes.
- I. Não abra cassetes COBAS® AmpliPrep, nem troque, misture, retire ou acrescente frascos.
- J. Elimine os reagentes não usados, resíduos e amostras em conformidade com os regulamentos nacionais, federais, estaduais e locais.
- K. Não utilize os kits fora do prazo de validade.
- L. Estão disponíveis Folhas de Dados de Segurança (SDS, Safety Data Sheets) que podem ser solicitadas ao representante local da Roche.
- M. As amostras e os controlos deverão ser manipulados como se estivessem infectados, utilizando procedimentos de laboratório seguros, tais como os delineados em *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*¹⁹ e no Documento M29-A3 do CLSI²⁰. Limpe e desinfecte cuidadosamente todas as superfícies de trabalho com uma solução recentemente preparada de hipocloreto de sódio a 0,5 % em água desionizada ou destilada.
- N. Os **CTM (–) C, HCV L(+)C, v2.0** e **HCV H(+)C, v2.0** contêm plasma humano derivado do sangue humano. O material de origem foi submetido a testes e considerado como não reactivo para a presença de antígeno de superfície da Hepatite B (HBsAg), anticorpos contra o HIV-1/2 e o HCV, e antígeno p24 do HIV. Os testes de Plasma Humano Negativo através de métodos PCR não mostraram quaisquer ARN

de HIV-1, ARN de HCV ou ADN de HBV detectáveis. Nenhum método de teste conhecido pode oferecer uma garantia completa de que os produtos derivados do sangue humano não transmitirão agentes infecciosos. Por conseguinte, todo o material de origem humana, incluindo os **CTM (-) C**, **HCV L(+)-C, v2.0** e **HCV H(+)-C, v2.0**, deverá ser considerado como potencialmente infeccioso.

- O. Os **MGP**, **EB**, **QS**, **Mn²⁺** e **MMX** contêm azida sódica. A azida sódica pode reagir com tubagens de chumbo e de cobre, produzindo azidas metálicas altamente explosivas. Ao eliminar soluções com azida sódica pela canalização do laboratório, lave os canos com água em abundância, de modo a evitar a acumulação de azidas.
- P. Use protecção para os olhos, batas de laboratório e luvas descartáveis quando manusear qualquer reagente. Evitar o contacto destes materiais com a pele, olhos ou membranas mucosas. Se ocorrer contacto, lavar imediatamente com água em abundância. Caso não seja efectuado tratamento, podem surgir queimaduras. Caso ocorra derramamento destes reagentes, dilua com água antes de limpar.
- Q. Não permita que **HCV QT v2.0 CS2** e desperdícios líquidos incluindo Unidades de Processamento de Amostras (SPUs) **COBAS® AmpliPrep** usadas do equipamento **COBAS® AmpliPrep**, que contém tiocianato de guanidina, entrem em contacto com solução de hipocloreto de sódio (lixívia). Estas misturas podem produzir um gás altamente tóxico.

REQUISITOS DE ARMAZENAMENTO E MANUSEAMENTO

- A. Antes de utilizar, inspecione visualmente cada cassete de reagente para se assegurar de que não existem sinais de derrame. Se existir algum indício de derrame, não utilize esse material para testes.
- B. Armazene os **HCV QT v2.0 CS1**, **HCV QT v2.0 CS2**, **HCV QT v2.0 CS3** e **HCV QT v2.0 CS4** entre 2 e 8 °C. Se não forem usados, estes reagentes mantêm-se estáveis até ao fim do prazo de validade indicado. Uma vez usados, estes reagentes mantêm-se estáveis durante 70 dias entre 2 e 8 °C, ou até ao fim do prazo de validade indicado, o que primeiro se verificar. Os **HCV QT v2.0 CS1**, **HCV QT v2.0 CS2**, **HCV QT v2.0 CS3** e **HCV QT v2.0 CS4** podem ser utilizados até um máximo de 96 horas acumuladas a bordo do equipamento **COBAS® AmpliPrep**. Os reagentes devem ser armazenados entre 2 e 8 °C entre os ciclos do equipamento.
- C. Armazene os **HCV H(+)-C, v2.0**, **HCV L(+)-C, v2.0** e **CTM (-) C** a uma temperatura entre 2 e 8 °C. Os controlos mantêm-se estáveis até ao fim do prazo de validade indicado. Uma vez abertos, qualquer porção não usada tem de ser eliminada.
- D. Armazene os cliques de códigos de barras [**HCV H(+)-C, v2.0 Clip**, **HCV L(+)-C, v2.0 Clip** e **HCV (-) C, v2.0 Clip**] a uma temperatura entre 2 e 30 °C.
- E. Armazene o **PG WR** a uma temperatura entre 2 e 30 °C. Sem ter sido utilizado, o **PG WR** permanece estável até ao fim do prazo de validade indicado. Uma vez aberto, este reagente mantêm-se estável durante 28 dias entre 2 e 30 °C, ou até ao fim do prazo de validade indicado, o que primeiro se verificar.

MATERIAIS FORNECIDOS

COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0

HCVQTV2

HCV QT v2.0 CS1

(Cassete de Reagente de Partículas Magnéticas de Vidro HCV)

HCV QT v2.0 CS2

(Cassete de Reagente de Lise do HCV)

HCV QT v2.0 CS3

(Cassete de Multi-Reagentes do HCV)

HCV QT v2.0 CS4

(Cassete de Reagente Específica de Teste HCV)

HCV H(+)-C, v2.0

(Controlo Positivo Alto do HCV)

HCV L(+)-C, v2.0

(Controlo Positivo Baixo do HCV)

CTM (-) C

[Controlo Negativo (Plasma Humano) COBAS® TaqMan®]

HCV H(+)C, v2.0 Clip

(Clipe de código de barras de Controlo Positivo Alto do HCV)

HCV L(-)C, v2.0 Clip

(Clipe de código de barras de Controlo Positivo Baixo do HCV)

HCV (-) C, v2.0 Clip

(Clipe de código de barras de Controlo Negativo do HCV)

COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® Wash Reagent
Reagente de Lavagem COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®

PG WR

PG WR

(Reagente de Lavagem COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®)

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

Equipamentos e Software

- Equipamento COBAS® AmpliPrep
 - Analisador COBAS® TaqMan® ou analisador COBAS® TaqMan® 48
 - Docking Station (Estação de Ancoragem) - (opcional)
 - Equipamento **cobas p** 630 (opcional)
 - Software AMPLILINK versão série 3.3 ou versão série 3.4
 - Unidade de controlo para o software AMPLILINK, com impressora
 - Manuais do equipamento e do software:
 - Manual do equipamento COBAS® AmpliPrep para utilização com o software AMPLILINK versão série 3.3 ou versão série 3.4
 - Manual do equipamento para o analisador COBAS® TaqMan® para utilização com o software AMPLILINK versão série 3.3 ou versão série 3.4
 - Manual do equipamento para o analisador COBAS® TaqMan® 48 para utilização com o software AMPLILINK versões série 3.3 e 3.4
 - Manual de Aplicação do software AMPLILINK Versão Série 3.3 para utilização com o equipamento COBAS® AmpliPrep, o analisador COBAS® TaqMan®, o analisador COBAS® TaqMan® 48, o analisador COBAS® AMPLICOR e o equipamento **cobas p** 630
- ou
- Manual da Aplicação do Software AMPLILINK Versão Série 3.4
 - Opcional: manual do Operador do equipamento **cobas p** 630, versão do software 2.2
- Ficheiro de Definição de Teste (TDF). Para o nome e a versão actual do TDF, consulte o cartão informativo do produto fornecido no kit.

Outros materiais

- Rack de amostras (rack SK 24)
- Rack de reagentes
- Rack de SPU's
- Suporte-K
- Transportador de suporte-K
- Rack de suportes-K

- Pipetas com pontas com barreira para aerossóis ou de deslocamento positivo isentas de RNase (capacidade de 1000 µl); a precisão das pipetas deve situar-se dentro de 3% do volume indicado. Devem ser usadas pontas com barreira para aerossóis ou de deslocamento positivo e isentas de RNase para impedir a contaminação cruzada da amostra e do amplicon.
- Luvas descartáveis, sem pó
- Misturador de agitação forte

Produtos descartáveis

- Unidades de processamento de amostras (SPUs)
- Tubos de entrada de amostras (tubos-S) com cliques de códigos de barras
- Rack de pontas-K
- Caixa de tubos-K de 12 x 96

COLHEITA, TRANSPORTE E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS

NOTA: *Manuseie todas as amostras e controlos tendo em conta a possibilidade de transmitirem agentes infecciosos.*

Colheita e Armazenamento de Amostras

O teste quantitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 destina-se a ser utilizado com amostras de soro ou plasma EDTA. O sangue deverá ser colhido em Tubos de Separação de Soro SST®. Tubos de Preparação de Plasma BD Vacutainer® PPT™ para métodos de teste de diagnóstico molecular ou em tubos esterilizados utilizando EDTA (topo lilás) como anticoagulante. Para o manuseamento dos tubos de colheita, siga as instruções do fabricante. As amostras acabadas de colher (sangue total) poderão ser conservadas entre 2 a 25 °C durante até 24 horas antes da centrifugação. Depois da centrifugação, transfira o soro ou plasma EDTA para um tubo de polipropileno esterilizado. Recomenda-se que as amostras sejam armazenadas em alíquotas de aproximadamente 1000 µl, em tubos de polipropileno esterilizados de 2,0 ml, com tampas de enroscar (tais como os micro tubos de 2 ml com tampa de enroscar da Sarstedt). As amostras de soro ou plasma EDTA podem ser armazenadas:

- Entre 2 e 8 °C durante até 72 horas
- Entre -20 °C e -80 °C durante até 6 semanas

As amostras de soro e plasma EDTA podem ser congeladas e descongeladas até um máximo de 5 vezes sem perda de ARN do HCV.

Transporte de Amostras

O transporte de sangue total, soro ou plasma EDTA deve obedecer às regulamentações nacionais, federais, estaduais e locais relativas ao transporte de agentes etiológicos²¹. O sangue total deve ser transportado entre 2 e 25 °C e centrifugado no prazo de 24 horas após a colheita. O plasma EDTA ou o soro podem ser transportados entre 2 °C e 8 °C ou congelados entre -20 °C e -80 °C.

INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

Para instruções de funcionamento detalhadas, uma descrição das configurações possíveis, impressão de resultados e interpretação de alarmes, comentários e mensagens de erro, consulte os manuais do software AMPLILINK, versão série 3.3 ou 3.4, conforme indicado na lista da secção "Equipamentos e Software".

Tamanho do lote e Configuração

Cada kit contém reagentes suficientes para 72 testes, que podem ser executados em lotes de 12 a 24 testes. Pelo menos um de cada controlo [CTM (-) C, HCV L(+)C, v2.0 e HCV H(+)C, v2.0] deve ser incluído em cada lote (consultar a secção "Controlo de Qualidade"). A execução no analisador COBAS® TaqMan® 48 tem que ser iniciada no prazo de 120 minutos após a conclusão da preparação de amostras e controlos. Não CONGELE nem ARMAZENE amostras e controlos processados entre 2 e 8 °C.

Preparação de Amostras e Controlos

Se utilizar amostras congeladas, coloque as amostras à temperatura ambiente até ficarem completamente descongeladas e misture com agitação forte durante 3 a 5 segundos antes de utilizar. Os controlos deverão ser retirados do armazenamento entre 2 e 8 °C, equilibrados à temperatura ambiente e misturados com agitação forte durante 3 a 5 segundos antes de utilizar.

Configuração do equipamento COBAS® AmpliPrep

Parte A. Manutenção e Purga

- A1. O equipamento COBAS® AmpliPrep está pronto para funcionar em modo de espera (stand-by).
- A2. Ligue (ON) a unidade de controlo do software AMPLILINK. Prepare a unidade de controlo da seguinte maneira:
 1. Inicie sessão no sistema operativo Microsoft Windows.
 2. Faça duplo clique no ícone do software AMPLILINK.
 3. Inicie sessão no software AMPLILINK introduzindo a ID de utilizador e a palavra-passe.
- A3. Verifique a quantidade do **PG WR** através do ecrã **Status** e substitua, caso seja necessário.
- A4. Execute todos os itens de manutenção existentes na lista do separador **Due**. O equipamento COBAS® AmpliPrep faz automaticamente a purga do sistema.

Parte B. Carregamento de Cassetes de Reagente

NOTA: *Todas as cassetes de reagente devem ser retiradas do armazenamento entre 2 e 8 °C, carregadas imediatamente no equipamento COBAS® AmpliPrep e deixadas equilibrar à temperatura ambiente no equipamento pelo menos 30 minutos antes da primeira amostra ser processada. Não deixe que as cassetes de reagente atinjam a temperatura ambiente fora do equipamento, dado que se pode formar condensação nas etiquetas de códigos de barras. Não limpe a condensação se esta se formar nas etiquetas de códigos de barras.*

- B1. Coloque **HCV QT v2.0 CS1** numa rack de reagentes. Coloque **HCV QT v2.0 CS2**, **HCV QT v2.0 CS3** e **HCV QT v2.0 CS4** numa rack de reagentes diferente.
- B2. Carregue a rack de reagentes que contém **HCV QT v2.0 CS1** na posição de rack A do equipamento COBAS® AmpliPrep.
- B3. Carregue a rack de reagentes que contém **HCV QT v2.0 CS2**, **HCV QT v2.0 CS3** e **HCV QT v2.0 CS4** na posição de rack **B**, **C**, **D** ou **E** do equipamento COBAS® AmpliPrep (para informações mais detalhadas, consulte os manuais do equipamento apropriados).

Parte C. Carregamento de Produtos Descartáveis

NOTA: *Determine o número necessário de cassetes de reagente COBAS® AmpliPrep, unidades de processamento de amostras (SPUs), tubos de entrada de amostras (tubos-S), pontas-K e tubos-K. Para cada amostra ou controlo são necessários uma SPU, um tubo-S de entrada, uma ponta-K e um tubo-K.*

São possíveis várias configurações para a utilização do equipamento COBAS® AmpliPrep com o analisador COBAS® TaqMan® ou o analisador COBAS® TaqMan® 48. Consoante a configuração utilizada, carregue o número adequado de racks de cassetes de reagentes, racks de amostras com tubos-S de entrada, racks de SPU, racks de pontas-K, racks de tubos-K e suportes-K em racks de suportes-K nas respectivas posições de rack do equipamento COBAS® AmpliPrep.

- C1. Coloque as SPU(s) na(s) rack(s) de SPU e carregue a(s) rack(s) na posição de rack **J**, **K** ou **L** do equipamento COBAS® AmpliPrep.
- C2. Consoante a configuração utilizada, carregue rack(s) cheia(s) de tubos-K na posição de rack **M**, **N**, **O** ou **P** do equipamento COBAS® AmpliPrep.

- C3. Carregue rack(s) cheia(s) de pontas-K na posição de rack **M, N, O** ou **P** do equipamento COBAS® AmpliPrep.
- C4. Consoante a configuração utilizada, carregue suportes-K em rack(s) de suportes-K na posição de rack **M, N, O** ou **P** do equipamento COBAS® AmpliPrep.

Parte D. Pedido e Carregamento de Amostras

- D1. Prepare as racks de amostras da seguinte maneira: prenda um clipe de etiqueta de código de barras a cada posição de rack de amostras onde será colocada uma amostra (tubo-S). Prenda um dos cliques de etiquetas de códigos de barras específicos para os controlos [**CTM (-) C, HCV L(+)-C, v2.0** e **HCV H(+)-C, v2.0**] a cada posição de rack de amostras onde os controlos (tubo-S) serão colocados. Os cliques de etiquetas de códigos de barras dos controlos devem ter o mesmo número de lote de controlo dos frascos de controlo do kit. Tenha cuidado para atribuir o controlo correcto à posição com o clipe de código de barras de controlo adequado. Coloque um tubo-S de entrada em cada posição que contém um clipe de etiqueta de código de barras.
- D2. Utilizando o software AMPLILINK, crie pedidos de amostras para todas as amostras e controlos no separador **Sample** da janela **Orders**. Seleccione o ficheiro de teste apropriado e conclua guardando.
- D3. Atribua pedidos de amostras e de controlos às posições de rack de amostras no separador **Sample Rack** da janela **Orders**. O número da rack de amostras deve ser o mesmo da rack preparada no Passo D1.
- D4. Imprima o relatório Sample Rack Order (Pedido de rack de amostras) para utilizar como uma folha de trabalho.
- D5. Prepare racks de amostras e de controlos na área designada para a adição de amostras e controlos, da seguinte maneira: Misture com agitação forte cada amostra e controlo [**CTM (-) C, HCV L(+)-C, v2.0** e **HCV H(+)-C, v2.0**] durante 3 a 5 segundos. Evite contaminar as luvas quando manipular as amostras e controlos.
- D6. Transfira 650 µl de cada amostra e controlo [**CTM (-) C, HCV L(+)-C, v2.0** e **HCV H(+)-C, v2.0**] para o tubo-S de entrada apropriado com etiqueta de código de barras, utilizando uma micropipeta com uma ponta com barreira para aerossóis ou de deslocamento positivo isenta de RNase. **Evite transferir partículas e/ou coágulos de fibrina da amostra original para o tubo-S de entrada.** As amostras e controlos devem ser transferidos para posições de tubos, conforme atribuído e registado na folha de trabalho do passo D4. Os cliques de etiquetas de códigos de barras dos controlos devem ter o mesmo número de lote de controlo dos frascos de controlo do kit. Atribua o controlo correcto à posição com o clipe de código de barras de controlo adequado. **Evite contaminar a parte superior dos tubos-S com amostras ou controlos.**
- D7. Se utilizar o equipamento **cobas p 630** para a preparação de amostras, consulte o Manual do Operador do equipamento **cobas p 630**.
- D8. Consoante a configuração utilizada, carregue a(s) rack(s) de amostras cheia(s) com tubos-S de entrada nas posições de rack **F, G** ou **H** do equipamento COBAS® AmpliPrep.
- D9. Consoante a configuração utilizada, carregue a(s) rack(s) de amostras com tubos-S de entrada e tubos-K (um para cada tubo-S de entrada, carregado na posição da direita adjacente aos tubos-S de entrada) na posição de rack **F, G** ou **H** do equipamento COBAS® AmpliPrep.

Parte E. Início da execução no equipamento COBAS® AmpliPrep

- E1. Inicie o equipamento COBAS® AmpliPrep utilizando o software AMPLILINK.

Parte F. Final da execução no equipamento COBAS® AmpliPrep e transferência para o analisador COBAS® TaqMan® ou o analisador COBAS® TaqMan® 48 (apenas para transferência manual)

- F1. Verifique se existem alarmes ou mensagens de erro.
- F2. Retire as amostras e os controlos processados do equipamento COBAS® AmpliPrep em racks de amostras (para o analisador COBAS® TaqMan® sem Estação de Acoplagem) ou em racks de suportes-K (para o analisador COBAS® TaqMan® 48), consoante a configuração.
- F3. Remova os desperdícios do equipamento COBAS® AmpliPrep.

NOTA: *Todas as amostras e controlos processados não devem ser expostos à luz depois de concluída a preparação de amostras e controlos.*

Amplificação e detecção

Configuração do analisador COBAS® TaqMan® ou analisador COBAS® TaqMan® 48

A execução no analisador COBAS® TaqMan® ou no analisador COBAS® TaqMan® 48 tem que ser iniciada no prazo de 120 minutos após a conclusão da preparação de amostras e controlos. Não CONGELE nem ARMAZENE amostras e controlos processados entre 2 e 8 °C.

Parte G. Carregamento de Amostras Processadas

- G1. Consoante a configuração do equipamento, execute os passos apropriados para transferir os tubos-K para o analisador COBAS® TaqMan® ou o analisador COBAS® TaqMan® 48:

Parte H. Início da execução no analisador COBAS® TaqMan® ou no analisador COBAS® TaqMan® 48

- H1. Inicie o analisador COBAS® TaqMan® ou o analisador COBAS® TaqMan® 48 consoante a configuração utilizada.

Parte I. Final da execução no analisador COBAS® TaqMan® ou no analisador COBAS® TaqMan® 48

- I1. Após a conclusão da execução no analisador COBAS® TaqMan® ou no analisador COBAS® TaqMan® 48, imprima o Relatório dos Resultados. Verifique se existem alarmes ou mensagens de erro no Relatório dos Resultados. As amostras com alarmes e comentários são interpretadas conforme descrito na secção "Resultados". Depois de os aceitar, armazene os dados no arquivo.
- I2. Retire os tubos-K usados do analisador COBAS® TaqMan® ou do analisador COBAS® TaqMan® 48.

CONTROLO DE QUALIDADE

Em cada lote de testes, deve ser incluído um Controlo Negativo COBAS® TaqMan®, um Controlo Positivo Baixo do HCV e um Controlo Positivo Alto do HCV. O lote é válido se não aparecer nenhum alarme para quaisquer dos controlos [HCV L(+)**C**, v2.0, HCV H(+)**C**, v2.0 e CTM (-)**C**].

Não existe qualquer requisito relativamente à posição dos controlos na rack de amostras.

Verifique a impressão do lote relativamente a alarmes e comentários, a fim de se assegurar de que o lote é válido.

Controlo Negativo

O **CTM (-) C** deve produzir um resultado "Target Not Detected". Se o **CTM (-) C** for assinalado com um alarme de inválido, todo o lote é considerado inválido. Todo o processo deverá ser repetido (preparação de amostras e controlos, amplificação e detecção). Se o **CTM (-) C** for consistentemente inválido em vários lotes, contacte o seu representante local da Roche para obter assistência técnica.

Controlos positivos

O intervalo atribuído aos **HCV L(+)**C**, v2.0** e **HCV H(+)**C**, v2.0** é específico para cada reagente, e é fornecido nos códigos de barras da cassete de reagentes do teste quantitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0.

As UI/ml de ARN do HCV do **HCV L(+)**C**, v2.0** e do **HCV H(+)**C**, v2.0** deverão ficar dentro dos respectivos intervalos atribuídos. Se um ou ambos os controlos positivos forem assinalados com um alarme de inválido, todo o lote é considerado inválido. Todo o processo deverá ser repetido (preparação de amostras e controlos, amplificação e detecção). Se o título de ARN do HCV de um ou de ambos os controlos positivos estiver consistentemente fora dos intervalos atribuídos em vários lotes, contacte o seu representante local da Roche para obter assistência técnica.

RESULTADOS

O analisador COBAS® TaqMan® ou o analisador COBAS® TaqMan® 48 determina automaticamente a concentração de ARN do HCV das amostras e controlos. A concentração de ARN do HCV é expressa em Unidades Internacionais (UI)/ml.

Software AMPLILINK:

- Determina o Ct do ARN do HCV e do ARN do PQ do HCV.
- Determina a concentração de ARN do HCV com base nos valores de Ct do ARN do HCV e do ARN do PQ do HCV e os coeficientes de calibração específicos do lote fornecidos nos códigos de barras da cassete.
- Determina que as UI/ml calculadas do **HCV L(+)**C**, v2.0** e do **HCV H(+)**C**, v2.0** ficam dentro dos intervalos atribuídos.

Validação do lote:

Verifique na janela de resultados do software AMPLILINK ou na impressão se existem alarmes e comentários, para se assegurar de que o lote é válido.

Para pedidos de controlo, é feita uma verificação para determinar se o valor de UI/ml do controlo está dentro do seu intervalo especificado. Se o valor de UI/ml do controlo ficar fora do seu intervalo, é gerado um alarme para indicar que o controlo falhou.

O lote é válido se não aparecer nenhum alarme para quaisquer dos controlos **[HCV L(+)**C**, v2.0, HCV H(+)**C**, v2.0 e CTM (-) C]**.

O lote não é válido se aparecer algum dos seguintes alarmes para os controlos do HCV:

Controlo Negativo:

Alarme	Resultado	Interpretação
NC_INVALID	Invalid	Um resultado inválido ou o resultado do título calculado do controlo negativo não é negativo, ou seja, não é gerado o resultado "Target Not Detected".

Controlo Positivo Baixo do HCV:

Alarme	Resultado	Interpretação
LPCINVALID	Invalid	Um resultado inválido ou o resultado do título calculado do controlo positivo baixo não está dentro do intervalo atribuído.

Controlo Positivo Alto do HCV:

Alarme	Resultado	Interpretação
HPCINVALID	Invalid	Um resultado inválido ou o resultado do título calculado do controlo positivo alto não está dentro do intervalo atribuído.

Caso o lote seja inválido, repita o lote todo, incluindo a preparação de amostras e controlos, a transcrição reversa, a amplificação e a detecção.

Interpretação dos resultados:

Para um lote válido, verifique cada amostra individual relativamente a alarmes ou comentários na impressão dos resultados.

⇒ Um lote válido pode incluir resultados de amostras válidos e inválidos, dependendo de serem obtidos alarmes e/ou comentários para as amostras individuais.

Os resultados de amostras são interpretados conforme se segue:

Resultado	Interpretação
Target Not Detected	O valor de Ct do HCV está acima do limite para o ensaio ou não foi obtido nenhum valor de Ct do HCV. Os resultados devem ser reportados como "ARN do HCV não detectado".
<1.50E+01 IU/mL	As UI/ml calculadas encontram-se abaixo do limite inferior de quantificação (LLOQ) do ensaio. Os resultados devem ser reportados como "ARN do HCV detectado, inferior a 15 UI/ml de ARN do HCV".
≥1.50E+01 IU/mL e ≤1.00E+08 IU/mL	Os resultados calculados superiores ou iguais a 15 UI/ml e inferiores ou iguais a 1,00E+08 UI/ml estão dentro do intervalo linear do ensaio. Os resultados devem ser reportados como "Detectados XX UI/ml de ARN do HCV".
>1.00E+08 IU/mL	Os resultados calculados estão acima do intervalo linear do ensaio. Os resultados devem ser reportados como "superiores a 1,00E+08 UI/ml de ARN do HCV". Caso sejam pretendidos resultados quantitativos, a amostra original deverá ser diluída com plasma EDTA ou soro humano negativo para o HCV, dependendo da matriz da amostra original, e o teste deve ser repetido. Multiplique o resultado reportado pelo factor de diluição.

Se o elemento apresentado do resultado da amostra for "Failed", "Invalid" ou "Aborted", consulte o Manual de Aplicação do software AMPLILINK versão série 3.3 ou 3.4, conforme indicado na secção "Materiais necessários mas não fornecidos".

NOTA: *As amostras acima do intervalo do ensaio também podem produzir um resultado inválido com um alarme "QS_INVALID". Caso sejam pretendidos resultados quantitativos, a amostra original deverá ser diluída com plasma EDTA ou soro humano negativo para o HCV, dependendo da matriz da amostra original, e o teste deve ser repetido. Multiplique o resultado reportado pelo factor de diluição.*

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

1. Este teste foi validado para utilização apenas com amostras soro humano ou de plasma colhidas em anticoagulante EDTA. A utilização de outro tipo de amostras pode dar origem a resultados imprecisos.
2. Embora raras, as mutações dentro das regiões altamente conservadas do genoma viral cobertas pelos iniciadores e/ou sondas do teste podem provocar a sub-quantificação ou a não detecção do vírus.
3. A quantificação do ARN do HCV depende do número de partículas virais presentes na amostra e pode ser afectada pelos métodos de colheita da amostra, por factores inerentes ao próprio paciente (por ex., idade, presença de sintomas) e/ou pelo estadio da infecção.
4. A obtenção de resultados fidedignos está dependente da execução de procedimentos adequados de colheita, transporte, armazenamento e processamento das amostras.
5. A presença de enzima AmpErase na Mistura Principal do COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV reduz o risco de contaminação do amplicon. No entanto, a contaminação proveniente de amostras clínicas e de controlos positivos do HCV só pode ser evitada através de boas práticas laboratoriais e um cuidadoso cumprimento dos procedimentos especificados neste folheto informativo.
6. A utilização deste produto deve ser limitada a pessoal com formação no funcionamento do equipamento **cobas p 630** (opcional), o equipamento COBAS® AmpliPrep e o analisador COBAS® TaqMan® ou o analisador COBAS® TaqMan® 48. O operador deverá ter um conhecimento profundo das aplicações executadas nos equipamentos e deverá seguir boas práticas laboratoriais.
7. Este produto só pode ser utilizado com o equipamento **cobas p 630** (opcional), o equipamento COBAS® AmpliPrep e o analisador COBAS® TaqMan® ou o analisador COBAS® TaqMan® 48.
8. Devido a diferenças básicas entre tecnologias, recomenda-se que, antes de mudar de uma tecnologia para outra, os utilizadores realizem estudos de correlação de métodos nos seus laboratórios, para quantificar as diferenças tecnológicas.

SUBSTÂNCIAS INTERFERENTES

Níveis elevados de triglicéridos (3300 mg/dl), bilirrubina conjugada (25 mg/dl), bilirrubina não conjugada (20 mg/dl), albumina (6000 mg/dl), hemoglobina (200 mg/dl) e ADN humano (40 mg/dl) nas amostras, assim como a presença de doenças autoimunes tais como Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES), Artrite Reumatóide (AR) e Anticorpo Antinuclear (ANA) não interferiram com a quantificação do ARN do HCV pelo teste quantitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0.

As combinações de fármacos seguintes, testadas ao Nível Máximo de Plasma (C_{max}) e a 3 vezes o C_{max} não interferiram com a quantificação do ARN do HCV pelo teste quantitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0:

Inibidores Nucleotídicos da Transcriptase Reversa e da Polimerase do ADN Tenofovir Adefovir dipivoxil	Inibidores Não Nucleosídeos da Transcriptase Reversa Efavirenz Nevirapina
Inibidores da Protease do HIV Atazanavir Saquinavir Ritonavir Lopinavir/Ritonavir Nelfinavir Darunavir Tipranavir Fosamprenavir	Inibidores Nucleosídeos da Transcriptase Reversa Lamivudina Zidovudina Stavudina Abacavir Didanosina Emtricitabina Entecavir Telbivudina
Inibidor de Fusão do HIV Enfuvirtida	Inibidor de Entrada do HIV Maraviroc
Compostos para o Tratamento dos Vírus da Herpes Ganciclovir Valganciclovir Aciclovir	Imuno-Moduladores Peginterferão alfa-2b Ribavirina Peginterferão alfa-2a
Inibidor da Integrase do HIV Raltegravir	

AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO NÃO CLÍNICO

A. Limite de Detecção

O limite de detecção do teste quantitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 foi determinado por análise de diluições em série do Padrão Internacional da OMS para o ARN do vírus da Hepatite C para Ensaios de Tecnologia de Ácidos Nucleicos, genótipo 1a, obtidos da NIBSC, em soro ou plasma EDTA humano negativo para o HCV. Foram analisadas 3 séries de diluições independentes para cada matriz. Para cada tipo de matriz foi testado um total de até 252 exemplares por nível de concentração. O estudo foi realizado utilizando 3 lotes de reagentes do teste quantitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0.

Os resultados para o plasma EDTA e o soro estão apresentados nas Tabelas 1 e 2, e demonstram que o teste quantitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 detectou ARN do HCV em concentrações de 15 UI/ml ou superiores com uma taxa de positividade $\geq 95\%$. A diferença entre o soro e o plasma EDTA não foi estatisticamente significativa.

Tabela 1
Limite de detecção em plasma EDTA determinado com o Padrão Internacional da OMS para o ARN do vírus da Hepatite C para Ensaios de Tecnologia de Ácidos Nucleicos

Título de Entrada (ARN do HCV em UI/ml)	Número de Exemplares Válidos	Número de Positivos	Taxa de Positividade (%)
50	251	251	100
25	251	250	100
15	251	246	98
10	252	236	94
5	252	180	71
2,5	251	121	48
0	250	0	0
LOD por PROBIT a uma taxa de positividade de 95%	11 UI/ml Intervalo de confiança de 95%: 10 a 13 UI/ml		
LOD por taxa de positividade	15 UI/ml		

Tabela 2
Limite de detecção em soro determinado com o Padrão Internacional da OMS para o ARN do vírus da Hepatite C para Ensaios de Tecnologia de Ácidos Nucleicos

Título de Entrada (ARN do HCV em UI/ml)	Número de Exemplares Válidos	Número de Positivos	Taxa de Positividade (%)
50	188	188	100
25	189	188	99
15	189	185	98
10	189	172	91
5	189	140	74
2,5	189	92	49
0	189	0	0
LOD por PROBIT a uma taxa de positividade de 95%	12 UI/ml Intervalo de confiança de 95%: 10 a 14 UI/ml		
LOD por taxa de positividade	15 UI/ml		

B. Precisão

A precisão do teste quantitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 foi determinada por análise de diluições em série de amostras clínicas de HCV (genótipo 1a) ou de ARN do HCV Armored (aRNA) em soro ou plasma EDTA humano negativo para o HCV.

Foram testados 6 níveis de diluição em 3 exemplares por nível, em 12 execuções, em 4 dias. Cada amostra foi submetida ao procedimento completo do teste quantitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0, incluindo preparação de amostras, amplificação e detecção. O estudo foi realizado utilizando 3 lotes de reagentes do teste quantitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0, e os resultados estão apresentados na Tabela 3.

O teste quantitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 mostra uma boa precisão para os 3 lotes de reagentes no intervalo de concentração de 3,0E+02 UI/ml a 1,0E+08 UI/ml.

Tabela 3
Precisão do teste quantitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0
(amostras de plasma EDTA e soro)*

Concentração nominal (UI/ml)	Precisão como DP total [log ₁₀]					
	Plasma EDTA			Soro		
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 1	Lote 2	Lote 3
3,0E+02	0,22	0,07	0,09	0,07	0,05	0,09
3,0E+03	0,15	0,07	0,07	0,06	0,06	0,06
3,0E+04	0,06	0,05	0,07	0,05	0,07	0,08
3,0E+05	0,08	0,07	0,08	0,05	0,05	0,04
3,0E+06	0,14	0,04	0,07	0,11	0,06	0,07
1,0E+08	0,07	0,05	0,11	0,07	0,06	0,08

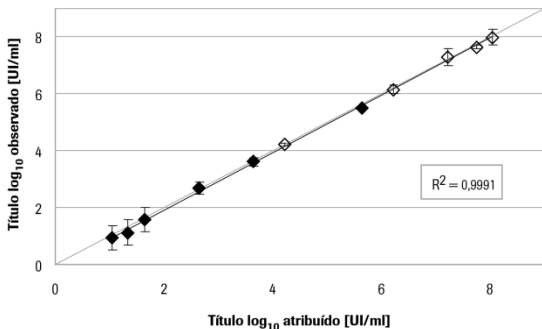
* Os dados de título são considerados ser de distribuição logarítmica normal e são analisados depois da transformação log₁₀. As colunas 2 a 7 apresentam o desvio padrão (DP) total do título de transformação logarítmica para cada um dos 3 lotes de reagentes.

C. Intervalo Linear

Foram utilizados dois painéis de linearidade para avaliar o intervalo linear do teste quantitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0. Estes painéis eram constituídos por diluições de uma amostra clínica positiva para o ARN do HCV na parte inferior e média do intervalo dinâmico (até 3,0E+05 UI/ml) e por aARN na parte superior do intervalo dinâmico (até 2,0E+08 UI/ml) no plasma EDTA ou no soro. O estudo foi efectuado com 2 lotes de reagentes do teste quantitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 de acordo com os métodos definidos no EP6-A do CLSI²². Foram testados todos os 11 membros do painel de plasma EDTA e todos os 14 membros do painel de soro em até 16 exemplares por nível de concentração, matriz e lote de reagente.

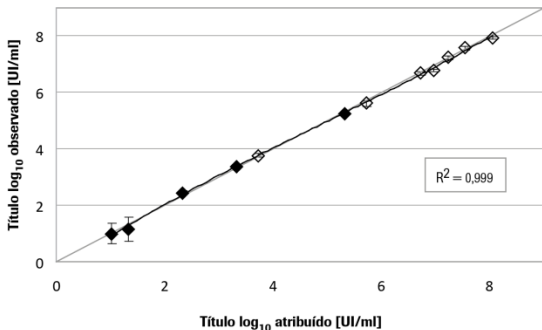
O teste quantitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 é linear desde 15 UI/ml de ARN do HCV até pelo menos 1,0E+08 UI/ml de ARN do HCV, utilizando um desvio absoluto aceitável da linearidade de +/- 0,2 log₁₀ (ver Figuras 1 e 2 para resultados representativos). Em todo o intervalo linear, a precisão do teste encontra-se dentro de +/- 0,2 log₁₀.

Figura 1
Determinação do intervalo linear do teste quantitativo
COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 em amostras de plasma EDTA



A representação gráfica da regressão mostra a média dos resultados de amostra observados para amostras clínicas (losangos cheios) e para amostras de aARN (losangos vazios), traçada em relação ao título log₁₀ atribuído. A linha de regressão (a negrito; de 11 a 1,1E+08 UI/ml) é mostrada juntamente com a linha de unidade (a cinzento) de maneira a visualizar o comportamento linear do teste. O desvio padrão do título log₁₀ é mostrado como barras de erro, e o R² é apresentado.

Figura 2
Determinação do intervalo linear do teste quantitativo
COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 em amostras de soro



A representação gráfica da regressão mostra a média dos resultados de amostra observados para amostras clínicas (losangos cheios) e para amostras de aARN (losangos vazios), traçada em relação ao título log₁₀ atribuído. A linha de regressão (a preto; de 11 a 1,2E+08 UI/ml) é mostrada juntamente com a linha de unidade (a cinzento) de maneira a visualizar o comportamento linear do teste. O desvio padrão dos títulos log₁₀ é mostrado como barras de erro, e o R² é apresentado.

D. Inclusividade

Foi avaliado o desempenho do teste quantitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 nos genótipos do HCV, (i) verificando o limite de detecção dos genótipos 1 a 6 e (ii) verificando o intervalo linear dos genótipos 1 a 6.

Verificação do Limite de Detecção dos genótipos 1 a 6

Foram diluídas amostras clínicas de ARN do HCV de 8 diferentes genótipos/subtipos (1a, 1b, 2a, 2b, 3, 4, 5 e 6) a 3 diferentes níveis de concentração em plasma EDTA ou em soro, e foi efectuada uma determinação da taxa de positividade para cada nível, com até 70 exemplares. O estudo foi realizado utilizando 1 lote de reagentes do teste quantitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0.

Os resultados para o plasma EDTA e para o soro estão apresentados nas Tabelas 4 e 5, e mostram que o teste quantitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 detectou ARN do HCV dos 8 diferentes genótipos/subtipos em concentrações de 15 UI/ml ou superiores com uma taxa de positividade $\geq 95\%$. A diferença entre o soro e o plasma EDTA não foi estatisticamente significante.

Tabela 4
Verificação do Limite de Detecção de genótipos de ARN do HCV em plasma EDTA

Genótipo	5 UI/ml			15 UI/ml			45 UI/ml		
	N.º de exemplares válidos	N.º de positivos	Taxa de positividade (%)	N.º de exemplares válidos	N.º de positivos	Taxa de positividade (%)	N.º de exemplares válidos	N.º de positivos	Taxa de positividade (%)
1a	63	44	70	63	63	100	63	63	100
1b	63	47	75	63	62	98	63	63	100
2a	63	43	68	63	61	97	62	61	98
2b	62	57	92	62	62	100	62	62	100
3	62	58	94	63	63	100	62	62	100
4	63	43	68	63	62	98	63	63	100
5	63	47	75	62	62	100	62	62	100
6	63	55	87	63	62	98	63	63	100

Tabela 5
Verificação do Limite de Detecção de genótipos de ARN do HCV em soro

Genótipo	5 UI/ml			15 UI/ml			45 UI/ml		
	N.º de exemplares válidos	N.º de positivos	Taxa de positividade (%)	N.º de exemplares válidos	N.º de positivos	Taxa de positividade (%)	N.º de exemplares válidos	N.º de positivos	Taxa de positividade (%)
1a	63	45	71	62	62	100	63	63	100
1b	62	48	77	63	63	100	63	63	100
2a	63	47	75	61	60	98	63	63	100
2b	63	42	67	63	61	97	63	63	100
3	63	58	92	63	63	100	63	63	100
4	63	41	65	63	62	98	63	63	100
5	62	46	74	61	60	98	62	62	100
6	70	58	83	70	69	99	69	69	100

Verificação do Intervalo Linear dos genótipos 1 a 6

Foram testadas amostras clínicas de HCV de 8 diferentes genótipos/subtipos (1a, 1b, 2a, 2b, 3, 4, 5 e 6) em até 22 níveis de concentração. Estes painéis eram constituídos por diluições de amostras clínicas de genótipos positivos para o ARN do HCV na parte inferior e média do intervalo dinâmico e por aARN específico do genótipo na parte superior do intervalo dinâmico (genótipos 1a, 1b, 3 e 4 até ao limite superior da quantificação) ou através de todo o intervalo dinâmico (genótipos 2a, 2b, 5 e 6) em plasma EDTA. O estudo foi realizado utilizando 1 lote de reagentes do teste quantitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0. Todos os 22 membros do painel foram testados em até 15 exemplares.

O Intervalo Linear do teste quantitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 foi verificado com os genótipos 1 a 6 do HCV, de 13 UI/ml de ARN do HCV até pelo menos 1,4E+08 UI/ml de ARN do HCV, utilizando um desvio absoluto aceitável da linearidade de $\pm 0,2 \log_{10}$.

E. Sensibilidade do diagnóstico

A sensibilidade do diagnóstico do teste quantitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 foi determinada analisando amostras individuais de plasma EDTA ou soro positivas para o ARN do HCV (488 resultados totais) com 2 lotes de reagentes do teste quantitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0. Todas as amostras tiveram resultados positivos para o ARN do HCV. Neste painel, a sensibilidade do diagnóstico do teste quantitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 é de 100% (limite inferior de confiança de 95% unilateral: $\geq 99,4\%$).

F. Especificidade

A especificidade do teste quantitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 foi determinada analisando amostras de soro ou de plasma EDTA negativas para o ARN do HCV e soro-negativas, obtidas de doadores de sangue. Foram testadas amostras individuais de plasma EDTA e soro (600 resultados totais) com 2 lotes de reagentes do teste quantitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0. Todas as amostras tiveram resultados negativos para o ARN do HCV. Neste painel, a especificidade do teste quantitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 é de 100% (limite inferior de confiança de 95% unilateral: $\geq 99,5\%$).

G. Especificidade analítica

A especificidade analítica do teste quantitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 foi avaliada diluindo stocks de título elevado de diferentes agentes patogénicos (consulte a Tabela 6) com amostras clínicas de plasma EDTA positivas para o ARN do HCV e negativas para o ARN do HCV. Nenhum dos agentes patogénicos não HCV interferiu com o desempenho do teste ou apresentou um resultado falso positivo com o teste quantitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0.

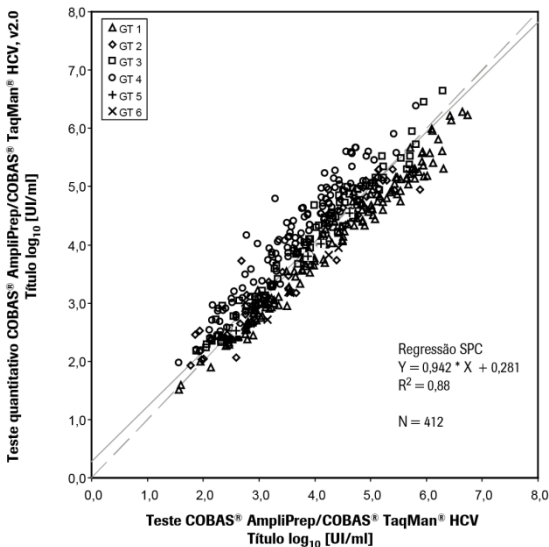
Tabela 6
Amostras de Especificidade Analítica

Flavivírus não HCV Vírus do Nilo Ocidental Vírus da Encefalite de St. Louis Vírus da Encefalite de Murray Valley Vírus da Dengue, tipos 1, 2, 3 e 4 Vírus da Febre Amarela Vírus Zika Vírus FSME (estirpe HYPR)	Vírus Adenovírus Tipo 5 Citomegalovírus Vírus de Epstein Barr Vírus da hepatite B Vírus da hepatite A HIV-1 Vírus linfotrópico da célula T humana dos tipos 1 e 2 Vírus do herpes humano do tipo 6 Vírus do herpes simples dos tipos 1 e 2 Influenza A Vírus do papiloma humano Vírus da varicela-zoster
Bactérias <i>Propionibacterium acnes</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	
Leveduras <i>Candida albicans</i>	

H. Desempenho comparado com o Teste COBAS® AmpliPrep / COBAS® TaqMan® HCV

O desempenho do teste quantitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 e do Teste COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV foram comparados por análise de amostras de soro e plasma EDTA de doentes infectados com o HCV (diluídas e não diluídas). Um total de 412 amostras de plasma EDTA e de soro de todos os genótipos, analisadas em duplicado, foram válidas e encontravam-se dentro do intervalo de quantificação de ambos os testes. Foram efectuadas análises de regressão de Deming e de Bland Altman. Os resultados da análise de regressão de Deming estão ilustrados na Figura 3.

Figura 3
Correlação entre o teste quantitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0
e o Teste COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV
(GT=Genótipo)

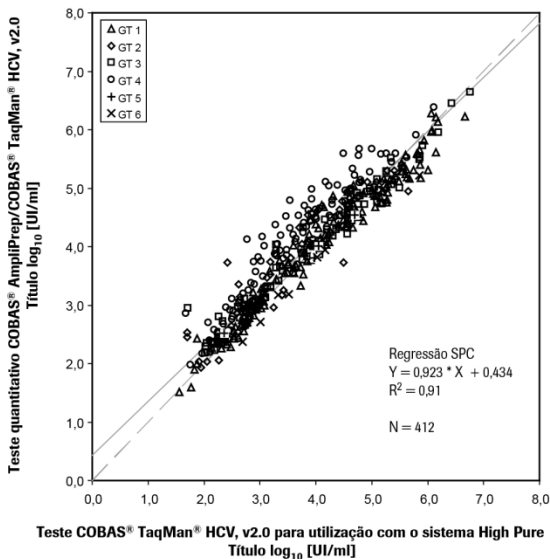


Foi efectuada a análise de regressão de Deming. O valor de R-quadrado foi de 0,88 para todas as amostras e de 0,94 se as amostras com genótipo 4 tiverem sido excluídas da análise. Depois da análise de Bland-Altman, a correlação mostrou uma diferença média de título $\log_{10}$ de 0,1 (todas as amostras analisadas) ou de -0,1 (amostras de genótipo 4 excluídas), respectivamente.

I. Desempenho comparado com o Teste COBAS® TaqMan® HCV v2.0 para utilização com o Sistema High Pure

O desempenho do teste quantitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 e do Teste COBAS® TaqMan® HCV v2.0 para utilização com o Sistema High Pure foram comparados por análise de amostras de soro e plasma EDTA de doentes infectados com o HCV. Um total de 412 amostras de plasma EDTA e de soro de todos os genótipos, analisadas em duplicado, foram válidas e encontravam-se dentro do intervalo de quantificação de ambos os testes. Foram efectuadas análises de regressão de Deming e de Bland Altman. Os resultados da análise de regressão de Deming estão ilustrados na Figura 4.

Figura 4
Correlação entre o teste quantitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 e o Teste COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 para utilização com o Sistema High Pure
(GT=Genótipo)



Foi efectuada a análise de regressão de Deming e valor de R-quadrado foi de 0,91. Depois da análise de Bland-Altman, a correlação mostrou uma diferença média de título log₁₀ de 0,1.

BIBLIOGRAFIA

1. Choo Q-L, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW and Houghton M. 1989. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis viral genome. *Science* **244**:359-362.
2. Armstrong GL, Wasley A, Simard EP et al. 2006. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1999 through 2002. *Ann Intern Med* **144**:705-714.
3. Rustgi VK. 2007. The epidemiology of hepatitis C infection in the United States. *J Gastroenterol* **42**:513-521.
4. Lauer GM, Walker BD. 2001. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* **345**:41-52.
5. Caruntu FA, Banea L. 2006. Acute hepatitis C virus infection: Diagnosis pathogenesis, treatment. *JGLD* **15**:249-256.
6. Mc Hutchison JG, Gordon SC, Schiff ER et al. 1998. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. *N Engl J Med* **339**:1485-1492.
7. Davis GL, Esteban-Mur R, Rustgi V et al. 1998. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin for the treatment of relapse of chronic hepatitis C. *N Engl J Med* **339**:1493-1499.
8. Manns MP, McHutchinson JG, Gordon SC et al. 2001. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomized trial. *Lancet* **358**:958-965.
9. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR et al. 2002. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* **347**:975-982.
10. Hadziyannis SJ, Sette H Jr., Morgan TR et al. 2004. Peginterferon-[alpha] 2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med* **140**:346-355.
11. Ghany MG, Strader DB, Thomas DL et al. 2009. Diagnosis management and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology* **49**:1335-1374.
12. NIH Consensus and State-of-the-Science Statements. Management of Hepatitis C. 2002. **19**:1-46.
13. EASL International Consensus Conference on Hepatitis C. Consensus Statement. 1999. *Hepatology* **30**:956-961.
14. Jensen DM, Morgan TR, Marcellin P et al. 2006. Early identification of HCV genotype 1 patients responding to 24 weeks peginterferon alpha-2a (40 kd)/ribavirin therapy. *Hepatology* **43**:954-960.
15. Poordad F, McCone J Jr., Bacon BR et al. 2011. Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* **364**:1195-1206.
16. Jacobson IM, McHutchinson JG, Dusheiko G et al. 2011. Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* **364**:2405-2416.
17. Bukh J, Purcell RH and Miller RH. 1992. Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**:4942-4946.
18. Longo MC, Berninger MS and Hartley JL. 1990. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* **93**:125-128.
19. U.S. Department of Health and Human Services. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 5th Edition, HHS Publication No. (CDC) 21-1112; December 2009.
20. Clinical and Laboratory Standards Institute. Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections: Approved Guideline - 3rd Edition. CLSI Document M29-A3. CLSI: Wayne, PA 2005.

21. International Air Transport Association. Dangerous Goods Regulations, 49th Edition. 2008.
22. Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline. CLSI Document EP6-A. CLSI: Wayne, PA 2002.
23. Saldanha, J., Heath, A., Aberham, C., Albrecht, J., Gentili, G., Gessner, M. and Pisani, G.2005. World Health Organization collaborative study to establish a replacement WHO international standard for hepatitis C virus RNA nucleic acid amplification technology assays. *Vox Sanguinis* **88**:202-204.
24. Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., and Griffith, R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Bio-Technology* **10**:413-417.
25. Heid, C.A., Stevens, J., Livak, J.K., and Williams, P.M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Research* **6**:986-994.

Informações de revisão do documento	
Doc. Rev. 3.0 (Mfg-US) 02/2019	Atualizado o Número do Organismo Notificado relativo à marcação CE. Se tiver quaisquer questões, contacte o representante local da Roche.
Doc. Rev. 4.0 (Mfg-US) 09/2019	Atualizada a secção REQUISITOS DE ARMAZENAMENTO E MANUSEAMENTO para dar instruções ao utilizador para inspecionar visualmente o produto quanto a sinais de derrames antes da sua utilização e para não o utilizar se houver quaisquer índices de derrames. Endereço web da Roche, www.roche.com , adicionado. Atualizada a página de símbolos harmonizados. Se tiver quaisquer questões, contacte o representante local da Roche.



Roche Molecular Systems, Inc.
1080 US Highway 202 South
Branchburg, NJ 08876 USA
www.roche.com



Distributed by

Roche Diagnostics (Schweiz) AG
Industriestrasse 7
6343 Rotkreuz, Switzerland

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, Germany

Roche Diagnostics, SL
Avda. Generalitat, 171-173
E-08174 Sant Cugat del Vallès
Barcelona, Spain

Roche Diagnostics
201, boulevard Armand-Frappier
H7V 4A2 Laval, Québec, Canada
(For Technical Assistance call:
Pour toute assistance technique,
appeler le: 1-877-273-3433)

Roche Diagnostics
2, Avenue du Vercors
38240 Meylan, France

Distributore in Italia:
Roche Diagnostics S.p.A.
Viale G. B. Stucchi 110
20052 Monza, Milano, Italy

Distribuidor em Portugal:
Roche Sistemas de Diagnósticos Lda.
Estrada Nacional, 249-1
2720-413 Amadora, Portugal

Roche Diagnostica Brasil Ltda.
Av. Engenheiro Billings, 1729
Jaguari, Building 10
05321-010 São Paulo, SP Brazil

Marcas comerciais e patentes

Consultar <http://www.roche-diagnostics.us/patents>

©2019 Roche Molecular Systems, Inc.

09/2019

Doc Rev. 4.0 (Mfg-US)

07941692001-04



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116
68305 Mannheim
Germany



Os seguintes símbolos são utilizados actualmente em todos os rótulos de produtos de diagnóstico por PCR da Roche.



Software auxiliar



Representante autorizado na Comunidade Europeia



Folha de dados de códigos de barras



Código da corrida



Risco biológico



Referência de catálogo



Consulte as instruções de utilização



Conteúdo do kit



Distribuído por



Apenas para avaliação de desempenho do IVD

Rx Only

Apenas nos EUA: a lei federal dos Estados Unidos restringe a venda deste dispositivo a ou a pedido de um profissional licenciado.



Este produto cumpre os requisitos da Diretiva Europeia 98/79/CE para dispositivos médicos de diagnóstico *in vitro*.



Dispositivo médico para diagnóstico *in vitro*



Limite inferior do intervalo atribuído



Fabricante



Armazenar no escuro



Conteúdo suficiente para <n> testes



Limite de temperatura



Ficheiro de definição de teste



Limite superior do intervalo atribuído



Prazo de validade



Global Trade Item Number



Data do fabricio