

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



DO STOSOWANIA W DIAGNOSTYCE *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

Spis treści

ZASTOSOWANIE	1
PODSUMOWANIE ORAZ OPIS TESTU	2
ZASADY PROCEDURY	2
ODCZYNNIKI	5
OSTRZEŻENIA I ŚRODKI OSTROŻNOŚCI DOTYCZĄCE METODY	7
WYMAGANIA DOTYCZĄCE PRZECHOWYWANIA I UŻYTKOWANIA	8
DOSTARCZONE MATERIAŁY	8
MATERIAŁY WYMAGANE, LECZ NIEDOSTARCZANE	9
POBIERANIE, TRANSPORT I PRZECHOWYWANIE PRÓBEK	10
INSTRUKCJA UŻYTKOWANIA	10
KONTROLA JAKOŚCI	13
WYNIKI	14
OGRANICZENIA METODY	15
SUBSTANCJE WPLYWAJĄCE NA WYNIK TESTU	16
OCENA DZIAŁANIA W BADANIACH NIEKLINICZNYCH	17
PIŚMIENICTWO	24

ZASTOSOWANIE

COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0, jest testem *in vitro* opartym na amplifikacji kwasu nukleinowego, służącym do ilościowego oznaczania RNA genotypów od 1 do 6 wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV) w ludzkim osoczu pobranym na EDTA oraz surowicy, wykorzystującym urządzenie COBAS® AmpliPrep do automatycznego przetwarzania próbki oraz analizator COBAS® TaqMan® lub analizator COBAS® TaqMan® 48 do automatycznej amplifikacji i detekcji. Test jest przeznaczony do stosowania w przypadku pacjentów z przewlekłym zakażeniem wirusem HCV w połączeniu z klinicznymi i laboratoryjnymi markerami zakażenia. Test można wykorzystać do przewidywania prawdopodobieństwa wystąpienia trwałej odpowiedzi wirusologicznej (SVR) na wczesnym etapie leczenia antywirusowego oraz do oceny odpowiedzi na tę terapię (leczenie uzależnione od odpowiedzi; RGT) mierzonej jako zmiana poziomu RNA HCV w osoczu pobranym na EDTA lub w surowicy.

COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0, nie jest przeznaczony do przesiewowego badania obecności wirusa HCV we krwi lub produktach krwiopochodnych ani do stosowania jako test diagnostyczny, potwierdzający zakażenie wirusem HCV.

PODSUMOWANIE ORAZ OPIS TESTU

Wirus zapalenia wątroby typu C uważany jest za główny czynnik etiologiczny odpowiedzialny za 90–95% przypadków wirusowego zapalenia wątroby po przetoczeniach krwi¹⁻⁴. HCV to wirus zawierający pojedynczy łańcuch sensowny RNA, którego genom zawiera około 9500 nukleotydów kodujących 3000 aminokwasów. Jako wirus występujący we krwi, HCV może być przenoszony przez krew i produkty krwiopochodne. Powszechnie przyjęte badania przesiewowe krwi w kierunku obecności wirusa HCV doprowadziły do znacznego obniżenia ryzyka zapalenia wątroby związanego z transfuzjami. Największa częstość zakażeń wirusem HCV występuje w związku z nadużywaniem narkotyków dożylnych oraz — w mniejszym stopniu — z innymi rodzajami przeszklonej ekspozycji⁵. Częstość występowania zakażenia wirusem HCV, określana za pomocą drożdże testów immunoserologicznych, wynosi od 0,6% w Kanadzie do 1,5% w Japonii³. Wskaźniki samoistnej eliminacji wirusa u osób poddanych ekspozycji są bardzo zróżnicowane. Od 10% do 60% przypadków zostało zgłoszonych jako potwierdzone klinicznie poprzez zaobserwowanie normalizacji aktywności enzymów wątrobowych oraz eliminacji z surowicy RNA HCV⁶.

Cząstek wirusa HCV nie można uzyskać z próbek zainfekowanej krwi, dlatego też obecność przeciwciał anti-HCV u pacjentów zakażonych wirusem HCV doprowadziła do opracowania testów immunoserologicznych swoistych dla tych przeciwciał. Obecność przeciwciał przeciwko wirusowi HCV jest jednak miarą wcześniejszego narażenia i nie może być uważana za marker aktualnego zakażenia. Pomiar aktywności aminotransferazy alaninowej (ALT) jest uważany za zastępczy wskaźnik zakażenia wirusem HCV. Nie jest jednak sposobem bezpośredniej oceny wirerii.

Natomiast ocena ilościowa RNA HCV w celu pomiaru wyjściowej wirerii oraz monitorowania leczenia jest uznaną metodą, wykazującą skuteczność odpowiedzi przeciwwirusowej na leczenie peginterferonem i rybowiryną⁷⁻¹⁰. Zgodnie z bieżącymi wytycznymi dotyczącymi postępowania i leczenia w przypadku zakażenia wirusem HCV zaleca się przeprowadzanie testów ilościowych na obecność RNA HCV przed rozpoczęciem terapii antywirusowej, podczas leczenia uzależnionego od odpowiedzi (RGT) oraz od 12 do 24 tygodni po zakończeniu leczenia. Celem leczenia jest stwierdzenie braku wykrywalnych poziomów RNA HCV z użyciem czułego testu 24 tygodnie po zakończeniu leczenia, co wskazuje osiągnięcie trwałej odpowiedzi wirusologicznej (SVR)¹¹. Podczas terapii antywirusowej zazwyczaj występuje wczesna odpowiedź wirusologiczna (EVR), którą definiuje się jako obniżenie poziomu RNA HCV o dwa log lub więcej po 12 tygodniach leczenia. Niepowodzenie w osiągnięciu wczesnej odpowiedzi wirusologicznej (EVR) wiąże się z wysoce negatywną wartością progностyczną osiągnięcia trwałej odpowiedzi wirusologicznej (SVR) i zostało uwzględnione w zasadach dotyczących bezcelowości (konieczności przerwania) leczenia pegylowanym interferonem i rybowiryną¹¹⁻¹³. Szybka odpowiedź wirusologiczna (RVR), charakteryzująca się niewykrywalnymi poziomami RNA HCV po 4 tygodniach leczenia, to wysoce pozytywny wskaźnik prognostyczny osiągnięcia trwałej odpowiedzi wirusologicznej (SVR)¹⁴. Określanie kinetyki wirerii podczas leczenia wykorzystuje się od niedawna do dalszej personalizacji czasu trwania leczenia z użyciem innowacyjnych środków antywirusowych o bezpośrednim działaniu, które wykorzystywane są do leczenia przewlekłych zakażeń wirusem HCV^{15,16}.

ZASADY PROCEDURY

COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0, jest testem opartym na amplifikacji kwasu nukleinowego, służącym do ilościowego oznaczania RNA wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV) w ludzkiej surowicy oraz osoczu pobranym na EDTA. Przygotowanie próbki odbywa się w sposób automatyczny w urządzeniu COBAS® AmpliPrep, a zautomatyzowana amplifikacja i detekcja w analizatorze COBAS® TaqMan® lub analizatorze COBAS® TaqMan® 48.

COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0, obejmuje trzy główne procesy: (1) przygotowanie próbki w celu wyizolowania RNA wirusa HCV; (2) odwrotną transkrypcję docelowego RNA w celu wygenerowania komplementarnego DNA (cDNA) oraz (3) jednoczesną amplifikację PCR docelowego cDNA i detekcję rozszczepionych podwójnie znakowanych sond oligonukleotydowych swoistych dla materiału docelowego.

Przygotowanie próbek

COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0, wykorzystuje automatyczne przygotowywanie próbek w urządzeniu COBAS® AmpliPrep przy użyciu techniki wiązania kwasów nukleinowych na krzemionce. Objętość wejściowa próbki wynosi 650 µl, a podczas procedury obróbki poddawanych jest 500 µl osocza pobranego na EDTA lub surowicy. Cząstki wirusa HCV poddawane są lizie poprzez inkubację w podwyższonej temperaturze z proteazą i chaotropowym buforem do lizy/wiążącym, który uwalnia kwasy nukleinowe i chroni uwolniony RNA HCV przed znajdującymi się w surowicy lub osoczu pobranym na EDTA cząsteczkami RNazy. Do każdej próbki wraz z odczynnikami lizującym i cząsteczkami magnetycznymi dodawana jest proteaza oraz znana liczba cząsteczek standardu RNA HCV Quantitation Standard (QS). Następnie mieszanina poddawana jest inkubacji, a RNA HCV oraz RNA HCV QS ulegają związaniu na powierzchni szklanych cząsteczek magnetycznych. Substancje niezwiązane, takie jak sole, białka i inne zanieczyszczenia pochodzenia komórkowego, ulegają usunięciu poprzez przepłukiwanie cząsteczek magnetycznych. Po oddzieleniu cząsteczek magnetycznych i zakończeniu procesu przepłukiwania zaadsorbowane kwasy nukleinowe są wymywane przy użyciu roztworu wodnego w podwyższonej temperaturze. Tak przygotowana próbka, zawierająca uwolnione RNA HCV i RNA standardu HCV QS, jest dodawana do mieszaniny do amplifikacji i umieszczana w analizatorze COBAS® TaqMan® lub analizatorze COBAS® TaqMan® 48.

Odwrotna transkrypcja oraz amplifikacja PCR

COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0, wykorzystuje odwrotną transkrypcję RNA HCV w celu wygenerowania komplementarnego DNA (cDNA) oraz amplifikację cDNA w reakcji PCR z użyciem primerów, które definiują sekwencję w wysoce konserwatywnym obszarze, znajdującym się w regionie 5' nieulegającego translacji fragmentu genomu wirusa HCV¹⁷. Sekwencja nukleotydowa primerów została zoptymalizowana w celu zapewnienia porównywalnej amplifikacji genotypów wirusa HCV od 1 do 6. Odwrotna transkrypcja oraz reakcja amplifikacji PCR prowadzone są przy użyciu zoptymalizowanej mieszaniny termostabilnych, rekombinowanych enzymów — polimerazy DNA Z05 i Z05D. W obecności jonów manganu (Mn^{2+}) i w odpowiednich warunkach układu buforowego enzymy Z05 i Z05D wykazują aktywność zarówno odwrotnej transkryptazy, jak i polimerazy DNA. Umożliwia to jednocześnie prowadzenie odwrotnej transkrypcji i amplifikacji PCR z detekcją amplikonu w czasie rzeczywistym.

Poddane obróbce próbki dodaje się do mieszaniny amplifikacyjnej w probówkach do amplifikacji (probówkach K), gdzie zachodzi zarówno odwrotna transkrypcja, jak i amplifikacja PCR. Mieszanina reakcyjna jest ogrzewana, aby primer antysensowny mógł związać się swoicie z docelowym RNA HCV oraz RNA HCV QS. W obecności jonów Mn^{2+} i nadmiaru trójfosforanów dezoksyrbonukleotydów (dNTP, deoxynucleoside triphosphate), do których należą trójfosforany dezoksyadenozyny, dezoksyguanozyny, dezoksytydyny i dezoksyuridyliny, polimerazy Z05 i Z05D wydłużają primery związane z nicią RNA, tworząc nici DNA komplementarną do docelowego RNA.

Amplifikacja sekwencji docelowej

Po zakończeniu odwrotnej transkrypcji docelowego RNA HCV oraz RNA HCV QS termocyklerek w analizatorze COBAS® TaqMan® lub analizatorze COBAS® TaqMan® 48 podgrzewa mieszaninę reakcyjną, aby doprowadzić do denaturacji hybryd RNA:cDNA i odsłonięcia docelowych sekwencji swoistych dla primera. Podczas schładzania mieszaniny primery hybrydują do docelowego cDNA. W obecności jonów Mn^{2+} i nadmiaru trójfosforanów dezoksyrbonukleotydów (dNTP) termostabilne polimerazy DNA (Z05 i Z05D) wydłużają przyłączone primery wzdłuż docelowych matryc, tworząc dwuniciową cząsteczkę DNA, zwaną amplikonem. Analizator COBAS® TaqMan® lub analizator COBAS® TaqMan® 48 automatycznie powtarza powyższy proces przez określoną liczbę cykli, w każdym z nich prowadząc do podwojenia ilości amplikonu DNA. Wymagana liczba cykli jest zaprogramowana w analizatorze COBAS® TaqMan® lub analizatorze COBAS® TaqMan® 48. Amplifikacja zachodzi wyłącznie w regionie genomu wirusa HCV znajdującym się pomiędzy primerami; cały genom HCV nie ulega zwielokrotnieniu.

Amplifikacja wybiórcza

W teście COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0, amplifikację wybiórczą docelowego kwasu nukleinowego z próbki osiąga się dzięki zastosowaniu enzymu AmpErase (uracylo-N-glikozyłaza) i trójfosforanu dezoksyuridyliny (dUTP). Enzym AmpErase rozpoznaje i katalizuje niszczenie nici DNA zawierających dezoksyuridylinę¹⁸, lecz nie DNA zawierającego dezoksytymidynę. W DNA występującym w naturze nie ma dezoksyuridyliny, natomiast jest ona zawsze obecna w amplikonie wskutek zastosowania trójfosforanu dezoksyuridyliny jako jednego spośród trójfosforanów dezoksyrbonukleotydów (dNTP) w odczynniku Master Mix. Dlatego dezoksyuridylinę zawiera wyłącznie

amplikonu. Dezoksyurydyna warunkuje wrażliwość zanieczyszczającego amplikonu na rozkład przez enzym AmpErase przed amplifikacją docelowego DNA. Co więcej, pod wpływem działania enzymu AmpErase zniszczeniu ulegają nieswoiste produkty reakcji powstałe po wstępnej aktywacji odczynnika Master Mix przez jony manganu. Enzym AmpErase zawarty w odczynniku Master Mix katalizuje rozkład DNA zawierającego dezoksyurydynę w miejscu reszt dezoksyurydynowych przez otwarcie łańcucha dezoksyrybozy w pozycji C1. Podczas ogrzewania w pierwszym cyklu termicznym łańcuch amplikonu DNA pęka w miejscu, w którym znajduje się dezoksyurydyna, w ten sposób wykluczając dalszą amplifikację DNA. Gdy enzym AmpErase zostanie poddany działaniu temperatury powyżej 55°C, tj. w czasie trwania całego cyklu termicznego, ulega inaktywacji i dlatego nie niszczy docelowego amplikonu, utworzonego w trakcie reakcji PCR.

Detekcja rozszczepionych podwójnie znakowanych sond oraz ilościowe oznaczanie RNA HCV

W teście COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0, wykorzystano technologię PCR w czasie rzeczywistym^{24,25} (ang. real-time PCR). Zastosowanie sond podwójnie znakowanych barwnikiem fluorescencyjnym pozwala na detekcję w czasie rzeczywistym gromadzenia się produktu reakcji PCR przez monitorowanie intensywności emisji fluorescencyjnych barwników reporterowych, uwalnianych w trakcie procesu amplifikacji. Sondy składają się z oligonukleotydów swoistych dla HCV i standardu HCV QS, znakowanych barwnikiem reporterowym i wygaszczaczem. W teście COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0, sondy dla HCV i standardu HCV QS są znakowane różnymi fluorescencyjnymi barwnikami reporterowymi. Gdy sondy są nienaruszone, fluorescencja barwnika reporterowego jest tłumiona bliskością wygaszacza na zasadzie efektu przenoszenia energii typu Förstera. Podczas reakcji PCR sonda ulega hybrydacji z sekwencją docelową, a następnie rozszczepieniu pod wpływem posiadanej przez termostabilne polimerazy DNA Z05 i Z05D aktywności 5' → 3' nukleazy. Od chwili uwolnienia i rozdzielania barwnika reporterowego i wygaszacza nie zachodzi już zjawisko wygaszania, a aktywność fluorescencyjna barwnika reporterowego nasila się. Amplifikację RNA HCV oraz RNA HCV QS mierzy się niezależnie od siebie, wykorzystując różne długości fal. Proces ten powtarza się przez określoną liczbę cykli, a w każdym cyklu następuje efektywne zwiększenie intensywności emisji poszczególnych barwników reporterowych, umożliwiając niezależną identyfikację RNA HCV oraz RNA HCV QS. Cykl PCR, w którym krzywa wzrostu rozpoczyna wzrost wykładniczy, zależy od ilości materiału startowego na początku reakcji PCR.

RNA wirusa HCV oznacza się ilościowo za pomocą standardu oznaczania HCV QS. Rekompensuje on wpływ hamowania oraz kontroluje proces przygotowywania i amplifikacji, pozwalając uzyskać dokładniejsze oznaczenie ilościowe RNA HCV w każdej próbce. Standard oznaczania HCV QS to niezakaźny konstrukt Armored RNA (aRNA), zawierający fragmenty sekwencji HCV o identycznych miejscach wiązania primerów jak docelowy RNA HCV oraz unikalne miejsce wiązania sondy, co umożliwia zróżnicowanie amplikonu HCV QS od docelowego amplikonu HCV.

Standard HCV QS jest dodawany do każdej próbki w znanej liczbie kopii i wraz z nią przechodzi przez proces przygotowania, odwrotnej transkrypcji, amplifikacji PCR oraz detekcji rozszczepionych podwójnie znakowanych sond oligonukleotydowych. Analizator COBAS® TaqMan® lub analizator COBAS® TaqMan® 48 oblicza stężenie RNA HCV w badanych próbkach przez porównywanie sygnału HCV z sygnałem standardu HCV QS dla każdej próbki i kontroli.

Podczas fazy wydłużania reakcji PCR w analizatorze COBAS® TaqMan® lub analizatorze COBAS® TaqMan® 48 próbki zostają oświetlone i wzbudzone światłem prefiltrowanym, a następnie rejestruje się wyniki emisji filtrowanej fluorescencji dla każdej próbki. Odczyty dotyczące poszczególnych próbek poddaje się korekcji w celu wyeliminowania zmienności wywołanej działaniem instrumentów. Aparat wprowadza odczyty fluorescencji do oprogramowania AMPLILINK i zapisuje w bazie danych. Stosuje się metodę odczytów wstępnych dla określenia, czy RNA HCV oraz RNA HCV QS reprezentują zestawy, które można uznać za ważne; gdy dane nie mieszczą się w ustalonych granicach, aparat opatrjuje je odpowiednimi oflagowaniami. Po ukończeniu i pomyślnej ocenie odczytów wstępnych odczyty fluorescencji są następnie przetwarzane w celu obliczenia wartości Ct dla RNA HCV i RNA HCV QS. Tablica swoistych dla danej serii stałych kalibracji, dołączona do testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0, jest generowana z użyciem materiału kalibracyjnego, a następnie wykorzystywana do obliczania wartości miana próbek i kontroli na podstawie różnicy pomiędzy wartościami Ct RNA HCV oraz RNA HCV QS. COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0, jest wystandaryzowany według międzynarodowego standardu WHO dla RNA wirusa zapalenia wątroby typu C do oznaczeń opartych na technologii kwasów nukleinowych (WHO International Standard for Hepatitis C Virus RNA for Nucleic Acid Amplification Technology Assays Testing) (kod NIBSC 96/798)²³, a wyniki miana są przedstawiane w jednostkach międzynarodowych (IU/ml).

ODCZYNNIKI

**COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV
Quantitative Test, v2.0**
(P/N: 05532264 190)

HCVQTV2

72 testy

HCV QT v2.0 CS1

(kaseta z odczynnikami z cząsteczkami magnetycznymi do oznaczeń HCV)

Szklane cząsteczki magnetyczne

Bufor Tris

0,09% azydku sodu

0,1% metyloparaben

1 x 72 testy

1 x 7,0 ml

HCV QT v2.0 CS2

(kaseta z odczynnikami lizującym do oznaczeń HCV)

Cytrynian sodu dwuwodny

42,5% tiocyjanian guanidyny

< 6% polidokanolu

0,9% diitritol

1 x 72 testy

1 x 78 ml

HCV QT v2.0 CS3

Kaseta wieloodczynnikowa do oznaczeń HCV, zawierająca:

Pase

(roztwór proteinazy)

Bufor Tris

< 0,05% EDTA

Chlorek wapnia

Octan wapnia

≤ 7,8% proteinaza

Glicerol

1 x 72 testy

1 x 3,8 ml

EB

(bufor do elucji)

Bufor Tris-base

0,09% azydku sodu

1 x 8,1 ml

HCV QT v2.0 CS4

Kaseta z odczynnikami swoistymi dla testu do oznaczeń HCV, zawierająca:

QS

(standard oznaczania HCV Quantitation Standard)

Bufor Tris

EDTA

< 0,002% poli rA RNA (syntetycznego)

< 0,001% konstruktu Armored RNA HCV,

zawierającego sekwencje wiążące primer HCV oraz

unikalny region wiązania sondy (niezakaźny RNA

obecny w bakteriofagu MS2)

0,05% azydku sodu

1 x 72 testy

1 x 3,6 ml

MMX (odczynnik HCV Master Mix)	1 x 3,5 ml
Bufor Tricine Octan potasu Wodorotlenek potasu < 20% dimetylosulfotlenku Glicerol < 0,004% dATP, dCTP, dGTP, dUTP < 0,002% preparatu primerów sensownych i antysensownych dla regionu 5'UTR wirusa HCV < 0,001% preparatów znakowanych barwnikami fluorescencyjnymi sond oligonukleotydowych, swoistych dla HCV oraz HCV Quantitation Standard < 0,001% aptameru oligonukleotydowego < 0,05% polimerazy DNA Z05 i Z05D (bakteryjnej) < 0,1% enzymu AmpErase (uracyno-N-glikozyazy, bakteryjnej) 0,09% azydku sodu	
Mn²⁺ (roztwór manganu)	1 x 19,8 ml
< 0,5% octanu manganu Kwas octowy lodowaty 0,09% azydku sodu	
HCV H(+)-C, v2.0 (kontrola HCV wysoko dodatnia)	6 x 0,85 ml
< 0,001% konstruktu Armored RNA HCV zawierającego sekwencje HCV (niezakaźnego RNA obecnego w bakteriofagu MS2) Ujemne osocze ludzkie, niereaktywne w testach na obecność przeciwciał przeciwko HCV, przeciwciał przeciwko HIV-1/2, antygenowi HIV p24 oraz antygenowi HBsAg; RNA HIV-1, RNA HCV i DNA HBV niewykrywalne przy użyciu metod PCR 0,1% substancja konserwująca ProClin® 300	
HCV L(+)-C, v2.0 (kontrola HCV nisko dodatnia)	6 x 0,85 ml
< 0,001% konstrukt Armored RNA HCV zawierającego sekwencje HCV (niezakaźnego RNA obecnego w bakteriofagu MS2) Ujemne osocze ludzkie, niereaktywne w testach na obecność przeciwciał przeciwko HCV, przeciwciał przeciwko HIV-1/2, antygenowi HIV p24 oraz antygenowi HBsAg; RNA HIV-1, RNA HCV i DNA HBV niewykrywalne przy użyciu metod PCR 0,1% substancja konserwująca ProClin® 300	
CTM (-) C [kontrola ujemna COBAS® TaqMan® (osocze ludzkie)]	6 x 1,0 ml
Ujemne osocze ludzkie, niereaktywne w testach na obecność przeciwciał przeciwko HCV, przeciwciał przeciwko HIV-1/2, antygenowi HIV p24 oraz antygenowi HBsAg; RNA HIV-1, RNA HCV i DNA HBV niewykrywalne przy użyciu metod PCR 0,1% substancja konserwująca ProClin® 300	
HCV H(+)-C, v2.0 Clip (klips z kodem kreskowym dla kontroli HCV wysoko dodatniej)	1 x 6 klipsów
HCV L(+)-C, v2.0 Clip (klips z kodem kreskowym dla kontroli HCV nisko dodatniej)	1 x 6 klipsów
HCV (-) C, v2.0 Clip (klips z kodem kreskowym dla kontroli ujemnej HCV)	1 x 6 klipsów

PG WR

(odczynnik płuczący COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®)

Cytrynian sodu dwuwodny

< 0,1% N-metyloizotiazolon-HCl

OSTRZEŻENIA I ŚRODKI OSTROŻNOŚCI DOTYCZĄCE METODY

Jak w przypadku każdej procedury testowej, dla prawidłowego przeprowadzenia badania kluczowe znaczenie ma zachowanie zasad dobrej praktyki laboratoryjnej. Z uwagi na wysoką czułość niniejszego testu należy przestrzegać wyjątkową ostrożność, używając odczynników oraz mieszanin do amplifikacji, aby zapobiec kontaminacji.

A. DO STOSOWANIA W DIAGNOSTYCE *IN VITRO*.

B. Ten test jest przeznaczony do stosowania z ludzką surowicą lub osoczem ludzkim pobranym na EDTA jako antykoagulant.

C. Nie pipetować za pomocą ust.

D. Nie jeść, nie pić ani nie palić w obszarach roboczych laboratorium. Posługując się próbkami i odczynnikami z zestawów, należy stosować jednorazowe rękawice, fartuchy laboratoryjne oraz odpowiednią ochronę oczu. Po pracy z próbkami i odczynnikami testowymi należy dokładnie umyć ręce.

E. Przy pobieraniu materiałów z fiolek z kontrolą unikać skażenia bakteryjnego odczynników lub rybonukleazą.

F. Zaleca się używanie jałowych jednorazowych pipet oraz końcówek pipet wolnych od RNaz.

G. Nie mieszać kontroli pochodzących z różnych serii lub różnych fiolek tej samej serii.

H. Nie mieszać ze sobą kaset odczynników lub kontroli pochodzących z różnych zestawów.

I. Nie otwierać kaset COBAS® AmpliPrep; nie wymieniać, nie mieszać, nie usuwać ani nie dodawać butelek do kasety.

J. Wyrzucić wszystkie nieużyte odczynniki, odpady i próbki, postępując zgodnie z przepisami krajowymi, federalnymi, stanowymi i lokalnymi.

K. Nie używać zestawu po upływie daty ważności.

L. Karty charakterystyki (ang. Safety Data Sheet, SDS) są dostępne na żądanie w miejscowym przedstawicielstwie firmy Roche.

M. Z próbkami oraz kontrolami należy obchodzić się jak z materiałem zakaźnym, stosując bezpieczne procedury laboratoryjne, przedstawione w dokumentach *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*¹⁹ oraz CLSI Document M29-A3²⁰. Dokładnie oczyścić i odkażić wszystkie powierzchnie robocze świeżo przygotowanym 0,5% roztworem podchlorynu sodu w wodzie dejonizowanej lub destylowanej.

N. Odczynniki **CTM (-) C**, **HCV L(+)C**, **v2.0** oraz **HCV H(+)C**, **v2.0**, zawierają ludzkie osocze otrzymane z krwi ludzkiej. Materiał źródłowy został przebadany i uznany za niereaktywny pod względem obecności antygenu powierzchniowego wirusa zapalenia wątroby typu B (HBsAg), przeciwciał przeciwko wirusowi HIV-1/2 oraz HCV, a także antygenu HIV p24. Badanie ujemnego osocza ludzkiego przy zastosowaniu metod PCR nie wykazało wykrywalnej obecności RNA wirusa HIV-1, RNA wirusa HCV ani DNA wirusa HBV. Nie są znane metody testowe mogące dać całkowitą pewność, że produkty pochodzące z krwi ludzkiej nie przenoszą czynników zakaźnych. Z tego powodu wszelkie materiały pochodzenia ludzkiego, w tym odczynniki **CTM (-) C**, **HCV L(+)C**, **v2.0** oraz **HCV H(+)C**, **v2.0**, powinny być traktowane jak potencjalnie zakaźne.

- O. Odczynnik **MGP, EB, QS, Mn²⁺** oraz **MMX** zawierają azydek sodu. Azydek sodu może reagować z instalacjami wodno-kanalizacyjnymi wykonanymi z ołowiu lub miedzi, tworząc silnie wybuchowe azydki metali. Usuwać roztwory zawierające azydek sodu do zlewów laboratoryjnych, należy spłukać je dużą ilością wody, aby zapobiec nagromadzeniu azydków.
- P. Podczas pracy z jakimkolwiek odczynnikiem należy używać osłon na oczy oraz fartuchów laboratoryjnych i rękawic jednorazowych. Należy unikać kontaktu wymienionych materiałów ze skórą, oczami i błonami śluzowymi. Jeżeli dojdzie do kontaktu, miejsce jego wystąpienia należy natychmiast spłukać dużą ilością wody. Jeżeli nie zostaną podjęte odpowiednie działania lecznicze, może dojść do oparzeń. W razie rozlania wspomnianych odczynników należy przed wytarciem plam rozcieńczyć je wodą.
- Q. Nie dopuszczać do kontaktu odczynnika **HCV QT v2.0 CS2** i odpadów płynnych, w tym zużytych jednostek przetwarzania próbki (SPU) COBAS® AmpliPrep z urządzenia COBAS® AmpliPrep, zawierających tiocyjanian guanidyny z roztworem podchlorynu sodu (wybielaczem). Takie mieszaniny mogą spowodować powstanie silnie toksycznego gazu.

WYMAGANIA DOTYCZĄCE PRZECHOWYWANIA I UŻYTKOWANIA

- A. Odczynniki **HCV QT v2.0 CS1**, **HCV QT v2.0 CS2**, **HCV QT v2.0 CS3** oraz **HCV QT v2.0 CS4** należy przechowywać w temperaturze 2–8°C. Nieużywane odczynniki zachowują stabilność do momentu upływu wskazanej daty ważności. Po otwarciu odczynniki zachowują stabilność przez 70 dni w temperaturze 2–8°C lub do upływu daty ważności, zależnie od tego, co nastąpi wcześniej. Odczynniki **HCV QT v2.0 CS1**, **HCV QT v2.0 CS2**, **HCV QT v2.0 CS3** oraz **HCV QT v2.0 CS4** mogą być używane łącznie przez okres do 96 godzin pracy w urządzeniu COBAS® AmpliPrep. Pomiędzy kolejnymi cyklami pracy odczynniki należy przechowywać w temperaturze 2–8°C.
- B. Odczynniki **HCV H(+)**C, **v2.0**, **HCV L(+)**C, **v2.0** i **CTM (–)** C należy przechowywać w temperaturze 2–8°C. Kontrole są stabilne aż do upływu podanej daty ważności. Po otwarciu niewykorzystane do badania odczynniki należy wyrzucić.
- C. Klipsy z kodem kreskowym [**HCV H(+)**C, **v2.0 Clip**, **HCV L(+)**C, **v2.0 Clip** oraz **HCV (–)** C, **v2.0 Clip**] należy przechowywać w temperaturze 2–30°C.
- D. Odczynnik **PG WR** należy przechowywać w temperaturze 2–30°C. Nieużywany odczynnik **PG WR** zachowuje stabilność do upływu podanej daty ważności. Po otwarciu odczynnik zachowuje stabilność przez 28 dni w temperaturze 2–30°C lub do upływu daty ważności, zależnie od tego, co nastąpi wcześniej.

DOSTARCZONE MATERIAŁY

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

HCVQTV2

HCV QT v2.0 CS1

(kaseta odczynników z cząsteczkami magnetycznymi do oznaczeń HCV)

HCV QT v2.0 CS2

(kaseta z odczynnikiem lizującym do oznaczeń HCV)

HCV QT v2.0 CS3

(kaseta wieloodczynnikowa do oznaczeń HCV)

HCV QT v2.0 CS4

(kaseta z odczynnikami swoistymi dla testu do oznaczeń HCV)

HCV H(+)C, **v2.0**

(kontrola HCV wysoko dodatnia)

HCV L(+)C, **v2.0**

(kontrola HCV nisko dodatnia)

CTM (–) C

[kontrola ujemna COBAS® TaqMan® (osocze ludzkie)]

HCV H(+)C, v2.0 Clip

(klips z kodem kreskowym dla kontroli HCV wysoko dodatniej)

HCV L(+)C, v2.0 Clip

(klips z kodem kreskowym dla kontroli HCV nisko dodatniej)

HCV (–) C, v2.0 Clip

(klips z kodem kreskowym dla kontroli ujemnej HCV)

COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® Wash Reagent
Odczynnik płuczący COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®

PG WR

PG WR

(odczynnik płuczący COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®)

MATERIAŁY WYMAGANE, LECZ NIEDOSTARCZANE**Urządzenia i oprogramowanie**

- Urządzenie COBAS® AmpliPrep
- Analizator COBAS® TaqMan® lub analizator COBAS® TaqMan® 48
- Stacja dokująca (opcjonalna)
- Oprogramowanie AMPLILINK w wersji serii 3.3 lub 3.4
- Jednostka sterująca z oprogramowaniem AMPLILINK, wyposażona w drukarkę
- Podręczniki obsługi urządzeń i oprogramowania:
 - Instrukcja obsługi urządzenia COBAS® AmpliPrep do użytku z oprogramowaniem AMPLILINK w wersji serii 3.3 i 3.4
 - Instrukcja obsługi analizatora COBAS® TaqMan® do użytku z oprogramowaniem AMPLILINK w wersji serii 3.3 i 3.4
 - Instrukcja obsługi analizatora COBAS® TaqMan® 48 do użytku z oprogramowaniem AMPLILINK w wersji serii 3.3 i 3.4
 - Podręcznik oprogramowania AMPLILINK w wersji serii 3.3 do użytku z urządzeniem COBAS® AmpliPrep, analizatorem COBAS® TaqMan®, analizatorem COBAS® TaqMan® 48, analizatorem COBAS® AMPLICOR i aparatem **cobas p 630**
lub
 - Podręcznik oprogramowania AMPLILINK w wersji serii 3.4
 - Opcjonalnie: Podręcznik użytkownika aparatu **cobas p 630** z oprogramowaniem w wersji 2.2
- Plik definicji testu (Test Definition File, TDF). Nazwa i numer bieżącej wersji TDF znajdują się na karcie informacyjnej produktu, dołączonej do opakowania zestawu.

Pozostałe materiały

- Statyw na próbki (statyw SK24)
- Statyw na odczynniki
- Statyw na SPU
- Nośnik K
- Transporter do nośników K
- Statyw na nośniki K
- Pipetory z barierą aerozoloną lub końcówkami dodatniego wypierania wolnymi od RNaz (pojemność 1000 µl); dokładność pipetorów powinna mieścić się w granicach 3% podanej pojemności. Należy używać końcówek z barierą aerozoloną lub dodatniego wypierania wolnych od RNaz w celu zapobieżenia kontaminacji krzyżowej między próbką i amplikonem.
- Rękawice jednorazowe bezpudrowe
- Mieszadło wibracyjne

Materiały jednorazowe

- Jednostki przetwarzania próbki (SPU)
- Probówki wejściowe na próbki (ang. S-tube input) z klipsami z kodem kreskowym
- Statywy z końcówkami K
- Opakowanie zawierające probówki K 12 x 96

POBIERANIE, TRANSPORT I PRZECZOWYWANIE PRÓBEK

UWAGA: Ze wszystkimi próbkami i kontrolami należy obchodzić się jak z materiałem potencjalnie zakaźnym.

Pobieranie i przechowywanie próbek

COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0, jest przeznaczony do stosowania z próbkami surowicy lub osocza pobranego na EDTA. Krew należy pobierać do probówek do rozdzielu surowicy SST®, probówek do otrzymywania nierozcieńczonego osocza BD Vacutainer® PPT™, przeznaczonych do metod diagnostyki molekularnej lub sterylnych probówek zawierających EDTA jako antykoagulant (lawendowy korek). Z probówkami należy postępować zgodnie z instrukcjami producenta. Świeżo pobrane próbki (krew pełna) można przechowywać w temperaturze 2–25°C przez maksymalnie 24 godziny przed odwirowaniem. Po odwirowaniu surowicę lub osocze pobrane na EDTA należy przenieść do jałowej probówki polipropylenowej. Zaleca się przechowywać próbki w porcjach o objętości około 1000 µl w sterylnych, polipropylenowych probówkach o pojemności 2,0 ml z zakrętką (np. w zakręcanych mikroprobówkach firmy Sarstedt o pojemności 2 ml). Probki surowicy lub osocza pobranego na EDTA można przechowywać w następujących warunkach:

- w temperaturze 2–8°C przez maksymalnie 72 godziny
- w temperaturze od –20°C do –80°C przez maksymalnie 6 tygodni

Probki surowicy i osocza pobranego na EDTA można zamrażać i rozmrażać maksymalnie pięć razy bez utraty RNA HCV.

Transport próbek

Transport krwi pełnej, surowicy lub osocza pobranego na EDTA musi przebiegać zgodnie z przepisami krajowymi, federalnymi, państwowymi i lokalnymi dotyczącymi transportu czynników etiologicznych²¹. Krew pełną należy transportować w temperaturze 2–25°C i odwirować w ciągu 24 godzin od pobrania. Osocze EDTA lub surowica mogą być transportowane w temp. 2–8°C lub zamrożone do temperatury od –20°C do –80°C.

INSTRUKCJA UŻYTKOWANIA

Szczegółowe instrukcje obsługi, opis możliwych konfiguracji, drukowania wyników oraz interpretacji znaczników, komentarzy i komunikatów o błędach znajdują się w podręcznikach oprogramowania AMPLILINK w wersji serii 3.3 lub 3.4, które wymieniono w rozdziale „Urządzenia i oprogramowanie”.

Rozmiar serii i przebieg pracy

Każdy zestaw zawiera odczynniki wystarczające do przeprowadzenia 72 testów, które można wykonywać w seriach liczących 12–24 testów. Każda seria musi obejmować co najmniej jedną kontrolę [CTM (–) C, HCV L(+), v2.0 oraz HCV H(+), v2.0] (patrz rozdział „Kontrola jakości”). Przebieg pracy analizatora COBAS® TaqMan® lub analizatora COBAS® TaqMan® 48 należy rozpocząć w ciągu 120 minut od zakończenia przygotowania próbki i kontroli. Próbek i kontroli poddanych obróbce NIE NALEŻY ZAMRAŻAĆ ani NIE NALEŻY PRZECZOWYWAĆ w temperaturze 2–8°C.

Przygotowanie próbek i kontroli

W przypadku stosowania próbek zamrożonych należy je pozostawić w temperaturze pokojowej do całkowitego rozmrożenia i przed użyciem wymieszać na mieszadle wiracyjnym przez 3–5 sekund. Kontrole należy wyjąć z miejsca przechowywania w temperaturze 2–8°C, doprowadzić do temperatury otoczenia oraz wymieszać na mieszadle wiracyjnym przez 3–5 sekund przed użyciem.

Przygotowanie urządzenia COBAS® AmpliPrep

Część A. Konserwacja i płukanie

- A1. Urządzenie COBAS® AmpliPrep w trybie oczekiwania (stand by) jest gotowe do pracy.
- A2. Włącz jednostkę sterującą z oprogramowaniem AMPLILINK za pomocą przycisku ON. Przygotuj jednostkę sterującą w następujący sposób:
 1. Zaloguj się do systemu operacyjnego Microsoft Windows.
 2. Dwukrotnie kliknij ikonę oprogramowania AMPLILINK.
 3. Zaloguj się do oprogramowania AMPLILINK, wprowadzając przydzielony identyfikator użytkownika i hasło.
- A3. Skontroluj stan odczynnika **PG WR** na ekranie **Status** i w razie potrzeby wymień go.
- A4. Wykonaj wszystkie czynności konserwacyjne wyszczególnione w zakładce **Due**. Urządzenie COBAS® AmpliPrep automatycznie przepłucze system.

Część B. Wkładanie kaset z odczynnikami

UWAGA: *Wszystkie kasetki odczynników należy wyjąć z miejsca przechowywania w temperaturze 2–8°C, natychmiast włożyć do urządzenia COBAS® AmpliPrep i pozostawić do ogrzania się do temperatury pokojowej wewnątrz aparatu co najmniej przez 30 minut przed rozpoczęciem przetwarzania pierwszej próbki. Nie dopuszczać do ogrzania się kaset z odczynnikami do temperatury pokojowej poza aparatem ze względu na możliwość skraplania pary na etykietach z kodem kreskowym. W przypadku pojawienia się skroplonej pary nie ścierać jej z etykiet z kodem kreskowym.*

- B1. Umieścić kasetę **HCV QT v2.0 CS1** w statywie na odczynniku. Umieścić kasety **HCV QT v2.0 CS2**, **HCV QT v2.0 CS3** oraz **HCV QT v2.0 CS4** na osobnym statywie na odczynniku.
- B2. Włożyć statyw na odczynniku zawierający kasetę **HCV QT v2.0 CS1** w pozycję **A** urządzenia COBAS® AmpliPrep.
- B3. Włożyć statyw na odczynniku zawierający kasety **HCV QT v2.0 CS2**, **HCV QT v2.0 CS3** oraz **HCV QT v2.0 CS4** w pozycję **B**, **C**, **D** lub **E** w urządzeniu COBAS® AmpliPrep (dodatkowe szczegółowe instrukcje znajdują się w odpowiedniej instrukcji obsługi aparatu).

Część C. Wkładanie materiałów jednorazowych

UWAGA: *Należy określić liczbę potrzebnych kaset odczynnikowych COBAS® AmpliPrep, jednostek przetwarzania próbki (SPU), próbek wejściowych próbki (próbek S), końcówek K oraz próbek K. Każda próbka lub kontrola wymaga użycia jednej jednostki przetwarzania próbki SPU, jednej próbki wejściowej S, jednej końcówki K i jednej próbki K.*

Istnieje wiele możliwości konfigurowania użytkownika urządzenia COBAS® AmpliPrep z analizatorem COBAS® TaqMan® lub analizatorem COBAS® TaqMan® 48. W zależności od wybranej konfiguracji włoż odpowiednią liczbę statywów z kasetami odczynników, statywów na próbki z próbkami wejściowymi S, statywów na jednostki SPU, statywów z końcówkami K, statywów z próbkami K oraz nośników K w statywach na nośniki K do odpowiednich pozycji w urządzeniu COBAS® AmpliPrep.

- C1. Umieścić jednostki SPU w statywach i włożyć statywy na pozycję **J**, **K** lub **L** w urządzeniu COBAS® AmpliPrep.
- C2. W zależności od wybranej konfiguracji włożyć pełne statywy próbek K na pozycję **M**, **N**, **O** lub **P** w urządzeniu COBAS® AmpliPrep.
- C3. Włożyć pełne statywy z końcówkami K na pozycję **M**, **N**, **O** lub **P** w urządzeniu COBAS® AmpliPrep.
- C4. W zależności od wybranej konfiguracji włożyć nośniki K na statyw(y) na nośniki K na pozycję **M**, **N**, **O** lub **P** w urządzeniu COBAS® AmpliPrep.

Część D. Tworzenie zleceń i wkładanie próbek

- D1. Przygotowanie statywów na próbki: do każdej pozycji statywu na próbki, w której zostanie umieszczona próbka (próbówka S), włóż klips opatrzoney etykietą z kodem kreskowym. Do każdej pozycji statywu na próbki, w której zostanie umieszczona kontrola (próbówka S), włóż odpowiedni klips opatrzoney etykietą z kodem kreskowym dla danej kontroli [CTM (-) C, HCV L(+)+C, v2.0 oraz HCV H(+)+C, v2.0]. Klipsy z kodami kreskowymi dla kontroli powinny mieć takie same numery serii, jak numery serii fiolek kontroli w zestawie. Zwróć uwagę, aby odpowiednie kontrole umieścić na pozycjach z odpowiednim klipsem z kodem kreskowym kontroli. W każdej pozycji oznaczonej klipsem z kodem kreskowym umieść jedną próbkę wejściową S.
- D2. Utwórz zlecenia dla poszczególnych próbek i kontroli przy pomocy oprogramowania AMPLILINK w oknie **Orders** w zakładce **Sample**. Wybierz odpowiedni plik definicji testu i zakończ procedurę poprzez zapisanie.
- D3. W oknie **Orders** w zakładce **Sample Rack** przypisz zlecenia dla próbek i kontroli do pozycji statywów na próbki. Należy wprowadzić numer statywu na próbki dla statywu przygotowanego w punkcie D1.
- D4. Wydrukuj raport Sample Rack Order, który będzie służyć jako arkusz roboczy.
- D5. Przygotuj statywy na próbki i kontrole w miejscu przeznaczonym do dodawania próbek i kontroli w następujący sposób: każdą próbkę i kontrolę [CTM (-) C, HCV L(+)+C, v2.0 i HCV H(+)+C, v2.0] wymieszaj na mieszadle wibracyjnym przez 3–5 sekund. Unikaj zanieczyszczenia rękawic podczas manipulacji próbkami i kontrolami.
- D6. Przenieś 650 µl każdej próbki i kontroli [CTM (-) C, HCV L(+)+C, v2.0 oraz HCV H(+)+C, v2.0] do odpowiedniej, oznaczonej kodem kreskowym próbki wejściowej S za pomocą mikropipetora z barierą aeroolową lub końcówką dodatkowego wypierania wolną od RNaz. **Unikaj przenoszenia cząstek stałych i/lub skrzepin fibrynowych z oryginalnej próbki do próbki wejściowej S.** Próbki i kontrole należy przenieść na pozycje próbek zgodnie z przygotowanym i zapisanym w punkcie D4 arkuszem roboczym. Klipsy z kodami kreskowymi dla kontroli powinny mieć takie same numery serii, jak numery serii fiolek kontroli w zestawie. Przypisz odpowiednie kontrole do właściwych pozycji z odpowiednim klipsem z kodem kreskowym kontroli. **Unikaj zanieczyszczenia górnej części próbek S materiałem próbki lub kontroli.**
- D7. W przypadku używania aparatu **cobas p 630** do przygotowywania próbek należy odnieść się do podręcznika użytkownika aparatu **cobas p 630**.
- D8. W zależności od stosowanej konfiguracji statywu na próbki wypełnione próbkami wejściowymi S umieść na pozycji **F, G** lub **H** w urządzeniu COBAS® AmpliPrep.
- D9. W zależności od stosowanej konfiguracji statywu na próbki wypełnione próbkami wejściowymi S oraz próbkami K (po jednej dla każdej z próbek wejściowych S, umieszczonej w odpowiednim położeniu i sąsiadującej z próbką wejściową S) umieść na pozycji **F, G** lub **H** w urządzeniu COBAS® AmpliPrep.

Część E. Rozpoczęcie przebiegu pracy urządzenia COBAS® AmpliPrep

- E1. Przy użyciu oprogramowania AMPLILINK uruchom urządzenie COBAS® AmpliPrep.

Część F. Zakończenie przebiegu pracy urządzenia COBAS® AmpliPrep i transfer do analizatora COBAS® TaqMan® lub analizatora COBAS® TaqMan® 48 (dotyczy wyłącznie transferu ręcznego)

- F1. Sprawdź, czy nie pojawiły się oflagowania lub komunikaty o błędzie.
- F2. Wyjmij z urządzenia COBAS® AmpliPrep przetworzone próbki i kontrole znajdujące się w statywach na próbki (w przypadku analizatora COBAS® TaqMan® bez stacji dokującej) lub w statywach na nośniki K (w przypadku analizatora COBAS® TaqMan® 48), w zależności od konfiguracji.
- F3. Usuń odpady z urządzenia COBAS® AmpliPrep.

UWAGA: Przygotowanych próbek i kontroli nie należy wystawiać na działanie światła.

Amplifikacja i detekcja

Przygotowanie analizatora COBAS® TaqMan® lub analizatora COBAS® TaqMan® 48

Przebieg pracy analizatora COBAS® TaqMan® lub analizatora COBAS® TaqMan® 48 należy rozpocząć w ciągu 120 minut od zakończenia przygotowania próbek i kontroli. Próbek i kontroli poddanych obróbce NIE NALEŻY ZAMRAŻAĆ ani NIE NALEŻY PRZECHOWYWAĆ w temperaturze 2–8°C.

Część G. Wkładanie przetworzonych próbek

- G1. W zależności od konfiguracji urządzenia wykonaj odpowiednie czynności w celu przeniesienia próbek K do analizatora COBAS® TaqMan® lub analizatora COBAS® TaqMan® 48:

Część H. Rozpoczęcie przebiegu pracy analizatora COBAS® TaqMan® lub analizatora COBAS® TaqMan® 48

- H1. Uruchom analizator COBAS® TaqMan® lub analizator COBAS® TaqMan® 48 w zależności od zastosowanej konfiguracji.

Część I. Zakończenie przebiegu pracy analizatora COBAS® TaqMan® lub analizatora COBAS® TaqMan® 48

- I1. Po zakończeniu przebiegu pracy analizatora COBAS® TaqMan® lub analizatora COBAS® TaqMan® 48 wydrukuj raport wyników. Sprawdź, czy w raporcie wyników nie pojawiły się oflagowania lub komunikaty o błędzie. Próbkę oflagowaną i opatrzone komentarzami należy interpretować zgodnie z opisem podanym w rozdziale „Wyniki”. Po zatwierdzeniu dane ulegają archiwizacji.
- I2. Wyjmij zużyte próbki K z analizatora COBAS® TaqMan® lub analizatora COBAS® TaqMan® 48.

KONTROLA JAKOŚCI

Każda seria testowa musi zawierać jedną kontrolę COBAS® TaqMan® Negative Control (kontrola ujemna), jedną kontrolę HCV Low Positive Control (kontrola nisko dodatnia) oraz jedną kontrolę HCV High Positive Control (kontrola wysoko dodatnia). Seria testowa jest uważana za ważną, jeśli żadna z kontroli [HCV L(+)+C, v2.0, HCV H(+)+C, v2.0 oraz CTM (–) C] nie została oflagowana.

Nie ma wymagań dotyczących położenia kontroli na statywie próbek.

Sprawdź, czy na wydruku dla serii testowej obecne są oflagowania i komentarze, aby upewnić się, że seria jest ważna.

Kontrola ujemna

Kontrola **CTM (–) C** musi dawać wynik „Target Not Detected”. Jeśli kontrola **CTM (–) C** jest oflagowana jako nieważna, to cała seria testowa jest także nieważna. Należy powtórzyć cały proces (przygotowanie próbek i kontroli, amplifikację i detekcję). Jeśli wyniki kontroli **CTM (–) C** w powtarzanych seriach są stale nieważne, skontaktuj się z miejscowym przedstawicielstwem firmy Roche celem uzyskania pomocy technicznej.

Kontrola dodatnie

Przypisane zakresy wartości dla kontroli **HCV L(+)+C, v2.0** oraz **HCV H(+)+C, v2.0** są swoiste dla każdej serii odczynników i są zapisane w kodach kreskowych kasety odczynnikowej testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0.

Stężenia RNA HCV w IU/ml dla kontroli **HCV L(+)+C, v2.0** i **HCV H(+)+C, v2.0** powinny mieścić się w przypisanych im zakresach. Jeśli jedna lub obie kontrole dodatnie są oflagowane jako nieważne, to cała seria testowa jest także nieważna. Należy powtórzyć cały proces (przygotowanie próbek i kontroli, amplifikację i detekcję). Jeżeli miano RNA HCV dla jednej lub obu kontroli dodatnich stale mieści się poza przypisanym zakresem w powtórzonych seriach, należy zwrócić się do regionalnego przedstawicielstwa firmy Roche w celu uzyskania pomocy technicznej.

WYNIKI

Analizatory COBAS® TaqMan® i COBAS® TaqMan® 48 oznaczają stężenie RNA HCV w próbkach i kontrolach w sposób automatyczny. Stężenie RNA HCV jest wyrażane w jednostkach międzynarodowych (International Units) na mililitr (IU/ml).

Oprogramowanie AMPLILINK:

- Określa liczbę cykli (Ct) dla RNA HCV oraz RNA HCV QS.
- Określa stężenie RNA HCV na podstawie wartości Ct dla RNA HCV i RNA HCV QS oraz swoistych dla danej serii współczynników kalibracji, zapisanych w kodach kreskowych kasety.
- Określa, czy obliczone i wyrażone w IU/ml wartości dla kontroli **HCV L(+)**C, **v2.0** oraz **HCV H(+)**C, **v2.0** mieszczą się w określonych zakresach.

Ocena ważności serii testowej:

Sprawdź okno wyników oprogramowania AMPLILINK lub wydruk pod kątem obecności oflagowań i komentarzy, aby się upewnić, że dana seria testowa jest ważna.

W przypadku zleceń dla kontroli przeprowadzane jest sprawdzenie w celu określenia, czy wartość IU/ml mieści się w określonym przedziale. Jeśli wartość IU/ml dla kontroli nie mieści się w odpowiednim zakresie, generowane jest OFLAGOWANIE sygnalizujące nieprawidłowy wynik kontroli.

Seria testowa jest uważana za ważną, jeśli żadna z kontroli [**HCV L(+)**C, **v2.0**, **HCV H(+)**C, **v2.0** oraz **CTM (-)** C] nie została oflagowana.

Seria testowa jest nieważna, jeżeli kontrole dla testu HCV zostały opatrzone którymkolwiek z poniższych oflagowań:

Kontrola ujemna:

Oflagowanie	Wynik	Interpretacja
NC_INVALID	Invalid	Wynik oznaczony jako nieważny lub obliczone miano dla kontroli ujemnej nie jest wynikiem ujemnym, tj. nie następuje generowanie wyniku „Target Not Detected”.

Kontrola HCV nisko dodatnia:

Oflagowanie	Wynik	Interpretacja
LPCINVALID	Invalid	Wynik oznaczony jako nieważny lub obliczone miano dla kontroli nisko dodatniej nie mieści się w określonym zakresie.

Kontrola HCV wysoko dodatnia:

Oflagowanie	Wynik	Interpretacja
HPCINVALID	Invalid	Wynik oznaczony jako nieważny lub obliczone miano dla kontroli wysoko dodatniej nie mieści się w określonym zakresie.

Jeśli seria testowa jest nieważna, należy ją w całości powtórzyć, łącznie z przygotowaniem próbek i kontroli, odwróconą transkrypcją oraz amplifikacją i detekcją.

Interpretacja wyników:

Jeśli seria testowa jest ważna, należy sprawdzić poszczególne próbki na wydruku z wynikami w poszukiwaniu oflagowań lub komentarzy.

⇒ Ważna seria testowa może zawierać zarówno ważne jak i nieważne wyniki badania próbki, zależnie od tego, jakimi oflagowaniami i/lub komentarzami są one opatrzone.

Wyniki badania próbek interpretuje się w następujący sposób:

Wynik	Interpretacja
Target Not Detected	Wartość Ct dla HCV znajduje się powyżej granicy testu lub nie uzyskano wartości Ct dla HCV. Podać wyniki jako „Nie wykryto RNA HCV”.
<1.50E+01 IU/mL	Obliczona wartość w IU/ml jest niższa od dolnej granicy oznaczalności testu. Podać wyniki jako „Wykryto RNA HCV, poniżej 15 IU RNA HCV/ml”.
≥1.50E+01 IU/mL oraz ≤1.00E+08 IU/mL	Obliczone wyniki o wartości 15 IU/ml lub wyższej albo o wartości 1,00E+08 IU/ml lub niższej mieszczą się w zakresie liniowym testu. Podać wyniki jako „Wykryto XX IU/ml RNA HCV”.
>1.00E+08 IU/mL	Obliczone wyniki znajdują się powyżej liniowego zakresu testu. Podać wyniki jako „Powyżej 1,00E+08 IU/ml RNA HCV”. Jeśli pożądane są wyniki ilościowe, oryginalną próbkę należy rozcieńczyć HCV-ujemną ludzką surowicą lub HCV-ujemnym ludzkim osoczem pobranym na EDTA, w zależności od matrycy oryginalnej, a następnie powtórzyć test. Otrzymany wynik należy pomnożyć przez współczynnik rozcieńczenia.

Jeśli wynik próbki jest wyświetlany jako „Failed”, „Invalid” lub „Aborted”, należy zapoznać się z informacjami w Podręczniku oprogramowania AMPLILINK w wersji serii 3.3 lub 3.4, który znajduje się na liście w rozdziale „Materiały wymagane, lecz niedostarczane”.

UWAGA: Próbki o wynikach powyżej zakresu testu mogą również dawać wynik nieważny, opatrzone oflagowaniem „QS_INVALID”. Jeśli pożądane są wyniki ilościowe, oryginalną próbkę należy rozcieńczyć HCV-ujemną ludzką surowicą lub HCV-ujemnym ludzkim osoczem pobranym na EDTA, w zależności od matrycy oryginalnej, a następnie powtórzyć test. Otrzymany wynik należy pomnożyć przez współczynnik rozcieńczenia.

OGRANICZENIA METODY

1. Test ten został zatwierdzony wyłącznie do badania ludzkiej surowicy lub ludzkiego osocza pobranego na EDTA jako antykoagulant. Badanie innych rodzajów próbek może dawać nieprawidłowe wyniki.
2. Mutacje w obrębie wysoko konserwatywnego regionu genomu wirusa, z którym wiąże się startery i/lub sondy używane w tym teście, chociaż rzadkie, mogą spowodować niedoszacowanie ilości lub niewykrycie wirusa.
3. Oznaczenie ilościowe RNA wirusa HCV zależy od liczby cząstek wirusa obecnych w próbce i mogą na nie mieć wpływ metoda pobrania próbki, czynniki zależne od pacjenta (np. wiek, obecność objawów) i/lub stadium zakażenia.
4. Uzyskanie wiarygodnych wyników zależy od właściwego pobrania próbki, transportu, przechowywania oraz procedur przetwarzania.
5. Obecność enzymu AmpErase w odczynniku COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Master Mix zmniejsza ryzyko kontaminacji amplikonu. Jednak zanieczyszczenia materiałem pochodzącym z HCV-dodatnich kontroli i próbek klinicznych można uniknąć jedynie dzięki stosowaniu zasad dobrej praktyki laboratoryjnej i uważnemu wykonywaniu procedur opisanych w niniejszej ulotce, dołączonej do opakowania zestawu.

6. Ten produkt powinien być stosowany wyłącznie przez personel przeszkolony w obsłudze aparatu **cobas p 630** (opcjonalnie), urządzenia **COBAS® AmpliPrep** oraz analizatora **COBAS® TaqMan®** lub analizatora **COBAS® TaqMan® 48**. Operator powinien posiadać pełną wiedzę na temat aplikacji uruchamianych na omawianych urządzeniach oraz powinien kierować się zasadami dobrej praktyki laboratoryjnej.
7. Ten produkt może być stosowany tylko w połączeniu z aparatem **cobas p 630** (opcjonalnie), urządzeniem **COBAS® AmpliPrep** oraz analizatorem **COBAS® TaqMan®** lub analizatorem **COBAS® TaqMan® 48**.
8. Z uwagi na różnice pomiędzy technologiami zaleca się, aby przed zmianą stosowanych metod użytkownik przeprowadził w laboratorium badanie korelacji stosowanych metod w celu określenia ilościowych różnic występujących pomiędzy nimi.

SUBSTANCJE WPŁYWAJĄCE NA WYNIK TESTU

Wykazano, że podwyższone poziomy trójglicerydów (3300 mg/dl), sprzężonej bilirubiny (25 mg/dl), bilirubiny wolnej (20 mg/dl), albuminy (6000 mg/dl), hemoglobiny (200 mg/dl) oraz ludzkiego DNA (40 mg/dl) w próbkach oraz występowanie chorób autoimmunologicznych, takich jak toczeń rumieniowaty układowy (SLE), reumatoidalne zapalenie stawów (RZS) oraz obecność przeciwciał przeciwjadrowych (ANA), nie wpływa na oznaczenia ilościowe RNA HCV z użyciem testu **COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0**.

Wykazano, że następujące związki lecznicze, przebadane przy maksymalnym stężeniu w osoczu (C_{max}) oraz przy 3-krotnym stężeniu C_{max} nie zakłócają oznaczenia ilościowego RNA HCV z użyciem testu **COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0**:

Nukleotydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy i polimerazy DNA Tenofowir Dipiwoksyl adefowiru	Nienukleozydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy Efawirenz Newirapina
Inhibitory proteazy HIV Atazanawir Sakwinawir Ritonawir Lopinawir/Ritonawir Nelfinawir Darunawir Tipranawir Fosamprenawir	Nukleozydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy Lamiwudyna Zydowudyna Stawudyna Abakawir Didanozyna Emtrycytabina Entekawir Telbiwudyna
Inhibitor fuzji HIV Enfuwirtyd	Inhibitor wejścia HIV Marawirok
Preparaty do leczenia zakażeń herpeswirusami Gancyklowir Valgancyklowir Acyklowir	Immunomodulatory Peginterferon alfa-2b Rybawiryna Peginterferon alfa-2a
Inhibitor integrazy HIV Raltegrawir	

OCENA DZIAŁANIA W BADANIACH NIEKLINICZNYCH

A. Granica wykrywalności

Granice wykrywalności testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0, określono na podstawie analizy serii rozcieńczeń międzynarodowego standardu WHO dla RNA wirusa zapalenia wątroby typu C do oznaczeń opartych na technologii amplifikacji kwasów nukleinowych (WHO International Standard for Hepatitis C Virus RNA for Nucleic Acid Amplification Technology Assays), genotyp 1a, uzyskanego z NIBSC w HCV-ujemnym ludzkim osoczu pobranym na EDTA lub surowicy. W przypadku każdej matrycy analizie poddano po trzy niezależne serie rozcieńczeń. Ogółem przeprowadzono po maksymalnie 252 powtórzenia na poziom stężenia dla każdego typu matrycy. Badanie przeprowadzono przy użyciu trzech serii odczynników testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0.

Wyniki uzyskane dla osocza pobranego na EDTA oraz surowicy, przedstawione odpowiednio w tabeli 1 i 2, wykazują, że test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0, wykrywał RNA HCV w stężeniach 15 IU/ml lub wyższych ze wskaźnikiem dodatności $\geq 95\%$. Różnice pomiędzy wynikami dla surowicy i osocza pobranego na EDTA nie były istotne statystycznie.

Tabela 1
Granica wykrywalności w osoczu pobranym na EDTA określona
na podstawie międzynarodowego standardu WHO dla RNA wirusa zapalenia wątroby typu C
do oznaczeń opartych na technologii amplifikacji kwasów nukleinowych

Początkowe miano (RNA HCV IU/ml)	Liczba ważnych powtórzeń testu	Liczba wyników dodatnich	Odsetek trafień w %
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 w analizie PROBIT przy 95% odsetku trafień	11 IU/ml (95% przedział ufności: 10–13 IU/ml)		
LOD w analizie odsetka trafień	15 IU/ml		

Tabela 2
Granica wykrywalności w surowicy określona
na podstawie międzynarodowego standardu WHO dla RNA wirusa zapalenia wątroby typu C
do oznaczeń opartych na technologii amplifikacji kwasów nukleinowych

Początkowe miano (RNA HCV IU/ml)	Liczba ważnych powtórzeń testu	Liczba wyników dodatnich	Odsetek trafień w %
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 w analizie PROBIT przy 95% odsetku trafień	12 IU/ml (95% przedział ufności: 10–14 IU/ml)		
LOD w analizie odsetka trafień	15 IU/ml		

B. Precyzja

Precyzja testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0, określono na podstawie analizy serii rozcieńczeń próbek klinicznych zawierających HCV (genotyp 1a) lub serii rozcieńczeń Armored RNA HCV (aRNA), przygotowanych w HCV-ujemnym ludzkim osoczu pobranym na EDTA lub w surowicy.

Sześć poziomów rozcieńczeń poddano testom w 3 powtórzeniach na poziom, w 12 seriach przez 4 dni. Każda próbka przechodziła przez całą procedurę testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0, obejmującą przygotowanie próbki, amplifikację i detekcję. Badanie przeprowadzono przy użyciu trzech serii odczynników testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0, a wyniki przedstawiono w tabeli 3.

COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0, wykazuje dobrą precyzję dla trzech serii odczynników w zakresie stężeń od 3,0E+02 IU/ml do 1,0E+08 IU/ml.

Tabela 3
Precyzja testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0,
(próbki osocza pobranego na EDTA oraz surowicy)*

Stężenie nominalne (IU/ml)	Precyzja jako całkowite odchylenie standardowe SD [$\log_{10}$]					
	Osocze pobrane na EDTA			Surowica		
	Seria nr 1	Seria nr 2	Seria nr 3	Seria nr 1	Seria nr 2	Seria nr 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

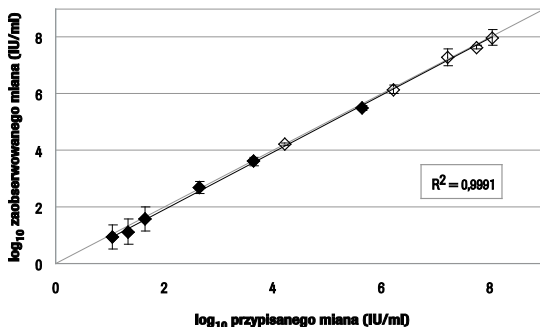
* Uważa się, iż wartości miana mają charakter rozkładu logarytmiczno-normalnego i są analizowane po zamianie na $\log_{10}$. Kolumny 2–7 przedstawiają całkowite odchylenie standardowe (SD) dla przekształconego przez $\log$ miana dla każdej z trzech serii odczynników.

C. Zakres liniowości

Do oceny zakresu liniowości testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0, wykorzystano dwa panele liniowości. Składały się one z rozcieńczeń w osoczu pobranym na EDTA lub surowicy dodatkich klinicznych próbek RNA HCV dla dolnej i środkowej części zakresu dynamicznego (do 3,0E+05 IU/ml) oraz aRNA dla górnej części zakresu dynamicznego (do 2,0E+08 IU/ml). Badanie wykonano z użyciem dwóch serii odczynników testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0, zgodnie z metodami wyszczególnionymi w wytycznych CLSI EP6-A²². Badaniu poddano wszystkie 11 elementów panelu dla osocza pobranego na EDTA oraz wszystkie 14 elementów panelu dla surowicy. Wykonano maksymalnie 16 powtórzeń na poziom stężenia, macierz oraz serię odczynnika.

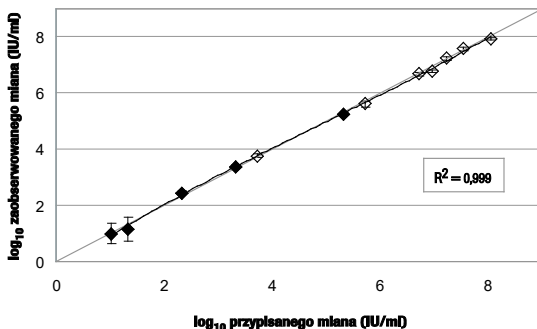
COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0, wykazuje liniowość w zakresie od 15 IU RNA HCV/ml do co najmniej 1,0E+08 IU RNA HCV/ml z uwzględnieniem dopuszczalnego bezwzględnego odchylenia od liniowości wynoszącego $\pm 0,2 \log_{10}$ (reprezentatywne wyniki przedstawiono na rysunkach 1 i 2). W zakresie liniowym dokładność testu mieści się w granicach $\pm 0,2 \log_{10}$.

Rysunek 1
Wyznaczanie zakresu liniowości dla testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0, w próbkach osocza pobranego na EDTA



Na wykresie regresji przedstawiono średnie obserwowane wyniki dla próbek klinicznych (wypełniony romb) oraz próbek aRNA (pusty romb) w odniesieniu do przypisanej wartości log₁₀ miana. Linia regresji (pogrubiona; od wartości 11 IU/ml do 1,1E+08 IU/ml) jest przedstawiona wraz z linią jedności (w kolorze szarym) w celu zobrazowania liniowości testu. Odchylenie standardowe wartości log₁₀ miana jest przedstawione w postaci słupków błędów; podana jest również wartość R^2 .

Rysunek 2
Wyznaczanie zakresu liniowości dla testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0, w próbkach surowicy



Na wykresie regresji przedstawiono średnie obserwowane wyniki dla próbek klinicznych (wypełniony romb) oraz próbek aRNA (pusty romb) w odniesieniu do przypisanej wartości log₁₀ miana. Linia regresji (czarna; od wartości 11 IU/ml do 1,2E+08 IU/ml) jest przedstawiona wraz z linią jedności (w kolorze szarym) w celu zobrazowania liniowości testu. Odchylenie standardowe wartości log₁₀ miana jest przedstawione w postaci słupków błędów; podana jest również wartość R^2 .

D. Reprezentatywność

Skuteczność testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0, w przypadku genotypów HCV oceniono poprzez (i) weryfikację granicy wykrywalności dla genotypów 1–6 oraz (ii) weryfikację zakresu liniowości dla genotypów 1–6.

Weryfikacja granicy wykrywalności dla genotypów 1–6

Kliniczne próbki RNA HCV dla 8 różnych genotypów/podtypów (1a, 1b, 2a, 2b, 3, 4, 5 i 6) zostały rozcieńczone w osoczu pobranym na EDTA lub surowicy do trzech różnych poziomów stężenia i przeprowadzono wyznaczanie odsetka trafień dla każdego poziomu w maksymalnie 70 powtórzeniach. Badanie przeprowadzono przy użyciu jednej serii odczynników testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0.

Wyniki uzyskane dla osocza pobranego na EDTA oraz surowicy, przedstawione odpowiednio w tabeli 4 i 5, wykazują, że test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0, wykrywał RNA HCV dla 8 różnych genotypów/podtypów w stężeniach 15 IU/ml lub wyższych ze wskaźnikiem dodatniości $\geq 95\%$. Różnice pomiędzy wynikami dla surowicy i osocza pobranego na EDTA nie były istotne statystycznie.

Tabela 4

Weryfikacja granicy wykrywalności dla genotypu RNA HCV w osoczu pobranym na EDTA

Genotyp	5 IU/ml			15 IU/ml			45 IU/ml		
	Liczba ważnych powtórzeń testu	Liczba wyników dodatnich	Odsetek trafień w %	Liczba ważnych powtórzeń testu	Liczba wyników dodatnich	Odsetek trafień w %	Liczba ważnych powtórzeń testu	Liczba wyników dodatnich	Odsetek trafień w %
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

Weryfikacja granicy wykrywalności dla genotypu RNA HCV w surowicy

Genotyp	5 IU/ml			15 IU/ml			45 IU/ml		
	Liczba ważnych powtórzeń testu	Liczba wyników dodatnich	Odsetek trafień w %	Liczba ważnych powtórzeń testu	Liczba wyników dodatnich	Odsetek trafień w %	Liczba ważnych powtórzeń testu	Liczba wyników dodatnich	Odsetek trafień w %
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

Weryfikacja zakresu liniowego dla genotypów 1–6

Kliniczne próbki wirusa HCV dla 8 różnych genotypów/podtypów (1a, 1b, 2a, 2b, 3, 4, 5 i 6) poddano testom w maksymalnie 22 poziomach stężenia. Panele te składały się z rozcieńczeń w osoczu pobranym na EDTA dodatknych próbek klinicznych RNA HCV dla dolnej i środkowej części zakresu dynamicznego oraz aRNA dla górnej części zakresu dynamicznego (genotypy 1a, 1b, 3 i 4 aż do górnej granicy oznaczalności) lub próbek całego zakresu dynamicznego (genotypy 2a, 2b, 5 i 6). Badanie wykonano przy użyciu jednej serii odczynników testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0. Wszystkie 22 elementy paneli poddano testom w 15 powtórzeniach.

Zakres liniowości testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0, zweryfikowano dla genotypów HCV 1–6 w zakresie od 13 IU RNA HCV/ml do co najmniej 1,4E+08 IU RNA HCV/ml, z uwzględnieniem dopuszczalnego bezwzględnego odchylenia od liniowości wynoszącego +/- 0,2 log₁₀.

E. Czułość diagnostyczna

Czułość diagnostyczną testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0, określono poprzez poddanie analizie pojedynczych dodatknych próbek RNA HCV osocza pobranego na EDTA lub surowicy (w sumie 488 wyników) z użyciem dwóch serii odczynników testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0. Wszystkie przebadane próbki wykazały dodatni wynik w kierunku RNA HCV. W tym panelu czułość diagnostyczna testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0, wynosi 100% (jednostronnie niższa granica 95% przedziału ufności: ≥ 99,4%).

F. Swoistość

Swoistość testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0, określono na podstawie analizy RNA HCV-ujemnych i seroujemnych próbek osocza pobranego na EDTA lub surowicy uzyskanych od krwiodawców. Pojedyncze próbki osocza pobranego na EDTA oraz surowicy (w sumie 600 wyników) poddano testom z użyciem dwóch serii odczynników testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0. Wszystkie przebadane próbki wykazały ujemny wynik w kierunku RNA HCV. W tym panelu swoistość testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0, wynosi 100% (jednostronnie niższa granica 95% przedziału ufności: ≥ 99,5%).

G. Swoistość analityczna

Swoistość analityczną testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0, oceniono poprzez rozcieńczenie roztworów podstawowych różnych patogenów o wysokim mianie (patrz tabela 6) za pomocą RNA HCV-dodatnich i RNA HCV-ujemnych próbek klinicznych osocza pobranych na EDTA. Żaden z patogenów innych niż wirus HCV nie wpłynął na działanie testu i nie spowodował uzyskania wyniku fałszywie dodatniego w teście COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0.

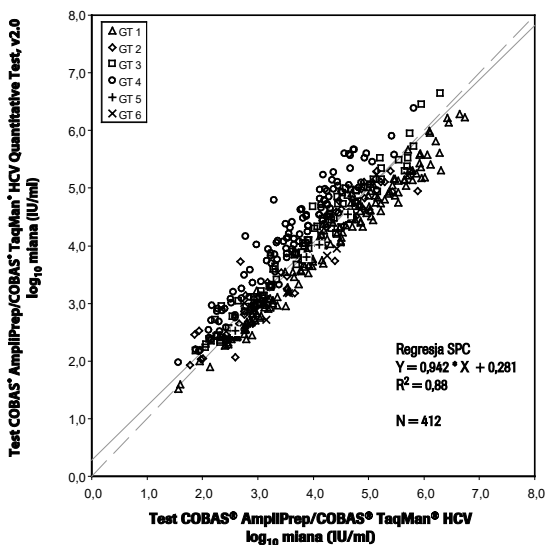
Tabela 6
Próbki użyte do oceny swoistości analitycznej

Flawiwirusy inne niż HCV Wirus gorączki Zachodniego Nilu Wirus zapalenia mózgu z St. Louis Wirus zapalenia mózgu z doliny Murray Wirus gorączki Denga typu 1, 2, 3 i 4 Wirus żółtej gorączki Wirus Zika Wirus kleszczowego zapalenia mózgu (szczep HYPR)	Wirusy Adenowirus typ 5 Wirus cytomegalii Wirus Epsteina-Barr Wirus zapalenia wątroby typu B Wirus zapalenia wątroby typu A HIV-1 Ludzki wirus T-limfotropowy typu 1 i 2 Ludzki wirus opryszczki typu 6 Wirus Herpes simplex typu 1 i 2 Wirus grypy typu A Wirus brodawczaka ludzkiego Wirus ospy wietrznej
Bakterie <i>Propionibacterium acnes</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	
Drożdżaki <i>Candida albicans</i>	

H. Skuteczność w porównaniu z testem COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV

Skuteczność testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0, i testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV porównano, analizując próbki (rozcieńczone i nierozcieńczone) surowicy i osocza pobranego na EDTA od pacjentów zakażonych wirusem HCV. W sumie 412 próbek osocza pobranego na EDTA i surowicy dla wszystkich genotypów uzyskało wynik ważny w przeprowadzonej podwójnie analizie i znalazło się w zakresie oznaczalności obu testów. Przeprowadzono regresję Deminga oraz analizę Blanda-Altmana. Wyniki regresji Deminga przedstawiono na rysunku 3.

Rysunek 3
Korelacja testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0,
oraz testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Test
(GT = genotyp)

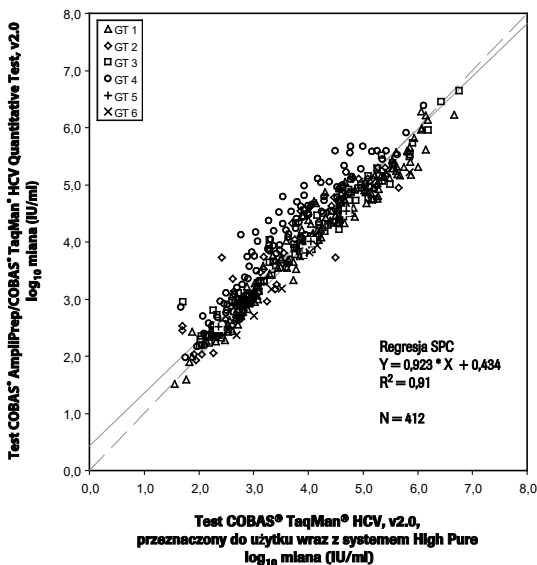


Przeprowadzono analizę regresji Deminga. Wartość współczynnika determinacji R^2 wyniosła 0,88 dla wszystkich próbek oraz 0,94, gdy z analizy wykluczono próbki dla genotypu 4. Po przeprowadzeniu analizy Blanda-Altmana korelacja wykazała średnią różnicę wartości $\log_{10}$ miana na poziomie 0,1 (analiza wszystkich próbek) lub -0,1 (wykluczenie próbek genotypu 4).

I. Skuteczność w porównaniu z testem COBAS® TaqMan® HCV, v2.0, przeznaczonym do stosowania w systemie High Pure

Skuteczność testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0, i testu COBAS® TaqMan® HCV, v2.0, przeznaczonego do stosowania w systemie High Pure porównano, analizując próbki surowicy i osocza pobranego na EDTA od pacjentów zarażonych wirusem HCV. W sumie 412 próbek osocza pobranego na EDTA i surowicy dla wszystkich genotypów uzyskało wynik ważny w przeprowadzonej podwójnie analizie i znalazło się w zakresie oznaczalności obu testów. Przeprowadzono regresję Deminga oraz analizę Blanda-Altmana. Wyniki regresji Deminga przedstawiono na rysunku 4.

Rysunek 4
Korelacja testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0, oraz testu COBAS® TaqMan® HCV, v2.0, przeznaczonego do stosowania w systemie High Pure
(GT = genotyp)



Wykonano analizę regresji Deminga. Wartość współczynnika determinacji R^2 wyniosła 0,91. Po przeprowadzeniu analizy Blanda-Altmana korelacja wykazała średnią różnicę wartości log₁₀ miana wynoszącą 0,1.

PIŚMIENICTWO

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, Benea 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.

Informacje dotyczące wersji dokumentu

Doc Rev. 3.0 (Mfg-US)
02/2019

Zaktualizowano numer notyfikowanej jednostki pod znakiem CE.
W razie jakichkolwiek pytań prosimy o kontakt z miejscowym
przedstawicielstwem firmy Roche.



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



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
Jaguare, Building 10
05321-010 São Paulo, SP Brazil

Znaki towarowe i patenty

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

©2019 Roche Molecular Systems, Inc.

02/2019

Doc Rev. 3.0 (Mfg-US)

07941692001-03



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116
68305 Mannheim
Germany



Na etykietach produktów diagnostycznych Roche PCR stosuje się obecnie następujące oznaczenia.



Oprogramowanie pomocnicze



Wyrób do diagnostyki *in vitro*



Autoryzowany Przedstawiciel we Wspólnocie Europejskiej



Dolna granica przypisanego zakresu



Arkusz kodów kreskowych



Wytwórca



Kod partii



Przechowywać z dala od światła



Zagrożenie biologiczne



Zawartość wystarczająca na <n> testów



Numer katalogowy



Przestrzegać zakresu temperatury



Sprawdź w instrukcji obsługi



Plik definicji testów



Zawartość zestawu



Górna granica przypisanego zakresu



Dystrybucja przez



Termin ważności



Wyłącznie do oceny działania w badaniach IVD



Numer pozycji handlu globalnego



Ten produkt spełnia wymogi dyrektywy Wspólnoty Europejskiej 98/79/WE dotyczącej diagnostycznych urządzeń medycznych do stosowania *in vitro*.