

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



## ЗА IN VITRO ДИАГНОСТИКА.

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

## Съдържание

|                                                       |    |
|-------------------------------------------------------|----|
| ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ .....                                  | 1  |
| КРАТКО ИЗЛОЖЕНИЕ И ОБЯСНЕНИЕ НА ТЕСТА .....           | 2  |
| ПРИНЦИПИ НА ПРОЦЕДУРАТА .....                         | 2  |
| РЕАГЕНТИ .....                                        | 5  |
| ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И ПРОЦЕДУРНИ ПРЕДПАЗНИ МЕРКИ .....     | 6  |
| ИЗИСКВАНИЯ ЗА СЪХРАНЕНИЕ И РАБОТА .....               | 7  |
| ПРИЛОЖЕНИ МАТЕРИАЛИ .....                             | 8  |
| НЕОБХОДИМИ, НО НЕПРИЛОЖЕНИ МАТЕРИАЛИ .....            | 9  |
| ВЗЕМАНЕ, ТРАНСПОРТИРАНЕ И СЪХРАНЕНИЕ НА ПРОБИТЕ ..... | 10 |
| ИНСТРУКЦИИ ЗА РАБОТА .....                            | 10 |
| КОНТРОЛ НА КАЧЕСТВОТО .....                           | 13 |
| РЕЗУЛТАТИ .....                                       | 14 |
| ОГРАНИЧЕНИЯ НА ПРОЦЕДУРАТА .....                      | 15 |
| ИНТЕРФЕРИРАЩИ СУБСТАНЦИИ .....                        | 16 |
| НЕКЛИНИЧНА ОЦЕНКА НА ХАРАКТЕРИСТИКИТЕ .....           | 17 |
| ИЗПОЛЗВАНА ЛИТЕРАТУРА .....                           | 22 |

## ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Качественият тест COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 представлява качествен *in vitro* тест с амплификация на нуклеинови киселини за детекция на РНК от генотипи 1 до 6 на вируса на хепатит С (HCV) в човешка плазма с EDTA или в серум чрез използване на апарата COBAS® AmpliPrep за автоматизирана обработка на пробите и на анализатора COBAS® TaqMan® или анализатора COBAS® TaqMan® 48 за автоматизирана амплификация и детекция. Качественият тест COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 е предназначен за пациенти с клинични и/или биохимични доказателства за чернодробно заболяване, както и с доказана чрез наличие на антитела инфекция с HCV, при които се подозира, че има активна инфекция с HCV. Тестът може да се използва за потвърждаване на положителни за антитела проби. Откриването на HCV РНК показва, че вирусът се реплицира и следователно е доказателство за активна инфекция.

Качественият тест COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 не е предназначен за употреба като тест за скрининг за наличие на HCV в кръв или кръвни продукти.

## КРАТКО ИЗЛОЖЕНИЕ И ОБЯСНЕНИЕ НА ТЕСТА

Вирусът на хепатит С се счита за основния етиологичен агент, който причинява 90 до 95 % от случаите на посттрансфузионен хепатит<sup>1-4</sup>. HCV е ендонуклеопротеин, кодиращ РНК вирус с геном от около 9 500 нуклеотида, кодиращи 3 000 аминокиселини. Като преносим по кръвен път вирус HCV може да се предава чрез кръв и кръвни продукти. Широко разпространеното прилагане на мерки за скрининг на кръв за HCV е намалило значително риска от хепатит, свързан с трансфузионни процедури. Заболяемостта от HCV инфекции е най-висока при злоупотреба с интравенозно инжектиране на наркотици и в по-малка степен при други перкутани експозиции<sup>4</sup>. В световен мащаб заболяемостта от HCV инфекции, според имуносерологични данни, варира от 0,6 % в Канада до 1,5 % в Япония<sup>3</sup>. Процентите на спонтанен вирусен клирънс при експонирани пациенти варират значително; съобщени са между 10 и 60 % според клинични измервания на нормализирането на чернодробните ензими и клирънса на плазмена HCV РНК<sup>5</sup>.

Вирусните частици на HCV не могат да бъдат култивирани от инфектирани кръвни проби; поради това наличието на анти-HCV антитела при пациенти, инфектирани с HCV, е довело до създаването на имуносерологични тестове, които са специфични за тези антитела. Наличието на анти-HCV антитела обаче е мярка за предшестваща експозиция на HCV инфекция и не може да се счита за маркер за текуща инфекция. Измерването на нивата на аланинаминотрансферазата (ALT) се приема за заместителен индикатор за HCV инфекция, но не е директен показател за вирусемия.

Като алтернатива на това, доказателство за текуща инфекция може да бъде откриването на HCV РНК чрез тестове за нуклеинови киселини. С използването на тестове за нуклеинови киселини е възможно да бъде открита HCV вирусемия преди настъпване на имунологична сероконверсия<sup>6,7</sup>. Тъй като тестовете, базирани на нуклеинови киселини, могат да откриват директно HCV РНК, т.е. независимо от имунологичния статус на пациента, те са полезни за откриване на HCV РНК при пациенти с компрометирана имунна система<sup>8</sup>.

## ПРИНЦИПИ НА ПРОЦЕДУРАТА

Качественият тест COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 представлява тест с амплификация на нуклеинови киселини за откриване на РНК на вируса на хепатит С (HCV) в човешки серум или плазма с EDTA. Подготовката на пробите е автоматизирана чрез използване на апарата COBAS® AmpliPrep, а амплификацията и детекцията са автоматизирани чрез използване на анализатора COBAS® TaqMan® или анализатора COBAS® TaqMan® 48.

Качественият тест COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 се базира на три основни процеса: (1) подготовка на пробите за изолиране на HCV РНК, (2) обратна транскрипция на таргетна РНК за получаване на комплементарна ДНК (кДНК) и (3) едновременно амплификация с PCR на таргетната кДНК и детекция на разцепени, двойномаркирани олигонуклеотидни детекционни сонди, специфични за таргетната секвенция.

### Подготовка на пробите

Качественият тест COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 използва автоматизирана подготовка на пробите с апарата COBAS® AmpliPrep чрез генерична техника за захващане, базирана на силициев двукис. Входният обем на пробата е 650 µl, а при процедурата се обработват 500 µl плазма с EDTA или серум. Вирусните частици от HCV се лизират чрез инкубиране при висока температура с помощта на протеаза и хаотропен лизиращ/свързващ буфер, който освобождава нуклеинови киселини и предпазва отделената HCV РНК от RN-азите в серума или плазмата с EDTA. Протеаза и известен брой молекули на вътрешната контрола (IC) на HCV РНК се въвеждат във всяка проба заедно с лизиращия реагент и намагнетизирани стъклени частици. След това сместа се инкубира, а HCV РНК и HCV IC РНК се свързват към повърхността на намагнетизираните стъклени частици. Несвързани субстанции като соли, протеини и други клетъчни примеси се отстраняват чрез промиване на намагнетизираните стъклени частици. След отделяне на частиците и завършване на стъпките за промиване абсорбираните нуклеинови киселини се отмиват при висока температура с воден разтвор. Обработената проба, съдържаща отделената HCV РНК и HCV IC РНК, се добавя към амплификационната смес и се прехвърля в анализатора COBAS® TaqMan® или анализатора COBAS® TaqMan® 48.

## Обратна транскрипция и PCR амплификация

В качествен тест COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 се използва обратна транскрипция на HCV РНК за получаване на комплементарна ДНК (кДНК) и PCR амплификация на кДНК с помощта на праймери, които дефинират секвенция в рамките на запазения във висока степен 5'-нетранслиран участък от генома на HCV<sup>9</sup>. Нуклеотидната последователност на праймерите е оптимизирана с цел да дава сравнима амплификация на HCV генотипи 1 до 6. Обратната транскрипция и PCR амплификационната реакция се извършват с оптимизирана смес на термостабилни рекомбинантни ензими: Z05 и Z05D ДНК полимераза. В присъствие на манган ( $Mn^{2+}$ ) и при подходящи буферни условия Z05 и Z05D притежават активност както на обратна транскриптаза, така и на ДНК полимераза. Това позволява едновременно протичане на обратна транскрипция и на PCR амплификация с детекция на ампликона в реално време.

Обработените проби се добавят към амплификационната смес в амплификационни епруветки (К-епруветки), в които се извършват както обратната транскрипция, така и PCR амплификацията. Реакционната смес се загрява, за да се даде възможност на низходящия праймер да се свърже специфично към таргетната HCV РНК и към HCV IC РНК. В присъствието на  $Mn^{2+}$  и при излишък на дезоксинуклеотидни трифосфати (дНТФ), включително дезоксиаденозин, дезоксигуанозин, дезоксицитидин и дезоксиуридин трифосфати, Z05 и Z05D полимеразите удължават свързаните праймери и образуват ДНК верига, комплементарна на таргетната РНК.

### Амплификация на таргетната секвенция

След обратната транскрипция на таргетната HCV РНК и на HCV IC РНК термоциклерът в анализатора COBAS® TaqMan® или анализатора COBAS® TaqMan® 48 загрява реакционната смес за денатурация на хибрида РНК:кДНК и разкриване на специфичните таргетни секвенции на праймера. При охлаждането на сместа праймерите се свързват с таргетната кДНК. В присъствието на  $Mn^{2+}$  и при излишък на дезоксинуклеотидни трифосфати (дНТФ) термостабилните ДНК полимерази (Z05 и Z05D) удължават свързаните праймери по хода на шаблоните от таргетната секвенция за образуване на двойноверижна ДНК молекула, наречена ампликон. Анализаторът COBAS® TaqMan® или анализаторът COBAS® TaqMan® 48 повтаря автоматично този процес за определен брой цикли, като всеки цикъл е предвиден да удвоява количеството на ДНК на ампликона. Необходимият брой цикли се програмира предварително в анализатора COBAS® TaqMan® или анализатора COBAS® TaqMan® 48. Амплификацията се извършва само в участъка от HCV генома, разположен между праймерите; не се амплифицира целият геном на HCV.

### Селективна амплификация

В качествен тест COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 селективната амплификация на таргетната нуклеинова киселина от пробата се постига чрез използването на ензима AmpErase (урацил-N-гликозилаза) и дезоксиуридин трифосфат (дУТФ). Ензимът AmpErase разпознава и катализира разрушаването на ДНК веригите, които съдържат дезоксиуридин<sup>10</sup>, но не и на ДНК, съдържаща дезокситимидин. Дезоксиуридинът липсва в естествено срещашата се ДНК, но винаги присъства в ампликона поради използването на дезоксиуридин трифосфат като един от дНТФ в състава на реагента еталонна смес. Поради това само ампликонът съдържа дезоксиуридин. Под действието на дезоксиуридина контаминиращият ампликон става податлив на разрушаване от ензима AmpErase преди амплификацията на таргетната ДНК. Неспецифичните продукти, образувани се след първоначалното активиране на еталонната смес от мангана, също се разрушават от ензима AmpErase. Ензимът AmpErase, който е включен в състава на реагента еталонна смес, катализира разцепването на ДНК, съдържаща дезоксиуридин, при дезоксиуридиновите радикали, като отваря веригата на дезоксирибозата в С1-позицията. Когато се нагрее по време на първата стъпка от термичния цикъл, ДНК веригата на ампликона се разцепва на мястото на дезоксиуридина, с което ДНК става негодна за амплификация. Ензимът AmpErase остава неактивен за продължителен период от време след експониране на температури над 55°C, т.е. през всички етапи от термичния цикъл, и следователно не разрушава таргетния ампликон, образуван в хода на цялата PCR реакция.

## Детекция на разцепените двойномаркирани сонди и HCV PHK

В качествения тест COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 се използва PCR технология в реално време<sup>14,15</sup>. Използването на двойномаркирани флуоресцентни сонди предоставя възможност за детекция на натрупването на PCR продукти в реално време чрез проследяване на интензитета на емисиите на флуоресцентните репортерни багрила, отделени по време на процеса на амплификация. Сондите се състоят от специфични за HCV и HCV IC олигонуклеотидни сонди с репортерно багрило и "гасящо" багрило. В качествения тест COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 сондите за HCV и HCV IC са маркирани с различни флуоресцентни репортерни багрила. Когато сондите са интактни, флуоресценцията на репортерното багрило се потиска от близостта на "гасящото" багрило, което се дължи на ефекти на пренос на енергия от типа на Förster. В хода на PCR сондата се хибридизира към таргетната секвенция и се разцепва под въздействие на 5' → 3'-нуклеазната активност на термостабилните Z05 и Z05D ДНК полимерази. След освобождаването и разделянето на отчитащото и "гасящото" багрило, "гасенето" спира и флуоресцентната активност на отчитащото багрило се увеличава. Амплификацията на HCV PHK и на HCV IC PHK се измерва независимо при различни дължини на вълната. Този процес се повтаря за определен брой цикли, като всеки цикъл ефективно увеличава интензитета на емисиите на отделните репортерни багрила, което позволява независимата идентификация на HCV PHK и на HCV IC PHK.

В процесите на амплификация на нуклеинови киселини ефикасността може да бъде редуцирана от инхибитори, които могат да присъстват в пробата. Към качествения тест COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 е добавена HCV IC с цел идентифициране на обработените проби, съдържащи субстанции, които могат да повлияят PCR амплификацията. HCV IC представлява конструктор от неинфекциозна "бронирани" PHK – Armored RNA (aRNA), съдържащ фрагменти от HCV секвенции с идентични места за свързване на праймер като таргетната HCV PHK и уникален участък за свързване на сонда, позволяващ разграничаването на ампликона на HCV IC от ампликона на таргетния HCV. Тя служи като контрола за екстракцията и амплификацията за всяка отделно обработвана проба.

По време на PCR фазата на удължаване в анализатора COBAS® TaqMan® или анализатора COBAS® TaqMan® 48 пробите се осветяват и стимулират чрез филтрирана светлина, и за всяка проба се събират данни за филтрираната флуоресцентна емисия. След това отчетените резултати за всяка проба се коригират с оглед на флукуациите в апарата. Тези отчетени резултати за флуоресценцията се изпращат от апарата към софтуера AMPLILINK и се съхраняват в база данни. Използват се предварителни проверки, за да се определи дали данните за HCV PHK и HCV IC PHK представят валидни серии, и се генерират флагове, когато данните са извън предварително зададените граници. Когато всички предварителни проверки са завършени и резултатите са валидни, отчетените данни за флуоресценцията се обработват с цел генериране на Ct (cycle threshold – праг на цикъла) стойности за HCV PHK и HCV IC PHK. Резултатите се докладват като положителни или отрицателни.

## РЕАГЕНТИ

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

**HCVQLV2**

**72 теста**

### **HCV QL v2.0 CS1**

(HCV касета с реагент за намагнетизирани стъклени частици)

1 x 72 теста

1 x 7,0 ml

Намагнетизирани стъклени частици

Tris буфер

0,09 % натриев азид

0,1 % метилпарабен

### **HCV QL v2.0 CS2**

(HCV касета с лизиращ реагент)

1 x 72 теста

1 x 78,0 ml

Натриев цитрат дихидрат

42,5 % гуанидин тиоцианат

< 6 % полидоканол

0,9 % дитиотреитол

### **HCV QL v2.0 CS3**

HCV касета с мултиреагент, съдържаща:

1 x 72 теста

#### **Pase**

1 x 3,8 ml

(Протеиназен разтвор)

Tris буфер

< 0,05 % ЕДТА

Калциев хлорид

Калциев ацетат

≤ 7,8 % протеиназа

Глицерол

#### **EB**

(Елуентен буфер)

1 x 8,1 ml

Tris-основен буфер

0,09 % натриев азид

### **HCV QL v2.0 CS4**

HCV касета с тест-специфичен реагент, съдържаща:

1 x 72 теста

#### **IC**

1 x 3,6 ml

(HCV вътрешна контрола)

Tris буфер

ЕДТА

< 0,002 % поли rA РНК (синтетична)

< 0,001 % конструктор от Armored HCV RNA, съдържащ HCV секвенции за

свързване на праймер и уникален участък за свързване на сонда

(неинфекциозна РНК в бактериофаг MS2)

0,05 % натриев азид

#### **MMX**

1 x 3,5 ml

(HCV еталонна смес)

Трицинов буфер

Калиев ацетат

Калиев хидроксид

< 20 % диметил сулфоксид

Глицерол

< 0,004 % дАТФ, дЦТФ, дГТФ, дУТФ

< 0,002 % възходящи и низходящи HCV праймери за 5' UTR участъка на HCV

< 0,001 % олигонуклеотидни сонди, маркирани с флуоресцентно

багрило, специфични за HCV и за вътрешната контрола на HCV

< 0,001 % олигонуклеотиден аптамер

< 0,05 % Z05 и Z05D ДНК полимераза (микробна)

< 0,1 % ензим AmpErase (урацил-N-гликозилаза) (микробен)

0,09 % натриев азид

**Mn<sup>2+</sup>**

1 x 19,8 ml

(COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® разтвор на манган)  
< 0,5 % манганов ацетат  
Ледена оцетна киселина  
0,09 % натриев азид

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

6 x 0,85 ml

(HCV положителна контрола)  
< 0,001 % конструктор от Armored HCV RNA, съдържащ HCV секвенции  
(неинфекциозна РНК в бактериофаг MS2)  
Отрицателна човешка плазма, нереактивна според тестове за  
антитела срещу HCV, антитела срещу HIV-1/2, HIV p24  
антиген и HBsAg; HIV-1 РНК, HCV РНК и HBV ДНК, които не  
се откриват чрез PCR методи  
0,1 % консервант ProClin® 300

**CTM (-) C**

6 x 1,0 ml

[Отрицателна контрола COBAS® TaqMan® (човешка плазма)]  
Отрицателна човешка плазма, нереактивна според тестове за  
антитела срещу HCV, антитела срещу HIV-1/2, HIV p24  
антиген и HBsAg; HIV-1 РНК, HCV РНК и HBV ДНК, които не  
се откриват чрез PCR методи  
0,1 % консервант ProClin® 300

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

1 x 6 клипса

(Баркод клипс за HCV положителна контрола)

**HCV (-) C, v2.0 Clip**

1 x 6 клипса

(Баркод клипс за HCV отрицателна контрола)

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

**PG WR**

1 x 5,1 l

COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® промивен реагент  
(P/N: 03587797 190)

**PG WR**

(COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® промивен реагент)  
Натриев цитрат дихидрат  
< 0,1 % N-метилизотиазолон-HCl

**ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И ПРОЦЕДУРНИ ПРЕДПАЗНИ МЕРКИ**

Както при всяка тест процедура, използването на добра лабораторна техника е от съществено значение за правилното провеждане на този анализ. Поради високата чувствителност на този тест трябва да се полагат грижи за предпазване на реагентите и амплификационните смеси от контаминация.

A. ЗА *IN VITRO* ДИАГНОСТИКА.

Б. Този тест е предназначен за употреба с човешки серум или плазма, взета с антикоагуланта ЕДТА.

В. Да не се пилетира с уста.

Г. Да не се консумират храна и напитки и да не се пуши в работните помещения на лабораторията. При работа с проби и реагенти от кита да се използват ръкавици за еднократна употреба, лабораторно облекло и предпазни средства за очите. Измивайте основно ръцете си след работа с пробите и реагентите на теста.

Д. Да се избягва контаминацията на реагентите с микроби и рибонуклеаза при вземане на аликвоти от контролните флакони.

- Е. Препоръчва се използването на стерилни пипети за еднократна употреба и връхчета за пипети, несъдържащи РН-аза.
- Ж. Да не се смесват контроли от различни партии или от различни флакони от една партида.
- З. Да не се смесват касети с реагенти или контроли от различни китове.
- И. Не отваряйте касетите COBAS® AmpliPrep и не подменяйте, смесвайте, изваждайте или добавяйте бутилки.
- Й. Неизползваните реагенти, отпадните продукти и пробите трябва да се изхвърлят съгласно националните, федералните, щатските и местните нормативни документи.
- К. Не използвайте кита след датата на изтичане на срока на годност.
- Л. Информационните листове за безопасност (SDS) могат да бъдат получени от местния офис на Roche при поискване.
- М. Пробите и контролите трябва да се третират като инфекциозен материал, следвайки процедурите за безопасна лабораторна работа описани в *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*<sup>11</sup> и в документа M29-A3 на Института за клинични и лабораторни стандарти (CLSI)<sup>12</sup>. Щателно почистете и дезинфекцирайте всички работни повърхности с прясно приготвен разтвор на 0,5 % натриев хипохлорит в дейонизирана или дестилирана вода.
- Н. **СТМ (-) С и HCV (+) С, v2.0** съдържат човешка плазма, получена от човешка кръв. Изходният материал е тестван и е установено, че е нереактивен за наличие на повърхностния антиген на вируса на хепатит В (HBsAg), антитела срещу HIV-1/2 и HCV, и HIV p24 антигена. Изследването на отрицателна човешка плазма с PCR методите не показва откриваеми количества от HIV-1 РНК, HCV РНК или HBV ДНК. Няма познати методи за тестване, които могат да предложат пълна сигурност, че продуктите от човешка кръв няма да пренесат инфекциозни агенти. Следователно всички материали от човешки произход, включително **СТМ (-) С и HCV (+) С, v2.0** трябва да се считат за потенциално инфекциозни.
- О. **MGP, EB, IC, Mn<sup>2+</sup> и MMX** съдържат натриев азид. Натриевият азид може да реагира с оловни и медни водопроводни тръби и да образува силно експлозивни метални азиди. При изхвърлянето в лабораторните мивки на разтвори, съдържащи натриев азид, обилно промийте каналите с голямо количество вода за предотвратяване на отлагането на азид.
- П. При работа с всички реагенти да се използват ръкавици за еднократна употреба, лабораторно облекло и предпазни средства за очите. Да се избягва контакт на тези материали с кожата, очите или лигавиците. В случай на такъв контакт незабавно измийте с обилно количество вода. Ако участникът не се обработи, може да се получат изгаряния. Ако се получат разливи от тези реагенти, преди да ги подсушите ги разредете с вода.
- Р. Не позволявайте **HCV QL v2.0 CS2** и течни отпадни продукти, включително използвани модули за обработка на проби COBAS® AmpliPrep от апарата COBAS® AmpliPrep, които съдържат гуанидин тиоцианат, да влизат в контакт с разтвор на натриев хипохлорит (белина). Тези смеси могат да отделят силно токсичен газ.

## ИЗИСКВАНИЯ ЗА СЪХРАНЕНИЕ И РАБОТА

- А. Преди употреба проверете визуално всяка касета и флакон с реагент, за да се гарантира, че няма признаци на изтичане. Ако има каквито и да са данни за изтичане, съответният материал да не се използва за теста.
- Б. Съхранявайте **HCV QL v2.0 CS1, HCV QL v2.0 CS2, HCV QL v2.0 CS3 и HCV QL v2.0 CS4** при 2-8°C. Неизползвани, тези реагенти са стабилни до посочената дата на изтичане на срока на годност. След разпечатване тези реагенти са стабилни за 70 дни при 2-8°C или до посочената дата на изтичане на срока на годност, в зависимост от това кой срок изтича първи. **HCV QL v2.0 CS1, HCV QL v2.0 CS2, HCV QL v2.0 CS3 и HCV QL v2.0 CS4** може да се използват за най-много 96 часа съвкупно в апарата COBAS® AmpliPrep. Между циклите реагентите трябва да бъдат съхранявани при 2-8°C.

- В. Съхранявайте **HCV (+) C, v2.0** и **CTM (-) C** при 2-8°C. Контролите са стабилни до посочената дата на изтичане на срока на годност. След отваряне неизползваните количества трябва да се бракуват.
- Г. Съхранявайте баркод клипсовете [**HCV (+) C, v2.0 Clip** и **HCV (-) C, v2.0 Clip**] при 2-30°C.
- Д. Съхранявайте **PG WR** при 2-30°C. Неизползван, **PG WR** е стабилен до посочената дата на изтичане на срока на годност. След разпечатване този реагент е стабилен за 28 дни при 2-30°C или до датата на изтичане на срока на годност, в зависимост от това кой срок изтича първи.

#### ПРИЛОЖЕНИ МАТЕРИАЛИ

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

**HCVQLV2**

**HCV QL v2.0 CS1**

(HCV касета с реагента намагнетизирани стъклени частици)

**HCV QL v2.0 CS2**

(HCV касета с лизиращ реагент)

**HCV QL v2.0 CS3**

(HCV касета с мултиреагент)

**HCV QL v2.0 CS4**

(HCV касета с тест-специфичен реагент)

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

(HCV положителна контрола)

**CTM (-) C**

[COBAS® TaqMan® отрицателна контрола (човешка плазма)]

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

(Баркод клипс за HCV положителна контрола)

**HCV (-) C, v2.0 Clip**

(Баркод клипс за HCV отрицателна контрола)

**COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® Wash Reagent**  
**COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®** промивен реагент

**PG WR**

**PG WR**

(COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® промивен реагент)

## НЕОБХОДИМИ, НО НЕПРИЛОЖЕНИ МАТЕРИАЛИ

### Апаратура и софтуер

- Апарат COBAS® AmpliPrep
- Анализатор COBAS® TaqMan® или анализатор COBAS® TaqMan® 48
- Станция за качване (незадължителна)
- Апарат **cobas p 630** (незадължителен)
- Софтуерна серия AMPLILINK версия 3.3 или версия 3.4
- Модул за управление за софтуера AMPLILINK с принтер
- Инструментални и софтуерни ръководства:
  - Инструментално ръководство за апарата COBAS® AmpliPrep за употреба със софтуерната серия AMPLILINK версия 3.3 и 3.4
  - Инструментално ръководство за анализатора COBAS® TaqMan® за употреба със софтуерната серия AMPLILINK версия 3.3 и 3.4
  - Инструментално ръководство за анализатора COBAS® TaqMan® 48 за употреба със софтуерната серия AMPLILINK версия 3.3 и 3.4
  - Ръководство за работа за софтуерната серия AMPLILINK версия 3.3 за употреба с апарата COBAS® AmpliPrep, анализатора COBAS® TaqMan®, анализатора COBAS® TaqMan® 48, анализатора COBAS® AMPLICOR и апарата **cobas p 630**

или

- Ръководство за работа за софтуерната серия AMPLILINK версия 3.4
- Незадължителни: Ръководство на оператора за апарата **cobas p 630**, софтуер версия 2.2
- Файл с дефиниция на теста. Вижте картата с информация за продукта, приложена към кита, за името и текущата версия на файла с дефиницията на теста.

### Други материали

- Стойка за проби (стойка SK24)
- Стойка за реагенти
- стойка за SPU
- К-носител
- Транспортър за К-носител
- Стойка за К-носител
- Пипетори с аерозолна бариера или с връхчета без PH-аза с положително изместване (капацитет 1 000 µl); пипеторите трябва да имат точност в рамките на 3 % от посочения обем. Трябва да се използват връхчета с аерозолна бариера или с положително изместване, несъдържащи PH-аза, за да се предотврати кръстосано замърсяване на пробите и ампликона.
- Ръкавици за еднократна употреба, без талк
- Вортекс миксер

### Материали за еднократна употреба

- Модули за обработка на проби (SPU)
- Входна епруветка за проби (S-епруветки) с баркод клипс
- Стойка с К-връхчета
- Кутия с К-епруветки 12 x 96

## ВЗЕМАНЕ, ТРАНСПОРТИРАНЕ И СЪХРАНЕНИЕ НА ПРОБИТЕ

**ЗАБЕЛЕЖКА:** *Работете с всички проби и контроли като с потенциално способни да предават инфекциозни агенти.*

### Вземане и съхранение на пробите

Качественият тест COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 е предназначен за употреба с проби от серум или плазма с ЕДТА. Кръвта трябва да се взема в SST<sup>®</sup> епруветки за отделяне на серума, епруветки за подготовка на плазма BD Vacutainer® PPT™ за молекулярни диагностични тестови методи или стерилни епруветки с използване на ЕДТА (бледолилава капачка) като антикоагулант. Следвайте инструкциите на производителя за работа с епруветките за вземане на проби. Прясно взетите проби (пълна кръв) може да се съхраняват при 2-25°C до 24 часа преди центрофугиране. След центрофугиране прехвърлете серума или плазмата с ЕДТА в стерилна полипропиленова епруветка. Препоръчва се пробите да се съхраняват в аликвоти от по 1 000 µl в стерилни полипропиленови епруветки с винтова капачка с обем 2,0 ml (например микроепруветка с винтова капачка от Sarstedt с обем 2 ml). Пробите от серум или плазма с ЕДТА може да се съхраняват:

- при 2-8°C до 72 часа
- при -20°C до -80°C до 6 седмици

Серумните и плазмените проби с ЕДТА може да се замразят и размразят до пет пъти без загуба на HCV РНК.

### Транспортиране на пробите

Транспортирането на пълна кръв, серум или плазма с ЕДТА трябва да се извършва в съответствие с националните, федералните, щатските и местните нормативни документи за транспортиране на етиологични агенти<sup>13</sup>. Пълната кръв трябва да бъде транспортирана при 2-25°C и да бъде центрофугирана в рамките на 24 часа след вземането. Плазма с ЕДТА или серум могат да се транспортират при 2-8°C или замразени при -20°C до -80°C.

## ИНСТРУКЦИИ ЗА РАБОТА

За подробни инструкции за работа, описание на възможните конфигурации, отпечатване на резултати и интерпретация на флагове, забележки и съобщения за грешки вижте ръководствата за софтуерната серия AMPLI LINK версия 3.3 или версия 3.4, както е посочено в раздела "Апаратура и софтуер".

### Размер на партидата и работен процес

Всеки кит съдържа достатъчно количество реагенти за 72 теста, които може да се извършват на партии от 12 до 24 теста. Във всяка партида трябва да се включи най-малко по една от всяка контрола [СТМ (-) С и HCV (+) С, v2.0] (вж. раздела "Контрол на качеството"). Работният цикъл на анализатора COBAS® TaqMan® или на анализатора COBAS® TaqMan® 48 трябва да се стартира в рамките на 120 минути след завършване на подготовката на пробите и контролите. НЕ ЗАМРАЗЯВАЙТЕ и НЕ СЪХРАНЯВАЙТЕ обработените проби и контроли при 2-8°C.

### Подготовка на пробите и контролите

Ако се използват замразени проби, оставете пробите на стайна температура до пълното им размразяване и обработете с вортекс миксер за 3-5 секунди преди употреба. Преди употреба контролите трябва да се извадят от мястото за съхранение при 2-8°C и да бъдат темперирани до температурата на околната среда за 3-5 секунди.

## **Част А. Поддръжка и пълнене**

- A1. Апаратът COBAS® AmpliPrep е готов за работа в режим на готовност.
- A2. Включете модула за управление за софтуера AMPLILINK в положение **ON**. Подгответе модула за управление, както следва:
1. Влезте в операционната система Microsoft Windows.
  2. Кликнете два пъти върху иконата на софтуера AMPLILINK.
  3. Влезте в софтуера AMPLILINK, като въведете зададените потребителско име и парола.
- A3. Проверете наличността на **PG WR** с помощта на екрана **Status** и го подменете, ако е необходимо.
- A4. Извършете всички процедури за поддръжка, които са изброени в раздела **Due**. Апаратът COBAS® AmpliPrep ще напълни системата автоматично.

## **Част Б. Зареждане на касети с реагенти**

**ЗАБЕЛЕЖКА:** *Всички касети с реагенти трябва да се извадят от мястото на съхранение при 2-8°C, да се зарядят веднага в апарата COBAS® AmpliPrep и да се оставят да се темперират до температурата на околната среда в апарата най-малко за 30 минути преди обработката на първата проба. Не оставяйте касетите с реагенти да се темперират до околната температура извън апарата, тъй като може да се образува кондензация по баркод етикетите. Не изтривайте кондензацията, ако се образува такава по баркод етикетите.*

- B1. Поставете **HCV QL v2.0 CS1** в стойка за реагенти. Поставете **HCV QL v2.0 CS2**, **HCV QL v2.0 CS3** и **HCV QL v2.0 CS4** в отделна стойка за реагенти.
- B2. Заредете стойката за реагент, съдържаща **HCV QL v2.0 CS1**, в позиция за стойка **A** на апарата COBAS® AmpliPrep.
- B3. Заредете стойката за реагент, съдържаща **HCV QL v2.0 CS2**, **HCV QL v2.0 CS3** и **HCV QL v2.0 CS4** в позиция за стойка **B**, **C**, **D** или **E** на апарата COBAS® AmpliPrep (вижте съответното инструментално ръководство за допълнителна и подробна информация).

## **Част В. Зареждане на материалите за еднократна употреба**

**ЗАБЕЛЕЖКА:** *Определете необходимия брой касети с реагент COBAS® AmpliPrep, модули за обработка на проби (SPU), входни епруветки за проби (S-епруветки), К-върхчета и К-епруветки. За всяка проба или контрола са необходими един SPU, една входяща S-епруветка, едно К-върхче и една К-епруветка.*

Възможни са голям брой конфигурации за употреба на апарата COBAS® AmpliPrep с анализатора COBAS® TaqMan® или анализатора COBAS® TaqMan® 48. В зависимост от конфигурацията, която се използва, заредете подходящия брой стойки за касети с реагенти, стойки за проби с входни S-епруветки, стойки за SPU, стойки за К-върхчета, стойки за К-епруветки и К-носители на стойки за К-носител в съответните позиции за стойки на апарата COBAS® AmpliPrep.

- B1. Поставете SPU в стойката(ите) за SPU и поставете стойката(ите) на позиция за стойка **J**, **K** или **L** в апарата COBAS® AmpliPrep.
- B2. В зависимост от конфигурацията, която се използва, заредете пълна(и) стойка(и) за К-епруветки в позиция за стойка **M**, **N**, **O** или **P** на апарата COBAS® AmpliPrep.
- B3. Заредете пълна(и) стойка(и) за К-върхчета в позиция за стойка **M**, **N**, **O** или **P** на апарата COBAS® AmpliPrep.
- B4. В зависимост от конфигурацията, която се използва, заредете К-носителите върху стойка(и) за К-носител в позиция за стойка **M**, **N**, **O** или **P** на апарата COBAS® AmpliPrep.

## Част Г. Създаване на поръчки и зареждане за пробите

- Г1. Подгответе стойките за проби, както следва: поставете клипс с баркод във всяка позиция за стойка за проби, в която ще се поставя проба (S-епруветка). Прикрепете по един от специфичните клипсове с баркод етикети за контролите [CTM (-) C и HCV (+) C, v2.0] на всяка позиция на стойката за проби, в която ще се поставят контролите (S-епруветки). Клипсовете с баркод за контролите трябва да са със същия партиден номер на контрола като номера на партидата на флаконите с контролите в кита. Уверете се, че сте поставили правилната контрола в позицията със съответния баркод клипс на контрола. Поставете една входна S-епруветка във всяка позиция с клипс с етикет с баркод.
- Г2. Като използвате софтуера AMPLILINK, създайте поръчки за проби за всяка проба и контрола в прозореца **Orders** в раздела **Sample**. Изберете подходящия файл на тест и завършете със запаметяване на поръчките.
- Г3. Задайте поръчки за пробите и контролите в позициите за стойките за проби в прозореца **Orders** в раздела **Sample Rack**. Номерът на стойката за проби трябва да бъде за стойката, подготвена в стъпка Г1.
- Г4. Отпечатайте справката **Sample Rack Order**, за да я използвате като работен лист.
- Г5. Подгответе стойките за проби и контроли в определената зона за добавяне на проби и контроли, както следва: обработете с вортекс миксер всяка проба и контрола [CTM (-) C и HCV (+) C, v2.0] за 3 до 5 секунди. Да се избягва контаминиране на ръкавиците при работа с пробите и контролите.
- Г6. Прехвърлете 650 µl от всяка проба и контрола [CTM (-) C и HCV (+) C, v2.0] в съответната входна S-епруветка с баркод етикет, като използвате микропипетор с връхче с аерозолна бариера или положително изместване, несъдържащо РН-аза. **Избягвайте прехвърляне на частици и/или фибринови съсиреци от оригиналната проба във входната S-епруветка.** Пробите и контролите трябва да се прехвърлят в позициите за епруветки, които са определени и записани в работния лист в стъпка Г4. Клипсовете с баркод за контролите трябва да са със същия партиден номер на контрола като номера на партидата на флаконите с контролите в кита. Поставете правилната контрола в позицията със съответния клипс с баркод на контрола. **Избягвайте контаминиране на горната част на S-епруветката с проби или контроли.**
- Г7. Ако използвате аппарата **cobas p 630** за подготовка на пробите, вижте Ръководство на оператора за аппарата **cobas p 630**.
- Г8. В зависимост от конфигурацията, която се използва, поставете стойката(ите) за проби, заредени с входните S-епруветки, в позиции за стойка **F**, **G** или **H** на аппарата COBAS® AmpliPrep.
- Г9. В зависимост от конфигурацията, която се използва, заредете стойката(ите) за проби с входните S-епруветки и К-епруветките (по една за всяка входна S-епруветка, заредена в позицията отдалечено непосредствено до входните S-епруветки) на позицията за стойка **F**, **G** или **H** на аппарата COBAS® AmpliPrep.

## Част Д. Стартиране на работния цикъл на аппарата COBAS® AmpliPrep

- Д1. Стартирайте аппарата COBAS® AmpliPrep като използвате софтуера AMPLILINK.

## Част Е. Спиране на работния цикъл на аппарата COBAS® AmpliPrep и прехвърляне в анализатора COBAS® TaqMan® или анализатора COBAS® TaqMan® 48 (само за ръчно прехвърляне)

- Е1. Проверете за флагове или съобщения за грешки.
- Е2. В зависимост от конфигурацията, извадете обработените проби и контроли от аппарата COBAS® AmpliPrep или със стойките за проби (за анализатора COBAS® TaqMan® без станция за скачване), или със стойките за К-носител (за анализатора COBAS® TaqMan® 48).

Е3. Отстранете отпадните продукти от апарата COBAS® AmpliPrep.

**ЗАБЕЛЕЖКА:** *Всички обработени проби и контроли не трябва да се излагат на светлина след завършване на подготовката на пробите и контролите.*

## Амплификация и детекция

### Настройване на анализатора COBAS® TaqMan® или анализатора COBAS® TaqMan® 48

Работният цикъл на анализатора COBAS® TaqMan® или на анализатора COBAS® TaqMan® 48 трябва да се стартира в рамките на 120 минути след завършване на подготовката на пробите и контролите. НЕ ЗАМРАЗЯВАЙТЕ и НЕ СЪХРАНЯВАЙТЕ обработените проби и контроли при 2-8°C.

#### Част Ж. Зареждане на обработените проби

Ж1. В зависимост от конфигурацията на апарата, извършете съответните стъпки за прехвърляне на К-епруветките в анализатора COBAS® TaqMan® или анализатора COBAS® TaqMan® 48.

#### Част 3. Стартиране на работния цикъл на анализатора COBAS® TaqMan® или анализатора COBAS® TaqMan® 48

31. Стартирайте работния цикъл на анализатора COBAS® TaqMan® или анализатора COBAS® TaqMan® 48 в зависимост от използваната конфигурация.

#### Част И. Приключване на работния цикъл на анализатора COBAS® TaqMan® или анализатора COBAS® TaqMan® 48

И1. След завършване на работния цикъл на анализатора COBAS® TaqMan® или анализатора COBAS® TaqMan® 48 отпечатайте справката с резултатите. Проверете за флагове и съобщения за грешки в справката с резултатите. Пробите с флагове и забележки се интерпретират както е описано в раздела "Резултати". След приемане на резултатите ги съхранете в архива.

И2. Извадете използваните К-епруветки от анализатора COBAS® TaqMan® или анализатора COBAS® TaqMan® 48.

## КОНТРОЛ НА КАЧЕСТВОТО

Във всяка партида на теста трябва да се включат една COBAS® TaqMan® отрицателна контрола и една HCV положителна контрола. Партидата е валидна, ако няма флагове за ниския от контролите [HCV (+) C, v2.0 и CТМ (-) C].

Няма изисквания относно позицията на контролите на стойката за проби.

Проверете разпечатката от партидата за флагове и забележки, за да се уверите, че партидата е валидна.

### Отрицателна контрола

**СТМ (-) C** трябва да даде резултат "Negative". Ако **СТМ (-) C** е отбелязана с флаг като невалидна, тогава цялата партида е невалидна. Повторете целия процес (подготовка на пробите и контролите, амплификация и детекция). Ако **СТМ (-) C** е постоянно невалидна при много партии, свържете се местния офис на Roche за техническо съдействие.

### Положителна контрола

**HCV (+) C, v2.0** трябва да даде резултат "Positive". Ако **HCV (+) C, v2.0** е отбелязана с флаг като невалидна, тогава цялата партида е невалидна. Повторете целия процес (подготовка на пробите и контролите, амплификация и детекция). Ако **HCV (+) C, v2.0** е постоянно невалидна при много партии, свържете се местния офис на Roche за техническо съдействие.

## РЕЗУЛТАТИ

Анализаторът COBAS® TaqMan® или анализаторът COBAS® TaqMan® 48 автоматично открива наличието на HCV РНК за пробите и контролите.

### Софтуер AMPLILINK:

- Определя Ct за HCV РНК и HCV IC РНК.
- Определя наличието на HCV РНК и HCV IC РНК въз основа на Ct стойностите за HCV РНК и HCV IC РНК.

### Валидиране на партиди:

Проверете в прозореца за резултати на софтуера AMPLILINK или разпечатката за флагове и забележки, за да се уверите, че партидата е валидна.

За поръчките за контроли се извършва проверка за определяне дали Ct стойността за контролата е в рамките на указания диапазон. Ако Ct стойността за контролата попада извън диапазона, се генерира ФЛАГ за посочване, че контролата е невалидна.

Партидата е валидна, ако няма флагове за никоя от контролите [HCV (+) C, v2.0 и CТМ (-) C].

Партидата е невалидна, ако за HCV контролите се появи някой от следните флагове:

### Отрицателна контрола:

| Флаг       | Резултат | Интерпретация                                                                 |
|------------|----------|-------------------------------------------------------------------------------|
| NC_INVALID | Invalid  | Невалиден резултат или резултатът за отрицателната контрола не е отрицателен. |

### HCV положителна контрола:

| Флаг       | Резултат | Интерпретация                                                                 |
|------------|----------|-------------------------------------------------------------------------------|
| PC_INVALID | Invalid  | Невалиден резултат или резултатът за положителната контрола не е положителен. |

Ако партидата е невалидна, повторете целия процес, включително подготовката на пробите и контролите, обратната транскрипция, амплификацията и детекцията.

### Интерпретация на резултатите:

Ако партидата е валидна, проверете всяка отделна проба за флагове или забележки в разпечатката с резултатите.

⇒ Една валидна партида може да включва както валидни, така и невалидни резултати от проби в зависимост от това дали са получени флагове и/или забележки за отделните проби.

Резултатите за проби се интерпретират, както следва:

| Резултат    | Интерпретация                                                                                                                                  |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Отрицателни | Ct стойността за HCV е над границата за теста или не е получена<br>Ct стойност за HCV. Докладвайте резултатите като<br>"Не е открита HCV РНК". |
| Положителни | Докладвайте резултатите като "Открита е HCV РНК".                                                                                              |

Ако показваният елемент за резултата за проба е "Failed", "Invalid" или "Aborted", вижте ръководството за работа за софтуерната серия AMPLILINK версия 3.3 или версия 3.4, както е посочено в раздела "Необходими, но неприложени материали".

## ОГРАНИЧЕНИЯ НА ПРОЦЕДУРАТА

1. Този тест е валидиран за употреба само с човешки серум или плазма, взета с антикоагуланта ЕДТА. Тестването на други видове клинични проби може да доведе до неточни резултати.
2. Мутациите, макар и редки, в участъците с максимално запазване на секвенцията от вирусния геном, които се обхващат от праймерите и/или сондите, използвани в теста, могат да доведат до неоткриване на вируса.
3. Детекцията на HCV РНК зависи от броя на вирусните частици, които са налични в пробата, и може да се повлияе от методите за вземане на пробата, от фактори, свързани с пациента (напр. възраст, наличие на симптоматика), и/или от стадия на инфекцията.
4. Надеждността на резултатите зависи от съответните процедури за вземане, транспортиране, съхранение и обработка на пробите.
5. Наличието на ензима AmpErase в COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV еталонната смес намалява риска от контаминация на ампликона. Въпреки това контаминацията от HCV положителни контроли и клинични проби може да се избегне само чрез добри лабораторни практики и стриктно придържане към процедурите, посочени в тази листовка.
6. Този продукт трябва да се използва само от персонал, обучен за работа с апарата **cobas p 630** (незадължителен), апарата COBAS® AmpliPrep и анализатора COBAS® TaqMan® или анализатора COBAS® TaqMan® 48. Операторът трябва да е напълно запознат с приложните програми, използвани с апаратите, и да се придържа към добри лабораторни практики.
7. Този продукт може да се използва само с апарата **cobas p 630** (незадължителен), апарата COBAS® AmpliPrep и анализатора COBAS® TaqMan® или анализатора COBAS® TaqMan® 48.
8. Поради съществуващите органични различия между технологиите, преди преминаване от една технология към друга, на потребителите се препоръчва да провеждат корелационни проучвания на методите в своите лаборатории за установяване на технологичните различия.

## ИНТЕРФЕРИРАЩИ СУБСТАНЦИИ

Доказано е, че повишени нива на триглицеридите (3 300 mg/dl), конюгиран билирубин (25 mg/dl) и неконюгиран билирубин (20 mg/dl), албумин (6 000 mg/dl), хемоглобин (200 mg/dl) и човешка ДНК (40 mg/dl) в пробите, както и наличието на автоимунни заболявания като системен лупус еритематозус (SLE), ревматоиден артрит (RA) и антинуклеарни антитела (ANA) не повлияват детекцията на HCV PHK с качествения тест COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0.

Доказано е, че следните лекарствени вещества, тествани при максимални плазмени нива ( $C_{max}$ ) и 3-кратните  $C_{max}$ , не повлияват детекцията на HCV PHK с качествения тест COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0:

|                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Нуклеотидни инхибитори на обратната транскриптаза и ДНК полимеразата</b><br>Тенофовир<br>Адефовир дипивоксил                                               | <b>Ненуклеозидни инхибитори на обратната транскриптаза</b><br>Ефавиренц<br>Невирапин                                                                               |
| <b>Инхибитори на HIV протеазата</b><br>Атазанавир<br>Саквинавир<br>Ритонавир<br>Лопинавир/ритонавир<br>Нелфинавир<br>Дарунавир<br>Типранавир<br>Фозампренавир | <b>Нуклеозидни инхибитори на обратната транскриптаза</b><br>Ламивудин<br>Зидовудин<br>Ставудин<br>Абакавир<br>Диданозин<br>Емтрицитабин<br>Ентекавир<br>Телбивудин |
| <b>HIV фузионни инхибитори</b><br>Енфувиртид                                                                                                                  | <b>Инхибитор на навлизането на HIV</b><br>Маравирок                                                                                                                |
| <b>Съединения за лечение на херпесни вируси</b><br>Ганцикловир<br>Валганцикловир<br>Ацикловир                                                                 | <b>Имунни модулатори</b><br>Пегинтерферон алфа-2b<br>Рибавирин<br>Пегинтерферон алфа-2a                                                                            |
| <b>Инхибитор на HIV интегразата</b><br>Ралтегравир                                                                                                            |                                                                                                                                                                    |

## НЕКЛИНИЧНА ОЦЕНКА НА ХАРАКТЕРИСТИКИТЕ

### А. Праг на откриваемия минимум (LOD)

Прагът на откриваемия минимум на качествения тест COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 е определен чрез анализ на серийни разреждания на Международния стандарт на СЗО за РНК на вируса на хепатит С за тестове с технологията за амплификация на нуклеинови киселини, генотип 1a, получен от NIBSC, в HCV-отрицателна човешка плазма с ЕДТА или в серум. За всяка матрица са анализирани три независими серии на разреждане. За всеки тип матрица са тествани общо до 252 репликата на концентрация. Проучването е извършено чрез използване на три партиди реагенти на качествения тест COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0.

Резултатите за плазма с ЕДТА и за серум са показани съответно в таблици 1 и 2, и демонстрират, че качественият тест COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 открива HCV РНК в концентрации от 15 IU/ml или по-високи с процент на съвпадение  $\geq 95$  %. Разликата между серума и плазмата с ЕДТА е статистически незначима.

**Таблица 1**  
**Прагът на откриваемия минимум в плазма с ЕДТА,**  
**определен с Международния стандарт на СЗО за РНК на вируса на хепатит С**  
**за тестове с технологията за амплификация на нуклеинови киселини**

| Титър на въвеждане<br>(HCV РНК IU/ml)                     | Брой на валидните<br>репликати                                   | Брой<br>положителни | Процент на<br>съвпадение (%) |
|-----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|---------------------|------------------------------|
| 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                            |
| <b>LOD чрез PROBIT<br/>при 95 % процент на съвпадение</b> | <b>12 IU/ml</b><br><b>95 % доверителен интервал: 10–13 IU/ml</b> |                     |                              |
| <b>LOD по процент на съвпадение</b>                       | <b>15 IU/ml</b>                                                  |                     |                              |

**Таблица 2**  
**Прагът на откриваемия минимум в серум,**  
**определен с Международния стандарт на СЗО за РНК на вируса на хепатит С**  
**за тестове с технологията за амплификация на нуклеинови киселини**

| Титър на въвеждане<br>(HCV РНК IU/ml)                     | Брой на валидните<br>репликати                               | Брой<br>положителни | Процент на<br>съвпадение (%) |
|-----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|---------------------|------------------------------|
| 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                            |
| <b>LOD чрез PROBIT<br/>при 95 % процент на съвпадение</b> | <b>11 IU/ml<br/>(95 % доверителен интервал: 10–13 IU/ml)</b> |                     |                              |
| <b>LOD по процент на съвпадение</b>                       | <b>15 IU/ml</b>                                              |                     |                              |

## **Б. Прецизност**

Прецизността на качествения тест COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 е определена чрез анализ на серийни разреждания на Международния стандарт на СЗО за РНК на вируса на хепатит С за тестове с технологията за амплификация на нуклеинови киселини в HCV-отрицателна човешка плазма с ЕДТА или в серум.

Тествани са две нива на концентрация (5 IU/ml и 50 IU/ml) в до 168 репликата в 12 работни цикъла в 4 дни. Всяка проба е преминавала през цялата процедура на качествения тест COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0, включваща подготовка на пробите, амплификация и детекция. Проучването е извършено чрез използване на три партиди реагенти на качествения тест COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0. Всички валидни данни за прецизността са оценени чрез изчисляване на съвпадението в % за всеки член на панел по партида на реагент (комбиниране и на двете матрици).

Качественият тест COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 демонстрира устойчивост на характеристиките при нива на концентрация 5 IU/ml и 50 IU/ml за проби от плазма с ЕДТА и серум в рамките и на трите партиди тествани реагенти (таблица 3).

**Таблица 3**  
**Прецизност на качествения тест COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0**  
**(комбинирани проби от плазма с ЕДТА и серум)**

| Номинални концентрации<br>[IU/ml] | Процент на съвпадение (%) |           |           |
|-----------------------------------|---------------------------|-----------|-----------|
|                                   | Партида 1                 | Партида 2 | Партида 3 |
| 5                                 | 74                        | 70        | 74        |
| 50                                | 100                       | 100       | 100       |

## В. Обхват

Характеристиките на качествения тест COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 при генотипите на HCV са оценени чрез потвърждаване на прага на откриваемия минимум за генотипи 1 до 6.

HCV РНК клинични проби за 8 различни генотипи/подтипове (1a, 1b, 2a, 2b, 3, 4, 5 и 6) са разредени до три различни нива на концентрация в плазма с ЕДТА или в серум и е извършено определяне на процента на съвпадение за всяко ниво с до 63 репликата. Проучването е извършено чрез използване на една партида реагенти на качествения тест COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0.

Резултатите за плазма с ЕДТА и за серум са показани съответно в таблици 4 и 5, и потвърждават, че качественият тест COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 открива HCV РНК за 8 различни генотипи/подтипове в концентрации от 15 IU/ml или по-високи с процент на съвпадение  $\geq 95\%$ . Разликата между серума и плазмата с ЕДТА е статистически незначима.

**Таблица 4**  
**Потвърждаване на прага на откриваемия минимум в плазма с ЕДТА за HCV РНК генотипи**

| Гено-тип | 5 IU/ml                |                  |                | 15 IU/ml               |                  |                | 45 IU/ml               |                  |                |
|----------|------------------------|------------------|----------------|------------------------|------------------|----------------|------------------------|------------------|----------------|
|          | Брой валидни репликати | Брой положителни | Съвпадение (%) | Брой валидни репликати | Брой положителни | Съвпадение (%) | Брой валидни репликати | Брой положителни | Съвпадение (%) |
| 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            |

**Таблица 5**  
**Потвърждаване на прага на откриваемия минимум в серум за HCV РНК генотипи**

| Гено-тип | 5 IU/ml                |                  |                | 15 IU/ml               |                  |                | 45 IU/ml               |                  |                |
|----------|------------------------|------------------|----------------|------------------------|------------------|----------------|------------------------|------------------|----------------|
|          | Брой валидни репликати | Брой положителни | Съвпадение (%) | Брой валидни репликати | Брой положителни | Съвпадение (%) | Брой валидни репликати | Брой положителни | Съвпадение (%) |
| 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            |

## Г. Диагностична чувствителност

Диагностичната чувствителност на качествения тест COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 е определена чрез анализиране на отделни HCV РНК-положителни плазмени проби с ЕДТА или серумни проби (общо 337 резултата) с две партии реагенти на качествения тест COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0. Всички тествани проби са положителни за HCV РНК. В този панел диагностичната чувствителност на качествения тест COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 е 100 % (едностранна долна 95 %-на доверителна граница:  $\geq 99,1$  %).

Освен това, диагностичната чувствителност на качествения тест COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 е оценена по време на сероконверсия. Членовете на 10 предлагани на пазара HCV сероконверсионни панела, като всеки панел е получен от отделен плазмен донор по време на период на сероконверсия с HCV антигела, са тествани с една партида реагенти на качествения тест COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0. Качественият тест COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 открива HCV по-рано в 10 от 10 сероконверсионни панела, ако се сравни със серологичния референтен тест Abbott HCV ИЕТ (имуноензимен тест) 2.0. Ако се сравни с друг NAT тест, като теста COBAS® AMPLICOR HCV, v2.0, качественият тест COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 открива HCV РНК по-рано (2 от 10 панела) или на същия ден като първото пробонабиране (8 от 10 панела).

## Д. Специфичност

Специфичността на качествения тест COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 е определена чрез анализ на HCV РНК-отрицателна и серум-отрицателна плазма с ЕДТА или серумни проби от кръводарители. Отделните проби от плазма с ЕДТА и от серум (500 общи резултата) са тествани с две партии реагенти на качествения тест COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0. 499 проби са отрицателни за HCV РНК. В този панел специфичността на качествения тест COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 е 99,8 % (едностранна долна 95 %-на доверителна граница:  $\geq 99,1$  %).

## Е. Аналитична специфичност

Аналитичната специфичност на качествения тест COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 е оценена чрез разреждане на високотитърни култури от различни патогени (вж. таблица 6) с HCV РНК-положителни и HCV РНК-отрицателни клинични проби от плазма с ЕДТА. Никой от не-HCV патогените не повлиява характеристиките на теста и не дава фалшиво положителен резултат в качествения тест COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0.

**Таблица 6**  
**Проби за оценяване на аналитичната специфичност**

|                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Не-HCV флавируси</b><br>Вирус на западнотилската треска<br>Вирус на St. Louis енцефалит<br>Вирус на Murray Valley енцефалит<br>Вирус на денгата, типове 1, 2, 3 и 4<br>Вирус на жълтата треска<br>Вирус Zika<br>FSME вирус (щам HYPR) | <b>Вируси</b><br>Аденовирус тип 5<br>Цитомегаловирус<br>Вирус на Epstein-Barr<br>Вирус на хепатит В<br>Вирус на хепатит А<br>HIV-1<br>Човешки Т-клетъчен лимфотропен вирус типове 1 и 2<br>Човешки херпес вирус тип 6<br>Вируси на херпес симплекс типове 1 и 2<br>Инфлуенца А<br>Човешки папиломавирус<br>Варицела-зостер вирус |
| <b>Бактерии</b><br><i>Propionibacterium acnes</i><br><i>Staphylococcus aureus</i>                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| <b>Дрожди</b><br><i>Candida albicans</i>                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |

## **Ж. Сравнение на характеристиките с теста COBAS® AMPLICOR HCV, v2.0**

Характеристиките на качествения тест COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 и тези на теста COBAS® AMPLICOR HCV, v2.0 са сравнени чрез анализ на серумни проби и плазмени проби с ЕДТА от пациенти, инфектирани с HCV. Общо 463 проби от генотипи 1 до 6 за плазма с ЕДТА и генотипи 1 до 4 за серум са анализирани в две копия. Резултатите за 436 плазмени проби с ЕДТА и серумни проби са положителни и в рамките на диапазона на детекция на двата теста, при което се получава 100 % съответствие на положителните проби между качествения тест COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 и теста COBAS® AMPLICOR HCV, v2.0. Резултатите за 27 проби са изключени от анализа на данните; 3 проби са с недостатъчен обем за извършване на изследването с теста COBAS® AMPLICOR HCV, v2.0, 4 дават резултати "Target Not Detected" при всички измервания с двата теста, 8 проби дават несъответстващи резултати между 2-та репликата при всеки от тестовите, 12 проби дават несъответстващи резултати между двата теста [обосновка за изключване: всичките тези проби са с HCV концентрации под LOD на теста COBAS® AMPLICOR HCV, v2.0, LOD (95 % степен на детекция) плазма: 50 IU/ml, LOD серум: 60 IU/ml]. Всички изследвани отрицателни проби от плазма с ЕДТА и серум (общо 200 резултата) са валидни и дават отрицателен резултат, при което се получава 100 % съответствие на отрицателните проби между качествения тест COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 и теста COBAS® AMPLICOR HCV, v2.0.

## ИЗПОЛЗВАНА ЛИТЕРАТУРА

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. Gretsch 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*. 5<sup>th</sup> 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 – 3<sup>rd</sup> 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.

| Информация кое преработено издание е документът |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Doc. Rev. 3.0 (Mfg-US)<br>02/2019               | <p>Актуализиран е номерът на нотифицирания орган под CE-маркировката.</p> <p>Моля, свържете се с местния представител на Roche, ако имате някакви въпроси.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Doc. Rev. 4.0 (Mfg-US)<br>09/2019               | <p>Актуализиран е разделът <b>ИЗИСКВАНИЯ ЗА СЪХРАНЕНИЕ И РАБОТАТА</b> с указания за потребителя да провери визуално продукта преди употреба за признаци на изтичане и да не използва продукта, ако има доказателства за изтичане.</p> <p>Добавен е уеб адресът на Roche <a href="http://www.roche.com">www.roche.com</a>.</p> <p>Актуализирана е страницата с хармонизирани символи.</p> <p>Моля, свържете се с местния представител на Roche, ако имате някакви въпроси.</p> |



Roche Molecular Systems, Inc.  
1080 US Highway 202 South  
Branchburg, NJ 08876 USA  
[www.roche.com](http://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  
Jaguare, Building 10  
05321-010 São Paulo, SP Brazil

#### **Търговски марки и патенти**

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

©2019 Roche Molecular Systems, Inc.

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

07941706001-04



Roche Diagnostics GmbH  
Sandhofer Str. 116  
68305 Mannheim  
Germany



Понастоящем върху етикетите на PCR диагностичните продукти на Roche се използват следните символи.



Спомагателен софтуер



Код на партидата



Оторизиран представител  
в Европейската Общност



Биологичен риск



Информационен лист  
с баркодовете



Каталожен номер



Вижте инструкциите за употреба



Само за оценка на  
IVD характеристиките



Съдържа количество,  
достатъчно за <n> теста



Долна граница на зададения  
диапазон



Съдържание на кита



Производител



Дистрибутор



Да се съхранява на тъмно



Медицински уред за *in vitro*  
диагностика



Температурна граница



Файл за дефиниране на теста



Годен до



Горна граница на зададения  
диапазон



Глобален номер на търговската  
единица



Дата на производство

Rx Only

Само за САЩ: федералното  
законодателство ограничава  
продажбата на това устройство  
от или по поръчка на лекар.



Този продукт отговаря на изискванията на European Directive 98/79/EC  
за медицински устройства за *in vitro* диагностика.