

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

PARA DIAGNÓSTICO *IN VITRO*.

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

HCVQLV2

72 Tests

P/N: 05480477 190

COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®
Wash Reagent

PG WR

5.1 Liters

P/N: 03587797 190

Tabla de contenido

USO PREVISTO	1
RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA	2
PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO	2
REACTIVOS	4
ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES DEL PROCEDIMIENTO	6
REQUISITOS DE ALMACENAMIENTO Y MANIPULACIÓN	7
MATERIALES SUMINISTRADOS	8
MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS	8
OBTENCIÓN, TRANSPORTE Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS	9
INSTRUCCIONES DE USO	9
CONTROL DE CALIDAD	12
RESULTADOS	13
LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO	14
SUSTANCIAS INTERFERENTES	15
EVALUACIÓN NO CLÍNICA DEL RENDIMIENTO	16
BIBLIOGRAFÍA	21

USO PREVISTO

La prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Qualitative v2.0 es una prueba de amplificación de ácidos nucleicos *in vitro* para la determinación cualitativa de los genotipos 1 a 6 del ARN del virus de la hepatitis C (HCV) en suero o plasma conservado en EDTA humano mediante el equipo COBAS® AmpliPrep para el procesamiento automatizado de muestras y el analizador COBAS® TaqMan® o el analizador COBAS® TaqMan® 48 para la amplificación y la detección automatizadas. La prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Qualitative v2.0 está indicada para pacientes que presentan evidencias clínicas y/o bioquímicas de hepatopatía y evidencias de anticuerpos de una infección por HCV, y de los que se sospecha que están infectados activamente por el HCV. La prueba se puede utilizar para confirmar las muestras positivas para los anticuerpos. La detección de ARN del HCV indica que el virus se reproduce y, por lo tanto, constituye una evidencia de infección activa.

La prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Qualitative v2.0 no está indicada para utilizarse como prueba de detección sistemática de la presencia del HCV en sangre o hemoderivados.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

Se considera que el HCV es el agente etiológico principal responsable del 90% al 95% de los casos de hepatitis post-transfusional¹⁻⁴. El HCV es un virus ARN monocatenario de sentido positivo con un genoma de aproximadamente 9.500 nucleótidos que codifican 3.000 aminoácidos. Como virus transportado en sangre, el HCV es transmisible a través de la sangre y los productos hemoderivados. La adopción más o menos generalizada de medidas de detección sistemática del HCV en sangre ha reducido de forma considerable el riesgo de hepatitis asociado a las transfusiones. La incidencia más alta de infección por HCV se asocia al abuso de drogas por vía intravenosa y, en menor medida, a otras exposiciones percutáneas⁴. La prevalencia mundial de la infección por HCV, determinada mediante métodos inmunoserológicos, varía del 0,6% en Canadá al 1,5% en Japón⁵. Las tasas de eliminación viral espontánea en individuos expuestos varían en gran medida; se observan porcentajes de entre el 10 y el 60%, según los datos clínicos obtenidos con relación a la normalización de las enzimas hepáticas y la eliminación de ARN del HCV en plasma⁶.

Las partículas víricas del HCV no se pueden cultivar a partir de muestras de sangre infectadas, por lo que la presencia de anticuerpos anti-HCV en los pacientes infectados con HCV ha conducido al desarrollo de ensayos inmunoserológicos específicos para dichos anticuerpos. Sin embargo, la presencia de anticuerpos anti-HCV es una medida de la exposición previa a la infección por HCV, pero no puede considerarse un marcador de la infección real. La medición de los niveles de alanina aminotransferasa (ALT) se considera un indicador sustituto de la infección por HCV, pero no se considera una medición directa de viremia.

Por el contrario, la detección de ARN del HCV mediante pruebas de ácidos nucleicos puede demostrar la existencia de una infección actual. El uso de pruebas de ácidos nucleicos permite detectar la viremia del HCV antes de la seroconversión inmunológica^{6,7}. Dado que las pruebas de ácidos nucleicos pueden detectar el ARN del HCV directamente, es decir, con independencia del estado del paciente, una prueba basada en ácidos nucleicos es valiosa para la detección de ARN del HCV en pacientes inmunocomprometidos⁸.

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

La prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Qualitative v2.0 es una prueba de amplificación de ácidos nucleicos para la detección del ARN del virus de la hepatitis C (HCV) en suero o plasma conservado en EDTA humano. La preparación de las muestras se realiza automáticamente mediante el equipo COBAS® AmpliPrep con amplificación y detección automáticas mediante el analizador COBAS® TaqMan® o el analizador COBAS® TaqMan® 48.

La prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Qualitative v2.0 se basa en tres procesos principales: (1) preparación de la muestra para aislar el ARN del HCV, (2) transcripción inversa del ARN objetivo para generar ADN complementario (ADNc), y (3) amplificación mediante PCR del ADNc objetivo y detección simultánea de sondas de detección oligonucleótidas doblemente marcadas, escindidas y específicas del fragmento objetivo.

Preparación de las muestras

La prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Qualitative v2.0 utiliza la preparación automatizada de la muestra en el equipo COBAS® AmpliPrep mediante una técnica de captura genérica basada en sílice. El volumen de introducción de la muestra es de 650 µl, mientras que el procedimiento procesa 500 µl de plasma conservado en EDTA o suero. Se lleva a cabo la lisis de las partículas víricas del HCV mediante incubación a alta temperatura con una proteasa y un tampón de lisis/unión caotrópico que libera los ácidos nucleicos y protege al ARN del HCV liberado de las RNasas presentes en el suero o el plasma conservado en EDTA. Junto con el reactivo de lisis y las micropartículas magnéticas, se introducen en cada muestra proteasa y un número conocido de moléculas de ARN del control interno (IC) del HCV. Posteriormente se incuba la mezcla, y el ARN del HCV y el ARN del IC del HCV quedan unidos a la superficie de las micropartículas magnéticas. Las sustancias no unidas, tales como sales, proteínas y otras impurezas celulares, se eliminan mediante el lavado de las micropartículas magnéticas. Tras la separación de las partículas y la completa realización de los pasos de lavado, los ácidos nucleicos absorbidos se eluyen a temperatura elevada con una solución acuosa. Se añade entonces la muestra procesada, que contiene el ARN del HCV y el ARN del IC del HCV liberados, a la mezcla de amplificación que se transfiere al analizador COBAS® TaqMan® o al analizador COBAS® TaqMan® 48.

Transcripción inversa y amplificación mediante PCR

La prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Qualitative v2.0 utiliza la transcripción inversa del ARN del HCV al ADN complementario (ADNc) y la amplificación del PCR del ADNc con cebadores (primers) que definen una secuencia en la región muy conservada de la región no traducida 5' del genoma del HCV⁹. Se ha optimizado la secuencia de nucleótidos de los cebadores para producir una amplificación comparable de los genotipos 1 a 6 del HCV. La transcripción inversa y la reacción de amplificación mediante PCR se lleva a cabo con una mezcla optimizada de enzimas recombinantes termoestables: las polimerasas de ADN Z05D y Z05. En presencia de manganeso (Mn^{2+}) y bajo condiciones de tampón apropiadas, Z05 y Z05D exhiben actividad tanto de transcriptasa inversa como de polimerasa de ADN. Esto permite que la transcripción inversa y la amplificación mediante PCR tengan lugar junto con la detección en tiempo real de los amplicones.

Las muestras procesadas se añaden a la mezcla de amplificación en tubos de amplificación (tubos K) donde se producen tanto la transcripción inversa como la amplificación mediante PCR. La mezcla de reacción se calienta para permitir que un cebador descendente hibride específicamente con el ARN objetivo del HCV y el ARN del IC del HCV. En presencia de Mn^{2+} y un exceso de desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs), entre los que se encuentran trifosfatos de desoxiadenosina, desoxiguanosina, desoxicitidina y desoxiuridina, las polimerasas Z05 y Z05D extienden los cebadores hibridados formando una cadena de ADN complementaria al ARN objetivo.

Amplificación del fragmento objetivo

Tras la transcripción inversa del ARN objetivo del HCV y el ARN del IC del HCV, el termociclador del analizador COBAS® TaqMan® o del analizador COBAS® TaqMan® 48 calienta la mezcla de reacción para desnaturalizar el híbrido ARN:ADNc y exponer las secuencias objetivo específicas del cebador. A medida que la mezcla se enfría, los cebadores hibridan con el ADNc del fragmento objetivo. Las polimerasas de ADN termoestables (Z05 y Z05D), en presencia de Mn^{2+} y un exceso de desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs), extienden los cebadores hibridados a lo largo de la plantilla objetivo para producir una molécula de ADN bicatenario denominada amplicón. El analizador COBAS® TaqMan® o el analizador COBAS® TaqMan® 48 repite automáticamente este proceso durante un número de ciclos predeterminado, con el fin de duplicar en cada ciclo la cantidad de ADN amplicón. El número de ciclos requerido se programa previamente en el analizador COBAS® TaqMan® o en el analizador COBAS® TaqMan® 48. La amplificación tiene lugar únicamente en la región del genoma del HCV situada entre los cebadores. No se amplifica el genoma entero del HCV.

Amplificación selectiva

La amplificación selectiva del ácido nucleico del fragmento objetivo de la muestra se logra en la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Qualitative v2.0 mediante el uso de la enzima AmpErase (uracil-N-glicosilasa) y el trifosfato de desoxiuridina (dUTP). La enzima AmpErase reconoce y cataliza la destrucción de las cadenas de ADN que contienen desoxiuridina¹⁰, pero no del ADN que contiene desoxitimidina. El ADN natural carece de desoxiuridina que, sin embargo, está siempre presente en el amplicón debido al uso de trifosfato de desoxiuridina como uno de los dNTPs del reactivo de la mezcla maestra; por lo tanto, sólo el amplicón contiene desoxiuridina. La desoxiuridina permite que la enzima AmpErase pueda destruir el amplicón contaminante antes de la amplificación del ADN del fragmento objetivo. Además, la enzima AmpErase destruye cualquier producto inespecífico que se pueda formar tras la activación inicial de la mezcla maestra por el manganeso. La enzima AmpErase, que se incluye en el reactivo de la mezcla maestra, cataliza la escisión del ADN que contiene desoxiuridina en la posición de los residuos de desoxiuridina abriendo la cadena de la desoxirribosa en la posición C1. Cuando se calienta en el primer paso de la ciclación térmica, la cadena de ADN amplicón se rompe en la posición de la desoxiuridina, por lo que el ADN ya no puede amplificarse. La enzima AmpErase permanece inactiva durante un período de tiempo prolongado una vez expuesta a temperaturas superiores a los 55 °C, es decir, durante los pasos de la ciclación térmica y, por consiguiente, no destruye el amplicón objetivo formado durante la reacción de PCR.

Detección de sondas escindidas y doblemente marcadas y determinación cualitativa del ARN del HCV

La prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Qualitative v2.0 utiliza la tecnología de PCR en tiempo real^{14,15}. El uso de sondas doblemente marcadas con fluorescente permite detectar en tiempo real la acumulación del producto de la PCR mediante la supervisión de la intensidad de emisión de los marcadores emisores fluorescentes liberada durante el proceso de amplificación. Las sondas constan de sondas oligonucleótidas específicas para el HCV y el IC del HCV con un marcador emisor (reporter dye) y un marcador silenciador (quencher dye). En la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Qualitative v2.0, las sondas del HCV y del IC del HCV están marcadas con diferentes marcadores emisores fluorescentes. Cuando las sondas están intactas, la proximidad del marcador silenciador suprime la fluorescencia del marcador emisor debido a efectos de transferencia de energía de tipo Förster. Durante la PCR, la sonda se hibrida con una secuencia del fragmento objetivo y se escinde por la actividad de las nucleasas 5' → 3' de las polimerasas de ADN Z05 y Z05D termoestables. Cuando se han liberado y separado el marcador emisor y el marcador silenciador, cesa el enmascaramiento (quenching) y la actividad fluorescente del marcador emisor experimenta un aumento. La amplificación del ARN del HCV y el ARN del IC del HCV se miden de forma independiente a distintas longitudes de onda. Este proceso se repite durante un número de ciclos predeterminado, aumentando en cada ciclo la intensidad de emisión de los marcadores emisores individuales, lo que permite la identificación independiente del ARN del HCV y el IC del HCV.

En los procesos de amplificación de los ácidos nucleicos, algunos inhibidores que pueden estar presentes en la muestra pueden reducir la eficacia. Se ha añadido el IC del HCV a la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Qualitative v2.0 para permitir la identificación de muestras procesadas que contienen sustancias que pueden interferir con la amplificación de la PCR. El IC del HCV es un constructo de Armored RNA (aRNA) no infeccioso que contiene fragmentos de las secuencias del HCV con sitios de unión a cebadores idénticos a los del ARN objetivo del HCV y una región exclusiva de unión a sonda que permite diferenciar el amplión del IC del HCV del amplión del HCV objetivo. Sirve como control de extracción y amplificación de cada muestra procesada independientemente.

Durante la fase de hibridación de la PCR en el analizador COBAS® TaqMan® o en el analizador COBAS® TaqMan® 48, las muestras se iluminan y excitan con luz filtrada, lo que permite recoger los datos de emisión de fluorescencia filtrada correspondientes a cada muestra. Las lecturas obtenidas para cada muestra se corrigen entonces para compensar fluctuaciones instrumentales. El equipo envía esas lecturas de fluorescencia al programa AMPLILINK y las almacena en una base de datos. Se utilizan comprobaciones previas para determinar si los datos de ARN del HCV y ARN del IC del HCV constituyen conjuntos válidos; asimismo, se generan avisos cuando los datos estén fuera de límites prefijados. Una vez completadas y superadas todas las comprobaciones previas, las lecturas de fluorescencia se procesan para generar valores de Ct correspondientes al ARN del HCV y el ARN del IC del HCV. Los resultados se muestran como positivos o negativos.

REACTIVOS

**COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV
Qualitative Test, v2.0**
(P/N: 05480477 190)

HCVQLV2

72 pruebas

HCV QL v2.0 CS1

(Casete de reactivo de micropartículas magnéticas para HCV)

Micropartículas magnéticas

Tampón Tris

0,09% de azida sódica

0,1% de metilparabén

1 x 72 pruebas

1 x 7,0 ml

HCV QL v2.0 CS2

(Casete de reactivos de lisis para HCV)

Citrato de sodio dihidratado

42,5% de tiocianato de guanidina

< 6% de polidocanol

0,9% de ditiotretol

1 x 72 pruebas

1 x 78,0 ml

HCV QL v2.0 CS3

1 x 72 pruebas

Casete de multireactivos para HCV, que contiene:

Pase

1 x 3,8 ml

(Solución de proteinasa)

Tampón Tris
< 0,05% de EDTA
Cloruro de calcio
Acetato de calcio
- 7,8% de proteinasa
Glicerol

EB

1 x 8,1 ml

(Tampón de elución)

Tampón Tris-base
0,09% de azida sódica

HCV QL v2.0 CS4

1 x 72 pruebas

Casete de reactivos específico para la prueba HCV, que contiene:

IC

1 x 3,6 ml

(Control interno HCV)

Tampón Tris
EDTA
< 0,002% de ARN poli Ar (sintético)
< 0,001% de constructo de Armored RNA del HCV que contiene
secuencias de unión al cebador del HCV y una región
exclusiva de unión a sonda (ARN no infeccioso en
bacteriófago MS2)
0,05% de azida sódica

MMX

1 x 3,5 ml

(Mezcla maestra para HCV)

Tampón tricina
Acetato de potasio
Hidróxido potásico
< 20% de sulfóxido de dimetilo
Glicerol
< 0,004% de dATP, dCTP, dGTP y dUTP
< 0,002% de cebadores del HCV ascendentes y descendentes
para la región 5' UTR del HCV
< 0,001% de sondas oligonucleótidas marcadas con fluorescente
específicas para el HCV y el control interno del HCV
< 0,001% de aptámero oligonucleótido
< 0,05% de polimerasa de ADN Z05 y Z05D (microbiana)
< 0,1% de enzima AmpErase (uracil-N-glicosilasa) (microbiana)
0,09% de azida sódica

Mn²⁺

1 x 19,8 ml

(Solución de manganeso para COBAS[®] AmpliPrep/COBAS[®] TaqMan[®])

< 0,5% de acetato de manganeso
Ácido acético glacial
0,09% de azida sódica

HCV (+) C, v2.0

6 x 0,85 ml

(Control positivo del HCV)

< 0,001% de constructo de Armored HCV RNA con secuencias de HCV
(ARN no infeccioso en bacteriófago MS2)

Plasma humano negativo, no reactivo según pruebas para anticuerpos
frente al HCV, anticuerpos frente al HIV-1/2, antígeno p24 del HIV y
HBsAg; ARN de HIV-1, ARN de HCV y ADN de HBV no detectables
mediante métodos de PCR

0,1% de conservante ProClin[®] 300

CTM (-) C

6 x 1,0 ml

[Control negativo de COBAS® TaqMan® (plasma humano)]

Plasma humano negativo, no reactivo según pruebas para anticuerpos frente al HCV, anticuerpos frente al HIV-1/2, antígeno p24 del HIV y HBsAg; ARN de HIV-1, ARN de HCV y ADN de HBV no detectables mediante métodos de PCR

0,1% de conservante ProClin® 300

HCV (+) C, v2.0 Clip

1 x 6 clips

(Clip de código de barras para control positivo del HCV)

HCV (-) C, v2.0 Clip

1 x 6 clips

(Clip de código de barras para control negativo del HCV)

COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® Wash Reagent**PG WR**

1 x 5,1 l

Reactivo de lavado COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®
(P/N: 03587797 190)

PG WR

(Reactivo de lavado COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®)

Citrato de sodio dihidratado

< 0,1% de N-metilisotiazolona-HCl

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES DEL PROCEDIMIENTO

Como sucede con cualquier procedimiento analítico, resulta esencial aplicar una técnica adecuada de laboratorio para obtener un rendimiento correcto del ensayo. Debido a la elevada sensibilidad de esta prueba, deben extremarse las precauciones para evitar cualquier tipo de contaminación de los reactivos y las mezclas de amplificación.

- A. PARA DIAGNÓSTICO *IN VITRO*.
- B. Esta prueba está diseñada para su uso con plasma o suero humano recogido en anticoagulante EDTA.
- C. No pipetee con la boca.
- D. No se debe comer, beber ni fumar en las áreas de trabajo del laboratorio. Utilice guantes desechables, batas de laboratorio y protección ocular para manipular las muestras o los reactivos del kit. Lávese bien las manos después de manipular las muestras y los reactivos de las pruebas.
- E. Evite la contaminación microbiana y con ribonucleasa de los reactivos cuando extraiga alícuotas de los viales de control.
- F. Se recomienda el uso de pipetas estériles desechables con puntas exentas de ribonucleasa.
- G. No mezcle controles de distintos lotes o de distintos viales de un mismo lote.
- H. No mezcle casetes de reactivos o controles de distintos kits.
- I. No abra los casetes COBAS® AmpliPrep ni cambie, mezcle, retire o añada botellas.
- J. Elimine los reactivos no utilizados así como los desechos y las muestras según las reglamentaciones nacionales, federales, estatales y locales.
- K. No utilice los kit con posterioridad a la fecha de caducidad.
- L. Puede solicitar Hojas de Datos de Seguridad (Safety Data Sheets, SDS) en las oficinas locales de Roche.

- M. Las muestras y los controles deben tratarse como si fueran infecciosos, utilizando procedimientos de seguridad de laboratorio como los descritos en la publicación *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*¹¹ y en el documento M29-A3 del CLSI¹². Limpie y desinfecte minuciosamente todas las superficies de trabajo con una solución recién preparada de hipoclorito de sodio al 0,5% de agua destilada o desionizada.
- N. Los controles **CTM (-) C** y **HCV (+) C, v2.0** contienen plasma humano derivado de sangre humana. El material de origen ha sido probado con resultado no reactivo para la presencia de antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg), anticuerpos frente al HIV-1/2 y al HCV, y antígeno p24 del HIV. En ensayos del plasma humano negativo mediante métodos PCR, no se detectó ARN del HIV-1, ARN del HCV ni ADN del HBV. Ningún método de prueba conocido puede garantizar totalmente que un producto derivado de la sangre humana no transmitirá agentes infecciosos. Por lo tanto, cualquier material de procedencia humana, como los controles **CTM (-) C** y **HCV (+) C, v2.0**, debería considerarse potencialmente infeccioso.
- O. Los reactivos **MGP, EB, IC, Mn²⁺** y **MMX** contienen azida sódica. La azida sódica puede reaccionar con las tuberías de plomo o cobre y formar azidas metálicas muy explosivas. Al desechar soluciones que contengan azida sódica por los fregaderos del laboratorio, deje correr grandes cantidades de agua por el desagüe para evitar la acumulación de azidas.
- P. Deben usarse guantes desechables, batas de laboratorio y protección ocular cuando se manipule cualquier reactivo. Evite el contacto de estos materiales con la piel, los ojos o las membranas mucosas. En caso de contacto, lave inmediatamente la zona afectada con abundante agua. Pueden producirse quemaduras si se deja sin tratar. Si se derrama alguno de estos reactivos, dilúyalo con agua antes de limpiarlo con un paño.
- Q. No permita que el reactivo **HCV QL v2.0 CS2** ni los residuos líquidos como las cubetas de reacción (SPU) usadas COBAS® AmpliPrep del equipo COBAS® AmpliPrep, que contienen tiocianato de guanidina, entren en contacto con la solución de hipoclorito de sodio (lejía). Tales mezclas pueden producir gases muy tóxicos.

REQUISITOS DE ALMACENAMIENTO Y MANIPULACIÓN

- A. Antes de utilizarlos, revise cada casete y vial de reactivo para asegurarse de que no hay signos de fugas. No utilice el material si hay alguna evidencia de fuga.
- B. Almacene los reactivos **HCV QL v2.0 CS1, HCV QL v2.0 CS2, HCV QL v2.0 CS3** y **HCV QL v2.0 CS4** a una temperatura comprendida entre 2 y 8 °C. Si no se utilizan, estos reactivos se mantienen estables hasta la fecha de caducidad indicada. Una vez usados, los reactivos permanecen estables durante 70 días a una temperatura comprendida entre 2 y 8 °C o hasta la fecha de caducidad, lo que se produzca primero. Los reactivos **HCV QL v2.0 CS1, HCV QL v2.0 CS2, HCV QL v2.0 CS3** y **HCV QL v2.0 CS4** se pueden utilizar hasta acumular un máximo de 96 horas en el equipo COBAS® AmpliPrep. Entre ciclos instrumentales, deben almacenarse a una temperatura comprendida entre 2 y 8 °C.
- C. Almacene los controles **HCV (+) C, v2.0** y **CTM (-) C** a una temperatura comprendida entre 2 y 8 °C. Los controles se mantienen estables hasta la fecha de caducidad indicada. Una vez abiertos, deben desecharse las partes sobrantes.
- D. Almacene los clips de código de barras [**HCV (+) C, v2.0 Clip** y **HCV (-) C, v2.0 Clip**] a una temperatura comprendida entre 2 y 30 °C.
- E. Almacene el reactivo **PG WR** a una temperatura comprendida entre 2 y 30 °C. Si no se utiliza, el **PG WR** es estable hasta la fecha de caducidad indicada. Una vez abierto, el reactivo se mantiene estable durante 28 días a una temperatura comprendida entre 2 y 30 °C o hasta su fecha de caducidad, lo que se produzca primero.

MATERIALES SUMINISTRADOS

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

HCVQLV2

HCV QL v2.0 CS1

(Casete de reactivo de micropartículas magnéticas para HCV)

HCV QL v2.0 CS2

(Casete de reactivos de lisis para HCV)

HCV QL v2.0 CS3

(Casete de multireactivos para HCV)

HCV QL v2.0 CS4

(Casete de reactivos específico para la prueba HCV)

HCV (+) C, v2.0

(Control positivo para el HCV)

CTM (-) C

[Control negativo de COBAS® TaqMan® (plasma humano)]

HCV (+) C, v2.0 Clip

(Clip de código de barras para control positivo del HCV)

HCV (-) C, v2.0 Clip

(Clip de código de barras para control negativo del HCV)

COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® Wash Reagent

Reactivo de lavado COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®

PG WR

PG WR

(Reactivo de lavado COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®)

MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

Instrumentos y software

- Equipo COBAS® AmpliPrep
- Analizador COBAS® TaqMan® o analizador COBAS® TaqMan® 48
- Docking Station (opcional)
- Equipo **cobas p** 630 (opcional)
- Programa AMPLILINK versión 3.3 o versión 3.4 Series
- Unidad de control para el programa AMPLILINK, con impresora
- Manuales de equipo y software:
 - Manual del equipo COBAS® AmpliPrep para su uso con el programa AMPLILINK versión 3.3 y 3.4 Series
 - Manual del equipo del analizador COBAS® TaqMan® para su uso con el programa AMPLILINK versión 3.3 y 3.4 Series
 - Manual del equipo del analizador COBAS® TaqMan® 48 para su uso con el programa AMPLILINK versión 3.3 y 3.4 Series
 - Manual de aplicaciones del programa AMPLILINK versión 3.3 Series para uso con el equipo COBAS® AmpliPrep, el analizador COBAS® TaqMan®, el analizador COBAS® TaqMan® 48, el analizador COBAS® AMPLICOR y el equipo **cobas p** 630
- O
- Manual de aplicaciones del programa AMPLILINK versión 3.4 Series
- Opcional: Manual de usuario del equipo **cobas p** 630, versión del programa 2.2

- Archivo de definiciones de pruebas (TDF). Consulte la tarjeta de información del producto del kit para conocer el nombre y la versión actual del TDF.

Otros materiales

- Bandeja de muestras (bandeja de 24 tubos SK)
- Bandeja de reactivos
- Bandeja de SPU
- K-carrier
- Transportador de K-carrier
- Bandeja de K-carrier
- Pipeteadores con puntas exentas de RNasa con filtro para aerosol o desplazamiento positivo (con capacidad de 1.000 µl). La precisión de las pipetas debe estar dentro del 3% del volumen indicado. Para evitar la contaminación cruzada de la muestra y el amplicón, deben usarse puntas exentas de ribonucleasa con filtro para aerosol o desplazamiento positivo.
- Guantes desechables sin talco
- Agitador vórtex

Consumibles

- Cubetas de reacción (SPU)
- Tubo para introducción de muestras (tubos S) con clip de código de barras
- Bandeja de puntas K
- Caja de tubos K, 12 x 96

OBTENCIÓN, TRANSPORTE Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

NOTA: *manipule todas las muestras y los controles como si pudieran transmitir agentes infecciosos.*

Obtención y almacenamiento de las muestras

La prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Qualitative v2.0 ha sido concebida para su uso con muestras de suero o plasma conservado en EDTA. La sangre debería recogerse en tubos de separación de suero SST®, en tubos para preparación de plasma BD Vacutainer® PPT™ para métodos de pruebas de diagnóstico molecular o en tubos estériles y utilizar EDTA (tapón lavanda) como anticoagulante. Siga las instrucciones del fabricante para la manipulación de tubos de recogida. Las muestras recién obtenidas (sangre total) se pueden almacenar a una temperatura de entre 2 y 25 °C durante un máximo de 24 horas antes de la centrifugación. Después de la centrifugación, transfiera el suero o plasma conservado en EDTA a un tubo de polipropileno estéril. Se recomienda almacenar las muestras en alícuotas de un volumen aproximado de 1.000 µl en tubos de polipropileno estériles de 2,0 ml con tapón de rosca (tales como los microtubos con tapón de rosca de 2 ml de Sarstedt). Las muestras de suero o plasma conservado en EDTA se pueden almacenar:

- Entre 2 y 8 °C durante un máximo de 72 horas
- Entre -20 °C y -80 °C durante un máximo de 6 semanas

Las muestras de suero y plasma conservado en EDTA se pueden congelar y descongelar hasta cinco veces sin que haya una pérdida del ARN del HCV.

Transporte de las muestras

El transporte de sangre total, suero o plasma conservado en EDTA debe cumplir las reglamentaciones locales, estatales, federales y nacionales para el transporte de agentes etiológicos¹³. La sangre total debe transportarse a una temperatura comprendida entre 2 y 25 °C y procesarse dentro de las 24 horas siguientes a su extracción. El suero o plasma conservado en EDTA pueden transportarse a una temperatura comprendida entre 2 y 8 °C o congelarse a una temperatura entre -20 °C y -80 °C.

INSTRUCCIONES DE USO

Para obtener instrucciones detalladas sobre el funcionamiento, una descripción precisa de las configuraciones posibles, la impresión de los resultados y la interpretación de los avisos, comentarios y mensajes de error, consulte los manuales del programa AMPLILINK versión 3.3 o versión 3.4 Series que se especifican en el apartado "Instrumentos y software".

Tamaño de lotes y flujo de trabajo

Cada kit contiene reactivos suficientes para 72 pruebas, que pueden realizarse en lotes de 12 a 24 pruebas. En cada lote debe incluirse como mínimo uno de cada uno los controles [CTM (-) C y HCV (-) C, v2.0] (consulte el apartado "Control de calidad"). La serie se debe iniciar en el analizador COBAS® TaqMan® o en el analizador COBAS® TaqMan® 48 durante los 120 minutos posteriores a la finalización de la preparación de las muestras y los controles. NO CONGELE ni ALMACENE muestras o controles procesados a una temperatura comprendida entre 2 y 8 °C.

Preparación de las muestras y los controles

Si utiliza muestras congeladas, déjelas a temperatura ambiente hasta conseguir su completa descongelación y agítelas durante 3-5 segundos antes de usarlas. Los controles se deben extraer del almacenamiento de 2 a 8 °C, llevar a temperatura ambiente y agitar durante 3-5 segundos antes de usarlos.

Configuración del equipo COBAS® AmpliPrep

Parte A. Mantenimiento y cebado

- A1. El equipo COBAS® AmpliPrep está listo para su funcionamiento en modo Stand-by.
- A2. Encienda la unidad de control del programa AMPLILINK (**ON**). Prepárela tal como se indica a continuación:
 1. Inicie una sesión en el sistema operativo Microsoft Windows.
 2. Haga doble clic sobre el icono del programa AMPLILINK.
 3. Inicie una sesión en el programa AMPLILINK introduciendo el identificador de usuario y la contraseña asignados.
- A3. Compruebe el suministro de **PG WR** en la pantalla **Status** y repóngalo en caso necesario.
- A4. Lleve a cabo todas las tareas de mantenimiento que aparecen en la pestaña **Due**. El equipo COBAS® AmpliPrep procederá automáticamente al cebado del sistema.

Parte B. Carga de casetes de reactivos

NOTA: *todos los casetes de reactivos se deben extraer de su lugar de almacenamiento a una temperatura comprendida entre 2 y 8 °C para cargarlos inmediatamente en el equipo COBAS® AmpliPrep y dejar que alcancen el equilibrio con la temperatura ambiente en el equipo durante al menos 30 minutos antes de proceder con el procesamiento de la primera muestra. No permita que los casetes de reactivos alcancen la temperatura ambiente fuera del equipo, ya que podría formarse condensación en las etiquetas de código de barras. En caso de aparecer condensación en las etiquetas de código de barras, no trate de eliminarla con un paño.*

- B1. Coloque **HCV QL v2.0 CS1** en una bandeja de reactivos. Coloque **HCV QL v2.0 CS2**, **HCV QL v2.0 CS3** y **HCV QL v2.0 CS4** en una bandeja de reactivos distinta.
- B2. Cargue la bandeja de reactivos que contiene **HCV QL v2.0 CS1** en la posición para bandejas **A** del equipo COBAS® AmpliPrep.
- B3. Cargue la bandeja de reactivos que contiene **HCV QL v2.0 CS2**, **HCV QL v2.0 CS3** y **HCV QL v2.0 CS4** en la posición para bandejas **B**, **C**, **D** o **E** del equipo COBAS® AmpliPrep (para obtener información adicional y detallada, consulte los manuales del equipo apropiados).

Parte C. Carga de consumibles

NOTA: *determine el número de casetes de reactivos COBAS® AmpliPrep, cubetas de reacción (SPU), tubos de muestras (tubos S), puntas K y tubos K necesarios. Se necesita una SPU, un tubo S de entrada, una punta K y un tubo K por cada muestra o control.*

Hay múltiples configuraciones posibles de uso del equipo COBAS® AmpliPrep con el analizador COBAS® TaqMan® o el analizador COBAS® TaqMan® 48. Según la configuración utilizada, cargue el número apropiado de bandejas de casetes de reactivos, bandejas de muestras con tubos S de entrada, bandejas de SPU, bandejas de puntas K, bandejas de tubos K y K-carrier en las bandejas de K-carrier en las respectivas posiciones de bandeja del equipo COBAS® AmpliPrep.

1. Coloque las SPU en las bandejas de SPU y cargue las bandejas en la posición para bandejas **J, K o L** del equipo COBAS® AmpliPrep.
2. Según la configuración utilizada, cargue las bandejas llenas de tubos K en la posición para bandejas **M, N, O o P** del equipo COBAS® AmpliPrep.
3. Cargue las bandejas llenas de puntas K en la posición para bandejas **M, N, O o P** del equipo COBAS® AmpliPrep.
4. Según la configuración utilizada, cargue los K-carrier en las bandejas de K-carrier en la posición para bandejas **M, N, O o P** del equipo COBAS® AmpliPrep.

Parte D. Peticiones y carga de muestras

1. Prepare las bandejas de muestras tal y como se indica a continuación: coloque un clip de etiqueta de código de barras en cada posición de la bandeja de muestras donde se vaya a colocar una muestra (en tubo S). Coloque uno de los clips de etiqueta de código de barras específicos para los controles **[CTM (-) C y HCV (+) C, v2.0]** en cada posición de la bandeja de muestras donde se vayan a colocar los controles (en tubo S). Los clips de etiqueta de código de barras de los controles deben tener el mismo número de lote de control que los viales de control incluidos en el kit. Preste atención para asignar cada control correctamente en posición con el clip con código de barras apropiado. Coloque un tubo S de entrada en cada posición que contenga un clip de etiqueta de código de barras.
2. Con el programa AMPLILINK, cree peticiones de muestra para cada muestra y control de la pestaña **Sample** de la ventana **Orders**. Seleccione el archivo de pruebas adecuado y guarde la información.
3. Asigne las peticiones de muestras y controles en las posiciones de bandeja de muestras en la pestaña **Sample Rack** de la ventana **Orders**. El número de bandeja de muestras debe corresponder a la bandeja preparada en el paso D1.
4. Imprima el informe **Sample Rack Order** para usarlo como hoja de trabajo.
5. Prepare las bandejas de muestras y controles en el área designada para la adición de muestras y controles, tal y como se indica a continuación: someta al agitador vórtex cada una de las muestras y los controles **[CTM (-) C y HCV (+) C, v2.0]** durante 3-5 segundos. Evite la contaminación de los guantes durante la manipulación de las muestras y los controles.
6. Transfiera 650 µl de cada muestra y control **[CTM (-) C y HCV (+) C, v2.0]** al tubo S de entrada con la etiqueta de código de barras apropiada utilizando para ello un micropipeteador con filtro para aerosol o punta exenta de RNasa con desplazamiento positivo. **Evite la transferencia de partículas o coágulos de fibrina que pudieran estar presentes en la muestra original al tubo S de entrada.** Las muestras y los controles se deben transferir a las posiciones de tubo asignadas y registradas en la hoja de trabajo en el paso D4. Los clips de etiqueta de código de barras de los controles deben tener el mismo número de lote de control que los viales de control incluidos en el kit. Asigne cada control correctamente a la posición que tenga el clip con código de barras apropiado. **Evite la contaminación de la parte superior de los tubos S con muestras o controles.**
7. Si utiliza el equipo **cobas p 630** para la preparación de muestras, consulte el Manual de usuario del equipo **cobas p 630**.
8. Según la configuración utilizada, cargue las bandejas de muestras llenas de tubos S de entrada en las posiciones de bandeja **F, G o H** del equipo COBAS® AmpliPrep.

D9. Según la configuración utilizada, cargue las bandejas de muestras con tubos S de entrada o tubos K (uno por cada tubo S de entrada, cargados en la posición derecha adyacente a los tubos S de entrada) en la posición de bandeja **F, G o H** del equipo COBAS® AmpliPrep.

Parte E. Inicio de la serie en el equipo COBAS® AmpliPrep

E1. Inicie el equipo COBAS® AmpliPrep mediante el programa AMPLILINK.

Parte F. Finalización de la serie en el equipo COBAS® AmpliPrep y transferencia al analizador COBAS® TaqMan® o al analizador COBAS® TaqMan® 48 (sólo para la transferencia manual)

F1. Compruebe si hay algún aviso o mensaje de error.

F2. Retire las muestras y los controles procesados del equipo COBAS® AmpliPrep, bien en bandejas de muestras (para el analizador COBAS® TaqMan® sin Docking Station), o en bandejas de K-carrier (para el analizador COBAS® TaqMan® 48), en función de la configuración.

F3. Elimine los residuos del equipo COBAS® AmpliPrep.

NOTA: no se pueden exponer a la luz las muestras ni los controles procesados tras completarse la preparación de muestras y controles.

Amplificación y detección

Configuración del analizador COBAS® TaqMan® o analizador COBAS® TaqMan® 48

La serie se debe iniciar en el analizador COBAS® TaqMan® o en el analizador COBAS® TaqMan® 48 durante los 120 minutos posteriores a la finalización de la preparación de las muestras y los controles. **NO CONGELE** ni **ALMACENE** muestras o controles procesados a una temperatura comprendida entre 2 y 8 °C.

Parte G. Carga de muestras procesadas

G1. Según la configuración del equipo, lleve a cabo los pasos apropiados para transferir los tubos K al analizador COBAS® TaqMan® o al analizador COBAS® TaqMan® 48.

Parte H. Inicio de la serie en el analizador COBAS® TaqMan® o en el analizador COBAS® TaqMan® 48

H1. Inicie el analizador COBAS® TaqMan® o el analizador COBAS® TaqMan® 48 según la configuración utilizada.

Parte I. Finalización de la serie en el analizador COBAS® TaqMan® o en el analizador COBAS® TaqMan® 48

I1. Una vez completada la serie en el analizador COBAS® TaqMan® o en el analizador COBAS® TaqMan® 48, imprima el informe de resultados. Compruebe si hay algún aviso o mensaje de error en el informe de resultados. Los resultados obtenidos para muestras con avisos y comentarios se interpretan tal como se describe en el apartado "Resultados". Una vez aceptados los datos, guárdelos en un archivo.

I2. Retire los tubos K usados del analizador COBAS® TaqMan® o el analizador COBAS® TaqMan® 48.

CONTROL DE CALIDAD

En cada lote de pruebas debe incluirse un control negativo de COBAS® TaqMan® y un control positivo de HCV. El lote se considera válido cuando no aparece ningún aviso para los controles [**HCV (+) C, v2.0 y CTM (-) C**].

No hay requisitos relacionados con la posición de los controles en la bandeja de muestras.

Compruebe la impresión de avisos y comentarios del lote para asegurarse de que el lote es válido.

Control negativo

El control **CTM (-) C** debe dar un resultado "Negative". Si el resultado obtenido para **CTM (-) C** está marcado como no válido, se considerará no válida la totalidad del lote. Repita todo el proceso (preparación, amplificación y detección de muestras y controles). Si el resultado obtenido para **CTM (-) C** es repetidamente no válido en múltiples lotes, póngase en contacto con su oficina local de Roche para recibir asistencia técnica.

Control positivo

El control **HCV (+) C, v2.0** debe dar un resultado "Positive". Si el resultado obtenido para **HCV (+) C, v2.0** está marcado como no válido, se considerará no válida la totalidad del lote. Repita todo el proceso (preparación, amplificación y detección de muestras y controles). Si el resultado obtenido para **HCV (+) C, v2.0** es repetidamente no válido en múltiples lotes, póngase en contacto con su oficina local de Roche para recibir asistencia técnica.

RESULTADOS

El analizador COBAS® TaqMan® o el analizador COBAS® TaqMan® 48 determina automáticamente la presencia de ARN del HCV en las muestras y los controles.

El programa AMPLILINK:

- Determina el valor de Ct para el ARN del HCV y el ARN del IC del HCV.
- Determina la presencia de ARN del HCV y de ARN del IC del HCV en función de los valores de Ct del ARN del HCV y del ARN del IC del HCV.

Validación de lotes:

Compruebe los posibles avisos y comentarios en la ventana de resultados del programa AMPLILINK o la impresión de resultados para asegurarse de que el lote es válido.

Para peticiones de controles, se realiza una comprobación para determinar si el valor de Ct correspondiente al control está dentro del intervalo especificado. Si el valor de Ct correspondiente al control está fuera del intervalo asignado, se genera un aviso para indicar que el control no ha superado la prueba.

El lote se considera válido cuando no aparece ningún aviso para los controles [**HCV (+) C, v2.0** y **CTM (-) C**].

El lote no es válido si aparece cualquiera de los avisos siguientes para los controles del HCV:

Control negativo:

Aviso	Resultado	Interpretación
NC_INVALID	Invalid	Un resultado no válido o el resultado del control negativo no es negativo.

Control positivo del HCV:

Aviso	Resultado	Interpretación
PC_INVALID	Invalid	Un resultado no válido o el resultado del control positivo no es positivo.

Si el lote no es válido, repita todo el lote incluyendo los pasos de preparación, transcripción reversa, amplificación y detección de las muestras y los controles.

Interpretación de los resultados:

Para lotes válidos, compruebe los posibles avisos o comentarios asociados a cada muestra en la impresión de los resultados.

⇒ Un lote válido puede incluir resultados de muestras tanto válidos como no válidos según los avisos y/o comentarios asociados con cada una de las muestras.

Los resultados de las muestras se interpretan como se indica a continuación:

Resultado	Interpretación
Negative	El valor de Ct para el HCV está por encima del límite para el ensayo o no se ha obtenido un valor de Ct para el HCV. Comunique el resultado como "ARN del HCV no detectado".
Positive	Comunique el resultado como "ARN del HCV detectado".

Si el elemento que aparece como resultado de la muestra es "Failed", "Invalid" o "Aborted", consulte el Manual de aplicaciones del programa AMPLILINK versión 3.3 o versión 3.4 Series especificado en el apartado "Materiales necesarios no suministrados".

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1. Esta prueba se ha validado únicamente para su uso con suero o plasma humano recogido en anticoagulante EDTA. La realización de la prueba en otros tipos de muestras puede dar lugar a resultados inexactos.
2. Aunque es poco probable, las mutaciones en las regiones muy conservadas del genoma vírico cubiertas por los cebadores y/o las sondas de la prueba pueden causar errores en la detección del virus.
3. La detección del ARN del HCV depende del número de partículas víricas presentes en la muestra y se puede ver afectada por los métodos de obtención de las mismas, factores propios del paciente (como la edad o la presencia de síntomas) y/o la fase de infección.
4. La obtención de resultados fiables depende de que los procedimientos de obtención, transporte y almacenamiento de las muestras, así como su procesamiento, sean adecuados.
5. La presencia de la enzima AmpErase en la mezcla maestra de COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV reduce el riesgo de contaminación del amplicón. No obstante, la contaminación procedente de controles y muestras clínicas positivas para HCV sólo puede evitarse mediante la utilización de buenas prácticas de laboratorio y la estricta adhesión a los procedimientos especificados en este prospecto.
6. El uso de este producto debe limitarse al personal con formación en el funcionamiento del equipo **cobas p 630** (opcional), el equipo COBAS® AmpliPrep y el analizador COBAS® TaqMan® o el analizador COBAS® TaqMan® 48. El usuario debe contar con un conocimiento avanzado de las aplicaciones que se ejecutan en los equipos y debe seguir buenas prácticas de laboratorio.
7. Este producto sólo se puede utilizar con el equipo **cobas p 630** (opcional), el equipo COBAS® AmpliPrep y el analizador COBAS® TaqMan® o el analizador COBAS® TaqMan® 48.
8. Debido a las diferencias específicas entre tecnologías, se recomienda a los usuarios que, antes de cambiar de una a otra, realicen estudios de correlación en el laboratorio para evaluar las diferencias tecnológicas.

SUSTANCIAS INTERFERENTES

Los niveles elevados de triglicéridos (3.300 mg/dl), la bilirrubina conjugada (25 mg/dl) y la bilirrubina no conjugada (20 mg/dl), la albúmina (6.000 mg/dl), la hemoglobina (200 mg/dl) y el ADN humano (40 mg/dl) en las muestras, así como la presencia de enfermedades autoinmunes como lupus eritematoso sistémico (LES), artritis reumatoide (AR) o anticuerpos antinucleares (ANA) no interfieren en la detección del ARN del HCV de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Qualitative v2.0.

Los siguientes compuestos farmacológicos analizados al nivel de plasma máximo (C_{max}) y a 3 veces el C_{max} no interfieren en la detección del ARN del HCV de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Qualitative v2.0:

Inhibidores de la transcriptasa inversa y de la polimerasa de ADN análogos a los nucleótidos Tenofovir Adefovir dipivoxil	Inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleósidos Efavirenz Nevirapina
Inhibidores de la proteasa del HIV Atazanavir Saquinavir Ritonavir Lopinavir/Ritonavir Nelfinavir Darunavir Tipranavir Fosamprenavir	Inhibidores de la transcriptasa inversa nucleósidos Lamivudina Zidovudina Estavudina Abacavir Didanosina Emtricitabina Entecavir Telbivudina
Inhibidor de fusión del HIV Enfuvirtide	Inhibidor de la entrada del HIV Maraviroc
Compuestos para el tratamiento de los virus del herpes Ganciclovir Valganciclovir Aciclovir	Modulador del sistema inmunológico Peginterferón alfa-2b Ribavirina Peginterferón alfa-2a
Inhibidor de la integrasa del HIV Raltegravir	

EVALUACIÓN NO CLÍNICA DEL RENDIMIENTO

A. Límite de detección

El límite de detección de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Qualitative v2.0 se determinó mediante el análisis de diluciones en serie del estándar internacional de la OMS para ARN del virus de la hepatitis C para ensayos realizados mediante la tecnología de amplificación de ácidos nucleicos, genotipo 1a, obtenido del NIBSC, en suero o plasma conservado en EDTA humano negativo para el HCV. Para cada matriz se analizaron tres series de dilución independientes. En cuanto a las réplicas por nivel de concentración, se analizó un total de hasta 252 réplicas por cada tipo de matriz. El estudio se llevó a cabo con tres lotes de reactivos de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Qualitative v2.0.

Los resultados del suero y el plasma conservado en EDTA se muestran en las tablas 1 y 2 y demuestran que la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Qualitative v2.0 detectó el ARN del HCV a concentraciones de 15 UI/ml o superiores con una tasa de resultados positivos superior al $\geq 95\%$. La diferencia entre el suero y el plasma conservado en EDTA no fue estadísticamente significativa.

Tabla 1

Límite de detección en el plasma conservado en EDTA determinado con el estándar internacional de la OMS para ARN del virus de la hepatitis C para ensayos realizados mediante la tecnología de amplificación de ácidos nucleicos

Título de entrada (ARN del HCV en UI/ml)	Número de réplicas válidas	Número de positivos	Tasa de positivos en %
50	314	314	100
25	314	313	100
15	314	308	98
10	315	291	92
5	315	228	72
2,5	314	157	50
0	313	0	0
LOD según PROBIT con tasa de resultados positivos del 95%	12 UI/ml intervalo de confianza del 95%: 10 – 13 UI/ml)		
LOD según tasa de resultados positivos	15 UI/ml		

Tabla 2
Límite de detección en el suero determinado con el estándar internacional de la OMS para ARN del virus de la hepatitis C para ensayos realizados mediante la tecnología de amplificación de ácidos nucleicos

Título de entrada (ARN del HCV en UI/ml)	Número de réplicas válidas	Número de positivos	Tasa de positivos en %
50	251	251	100
25	251	250	100
15	252	248	98
10	252	232	92
5	252	185	73
2,5	252	116	46
0	251	0	0
LOD según PROBIT con tasa de resultados positivos del 95%	11 UI/ml intervalo de confianza del 95%: 10 – 13 UI/ml)		
LOD según tasa de resultados positivos	15 UI/ml		

B. Precisión

La precisión de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Qualitative v2.0 se determinó mediante el análisis de diluciones en serie del estándar internacional de la OMS para ARN del virus de la hepatitis C para ensayos realizados mediante la tecnología de amplificación de ácidos nucleicos en suero o plasma conservado en EDTA humano negativo para el HCV.

Se analizaron dos niveles de concentración (5 UI/ml y 50 UI/ml) en hasta 168 réplicas en 12 series en el plazo de 4 días. Cada muestra se sometió a todo el procedimiento de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Qualitative v2.0, incluida la preparación de la muestra, la amplificación y la detección. El estudio se llevó a cabo con tres lotes de reactivos de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Qualitative v2.0. Se evaluaron todos los datos de precisión válidos mediante el cálculo de la tasa de resultados positivos en % para cada miembro del panel por lote de reactivos (ambas matrices combinadas).

La prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Qualitative v2.0 muestra un rendimiento constante con niveles de concentración de 5 UI/ml y 50 UI/ml para las muestras de suero y plasma conservado en EDTA de los tres lotes de reactivos analizados (Tabla 3).

Tabla 3
Precisión de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Qualitative v2.0 (muestras combinadas de suero y plasma conservado en EDTA)

Concentración nominal [UI/ml]	Tasa de positivos en %		
	Lote 1	Lote 2	Lote 3
5	74	70	74
50	100	100	100

C. Inclusividad

El rendimiento de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Qualitative v2.0 en genotipos del HCV se evaluó mediante la verificación del límite de detección de los genotipos 1 a 6.

Se diluyeron muestras clínicas de ARN del HCV de 8 genotipos/subtipos diferentes (1a, 1b, 2a, 2b, 3, 4, 5 y 6) a tres niveles de concentración diferentes en suero o plasma conservado en EDTA y se determinó la tasa de resultados positivos para cada nivel con hasta 63 réplicas. El estudio se realizó con un lote de reactivos de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Qualitative v2.0.

Los resultados del suero y el plasma conservado en EDTA se muestran en las tablas 4 y 5 y verifican que la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Qualitative v2.0 detectó el ARN del HCV de 8 genotipos/subtipos diferentes a concentraciones de 15 UI/ml o superiores con una tasa de resultados positivos superior al $\geq 95\%$. La diferencia entre el suero y el plasma conservado en EDTA no fue estadísticamente significativa.

Tabla 4
Verificación del genotipo del ARN del HCV del límite de detección en plasma conservado en EDTA

Genotipo	5 UI/ml			15 UI/ml			45 UI/ml		
	Número de réplicas válidas	Número de positivos	Tasa de positivos en %	Número de réplicas válidas	Número de positivos	Tasa de positivos en %	Número de réplicas válidas	Número de positivos	Tasa de positivos en %
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	46	73	62	62	100	62	62	100
6	63	54	86	62	62	100	63	63	100

Tabla 5
Verificación del genotipo del ARN del HCV del límite de detección en suero

Genotipo	5 UI/ml			15 UI/ml			45 UI/ml		
	Número de réplicas válidas	Número de positivos	Tasa de positivos en %	Número de réplicas válidas	Número de positivos	Tasa de positivos en %	Número de réplicas válidas	Número de positivos	Tasa de positivos en %
1a	63	45	71	62	62	100	63	63	100
1b	62	50	81	63	63	100	63	63	100
2a	62	47	76	61	60	98	63	63	100
2b	63	42	67	63	62	98	63	63	100
3	63	58	92	63	63	100	63	63	100
4	63	40	64	63	62	98	63	63	100
5	62	46	74	61	60	98	62	62	100
6	63	51	81	63	63	100	63	63	100

D. Sensibilidad diagnóstica

La sensibilidad diagnóstica de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Qualitative v2.0 se determinó mediante el análisis de muestras individuales de plasma conservado en EDTA o suero positivas para ARN del HCV (337 resultados totales) con dos lotes de reactivos de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Qualitative v2.0. Todas las muestras dieron positivo para ARN del HCV. En este panel, la sensibilidad diagnóstica de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Qualitative v2.0 es del 100% (nivel inferior unilateral del intervalo de confianza al 95%: $\geq 99,1\%$).

Asimismo, la sensibilidad diagnóstica de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Qualitative v2.0 se evaluó durante la seroconversión. Los miembros de 10 paneles de seroconversión del HCV disponibles comercialmente, cada uno recogido de un donante de plasma individual durante un período de seroconversión a los anticuerpos del HCV, se probaron con un lote de reactivos de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Qualitative v2.0. La prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Qualitative v2.0 detectó el HCV de forma más temprana en 10 de cada 10 paneles de seroconversión, en comparación con la referencia serológica Abbott HCV EIA (inmunoensayo enzimático) 2.0. Si la comparamos con otra prueba NAT, la prueba COBAS® AMPLICOR HCV v2.0, la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Qualitative v2.0 detectó el ARN del HCV de forma más temprana (2 de cada 10 paneles) o bien el mismo día desde la primera extracción de sangre (8 de cada 10 paneles).

E. Especificidad

La especificidad de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Qualitative v2.0 se determinó mediante el análisis de muestras de suero o plasma conservado en EDTA de ARN del HCV negativas y seronegativas de donantes de sangre. Se analizaron muestras de suero y plasma conservado en EDTA individuales (500 resultados totales) con dos lotes de reactivos de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Qualitative v2.0. 499 muestras dieron negativo para ARN del HCV. En este panel, la especificidad de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Qualitative v2.0 es del 99,8% (nivel inferior unilateral del intervalo de confianza al 95%: $\geq 99,1\%$).

F. Especificidad analítica

La especificidad analítica de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Qualitative v2.0 se evaluó diluyendo cultivos de títulos elevados de distintos patógenos (consulte la Tabla 6) con muestras clínicas de plasma conservado en EDTA positivas para ARN del HCV y negativas para ARN del HCV. Ninguno de los patógenos sin presencia del HCV interfirió con el rendimiento de la prueba o mostró un resultado de falso positivo en la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Qualitative v2.0.

Tabla 6
Muestras de especificidad analítica

Flavivirus sin presencia del HCV Virus del Nilo Occidental Virus de la encefalitis de St. Louis Virus de la encefalitis del Valle Murray Virus del dengue tipos 1, 2, 3 y 4 Virus de la fiebre amarilla Virus Zika Virus FSME (cepa HYPR)	Virus Adenovirus tipo 5 Citomegalovirus Virus Epstein-Barr Virus de la hepatitis B Virus de la hepatitis A HIV-1 Virus linfotrópico de células T humanas tipos 1 y 2 Virus del herpes humano tipo 6 Virus del herpes simple tipos 1 y 2 Virus de la gripe A Virus del papiloma humano Virus de la varicela zóster
Bacterias <i>Propionibacterium acnes</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	
Levadura <i>Candida albicans</i>	

G. Rendimiento comparado con el de la prueba COBAS® AMPLICOR HCV v2.0

El rendimiento de la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Qualitative v2.0 se comparó con el de la prueba COBAS® AMPLICOR HCV v2.0 mediante el análisis de muestras de suero y plasma conservado en EDTA de pacientes infectados por el HCV. Se analizaron un total de 463 muestras por duplicado de los genotipos 1 a 6 para plasma conservado en EDTA y de los genotipos 1 a 4 para suero. Los resultados de 436 muestras de plasma conservado en EDTA y suero fueron positivos y se encontraban dentro del intervalo de detección de ambas pruebas, lo que conlleva una concordancia de resultados positivos del 100% entre la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Qualitative v2.0 y la prueba COBAS® AMPLICOR HCV v2.0. Se excluyeron 27 resultados de muestras del análisis de datos: 3 muestras no contenían el volumen suficiente para realizar el ensayo en la prueba COBAS® AMPLICOR HCV v2.0, 4 muestras obtuvieron resultados "Target Not Detected" en todas las mediciones de ambas pruebas, 8 muestras generaron resultados discrepantes entre las 2 réplicas de cada prueba y 12 muestras generaron resultados discrepantes entre las 2 pruebas (razón de la exclusión: todas estas muestras presentaban concentraciones de HCV por debajo del LOD de la prueba COBAS® AMPLICOR HCV v2.0, LOD [tasa de detección del 95%] en plasma: 50 UI/ml, LOD en suero: 60 UI/ml). Todas las muestras negativas de plasma conservado en EDTA y suero analizadas (200 resultados en total) fueron válidas y obtuvieron un resultado negativo, lo que conlleva una concordancia de resultados negativos del 100% entre la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Qualitative v2.0 y la prueba COBAS® AMPLICOR HCV v2.0.

BIBLIOGRAFÍA

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. Gretch D, del la Rosa D, Corey L and Carithers R. 1996. Assessment of Hepatitis C viremia using molecular amplification technologies. *Viral Hepat Rev* **2**:85-96.
7. Young KKY, Resnick R and Myers TW. 1993. Detection of hepatitis C virus RNA by a combined reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. *J Clin Microbiol* **31**:882-886.
8. NIH. 1997. Management of Hepatitis C. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement #105.
9. 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.
10. 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.
11. U.S. Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*. 5th Edition, HHS Publication No. (CDC) 21-1112; December 2009.
12. 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.
13. International Air Transport Association. *Dangerous Goods Regulations*, 49th Edition. 2008.
14. Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., and Griffith, R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Bio-Technology* **10**:413-417.
15. Heid, C.A., Stevens, J., Livak, J.K., and Williams, P.M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Research* **6**:986-994.

Información de revisión del documento	
Doc. Rev. 3.0 (Mfg-US) 02/2019	Se ha actualizado el número del organismo notificado en la marca CE. Póngase en contacto con su representante local de Roche para cualquier consulta.
Doc. Rev. 4.0 (Mfg-US) 09/2019	Se ha actualizado el apartado REQUISITOS DE ALMACENAMIENTO Y MANIPULACIÓN para indicarle al usuario que es necesario examinar visualmente el producto antes de utilizarlo con el objetivo de detectar signos de fugas, y que el producto no debe utilizarse si presenta dichos signos. Se ha añadido la dirección web de Roche www.roche.com . Se ha actualizado la página de símbolos armonizados. Póngase en contacto con su representante local de Roche para cualquier consulta.



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

Marcas registradas y patentes

Consulte la página <http://www.roche-diagnostics.us/patents>

©2019 Roche Molecular Systems, Inc.

09/2019
Doc Rev. 4.0 (Mfg-US)

07941706001-05



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116
68305 Mannheim
Germany



Los siguientes símbolos se emplean actualmente en el rotulado de todos los productos diagnósticos por PCR de Roche.



Software auxiliar



Código de lote



Representante autorizado en la Comunidad Europea



Riesgo biológico



Hoja de datos del código de barras



Número de catálogo



Consulte las instrucciones de uso



Para evaluación del rendimiento IVD únicamente



Suficiente para $\langle n \rangle$ pruebas



Límite inferior del intervalo asignado



Contenido del kit



Fabricante



Distribuido por



Almacenar en la oscuridad



Producto sanitario para diagnóstico *in vitro*



Límite de temperatura



Archivo de definición de pruebas



Fecha de caducidad



Límite superior del intervalo asignado



Global Trade Item Number (número mundial de un artículo comercial)



Fecha de fabricación

Rx Only

Solamente para EE. UU.: la ley federal de los Estados Unidos sólo autoriza la venta de este dispositivo a través de un facultativo autorizado o bajo prescripción médica.



El presente producto cumple con los requerimientos previstos por la Directiva Europea 98/79/CE de productos sanitarios para el diagnóstico *in vitro*.