

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



PARA UTILIZAÇÃO EM 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

ÍNDICE

UTILIZAÇÃO PRETENDIDA	1
RESUMO E EXPLICAÇÃO DO TESTE	2
PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO	2
REAGENTES	4
ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES DE PROCEDIMENTO	6
REQUISITOS DE ARMAZENAMENTO E MANUSEAMENTO	7
MATERIAIS FORNECIDOS	8
MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS	8
COLHEITA, TRANSPORTE E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS	9
INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO	9
CONTROLO DE QUALIDADE	12
RESULTADOS	13
LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO	14
SUBSTÂNCIAS INTERFERENTES	15
AValiação DO DESEMPENHO NÃO CLÍNICO	16
BIBLIOGRAFIA	21

UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

O teste qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 é um teste qualitativo de amplificação de ácidos nucleicos *in vitro*, destinado à detecção dos genótipos 1 a 6 do ARN do vírus da hepatite C (HCV) em soro ou em plasma EDTA humano, utilizando o equipamento COBAS® AmpliPrep para o processamento automático de amostras e o analisador COBAS® TaqMan® ou o analisador COBAS® TaqMan® 48 para a amplificação e detecção automática. O teste qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 está indicado para doentes que têm evidência clínica e/ou evidência bioquímica de doença hepática e evidência de anticorpos para infecção por HCV, e dos quais se suspeita que estejam activamente infectados com o HCV. O teste pode ser utilizado para confirmar amostras positivas para anticorpos. A detecção de ARN do HCV indica que o vírus está em replicação e, por conseguinte, é uma evidência de infecção activa.

O teste qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 não se destina a ser utilizado como teste de rastreio para determinar a presença do HCV no sangue ou em produtos derivados do sangue.

RESUMO E EXPLICAÇÃO DO TESTE

O vírus da hepatite C é considerado como o principal agente etiológico responsável por 90 a 95% dos casos de hepatite pós-transfusional¹⁻⁴. O HCV é um vírus ARN de cadeia simples, polaridade positiva, apresentando um genoma de aproximadamente 9.500 nucleótidos que codificam 3.000 aminoácidos. Enquanto vírus transmitido por via sanguínea, o HCV pode ser transmitido através do sangue e de produtos derivados do sangue. A adopção generalizada de medidas de rastreio de HCV no sangue, reduziu significativamente o risco de hepatite associada a transfusões sanguíneas. A incidência de infecção por HCV é mais elevada em associação com o abuso de drogas por via intravenosa e, em menor grau, com outras exposições percutâneas⁴. A prevalência global de infecção por HCV, segundo determinação por imunoserologia, varia entre 0,6%, no Canadá, e 1,5%, no Japão⁵. As taxas de depuração viral espontânea em indivíduos expostos são muito variáveis; foram observadas taxas entre 10 e 60% quando medidas clinicamente por normalização das enzimas hepáticas e depuração de ARN do HCV do plasma⁶.

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

Alternativamente, a detecção de ARN do HCV por testes de ácido nucleico poderá fornecer evidência de infecção actual. Utilizando testes de ácido nucleico, é possível detectar viremia do HCV anterior à soroconversão imunológica^{6,7}. Uma vez que os testes de ácido nucleico conseguem detectar ARN do HCV directamente, ou seja, independentemente do estado imunológico do doente, um teste com base em ácidos nucleicos constitui um meio valioso para a detecção de ARN do HCV em doentes com insuficiência imunológica⁸.

PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

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

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

Preparação de Amostras

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

Transcrição reversa e amplificação por PCR

O teste qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 utiliza transcrição reversa do ARN do HCV para produzir ADN complementar (cADN) e amplificação por PCR do cADN utilizando iniciadores que definem uma sequência dentro da região 5' não traduzida, altamente conservada do genoma do HCV⁹. A sequência de nucleótidos dos iniciadores foi otimizada para se obter uma amplificação comparável dos genótipos 1 a 6 do HCV. A reacção de transcrição reversa e amplificação por PCR é efectuada com uma mistura otimizada de enzimas termoestáveis recombinantes: polimerases do ADN Z05 e Z05D. Na presença de manganês (Mn^{2+}) e sob condições de tamponamento apropriadas, a Z05 e a Z05D apresentam uma actividade simultaneamente de transcriptase reversa e de polimerase do ADN. Isto permite que a transcrição reversa e a amplificação por PCR ocorram em conjunto com a detecção em tempo real do amplicon.

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

Amplificação do Alvo

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

Amplificação selectiva

No teste qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0, a amplificação selectiva do ácido nucleico alvo da amostra é conseguida com a utilização de uma enzima AmpErase (uracil-N-glicosilase) e de trifosfato de desoxiuridina (dUTP). A enzima AmpErase reconhece e catalisa a destruição de cadeias de ADN que contêm desoxiuridina¹⁰, mas não as de ADN que contêm desoxitimidina. A desoxiuridina não se encontra em ADN existente na natureza, mas está sempre presente no amplicon, devido ao uso de trifosfato de desoxiuridina como um dos dNTPs do reagente de Mistura Principal; por conseguinte, o amplicon é o único que contêm desoxiuridina. A desoxiuridina torna o amplicon contaminante susceptível à destruição pela enzima AmpErase antes da amplificação do ADN alvo. Igualmente, qualquer produto não específico formado após a activação inicial da Mistura Principal pelo manganês é destruído pela enzima AmpErase. A enzima AmpErase, que está incluída no reagente de Mistura Principal, catalisa a clivagem de ADN contendo desoxiuridina em resíduos de desoxiuridina, abrindo a cadeia de desoxirribose na posição C1. Quando aquecida no primeiro passo do ciclo térmico, a cadeia de ADN do amplicon quebra-se na posição da desoxiuridina, tornando assim o ADN não amplificável. A enzima AmpErase permanece inactiva durante um longo período de tempo uma vez exposta a temperaturas acima dos 55 °C, ou seja, durante os passos de ciclismo térmico, pelo que não destrói o amplicon alvo formado durante toda a reacção de PCR.

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

O teste qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 utiliza tecnologia de PCR em tempo real^{14,15}. A utilização de sondas fluorescentes duplamente marcadas permite a detecção em tempo real da acumulação de produtos da PCR, monitorizando a intensidade da emissão dos corantes sinalizadores fluorescentes libertados durante o processo de amplificação. As sondas consistem em sondas oligonucleotídicas específicas do HCV e do CI do HCV com um corante sinalizador e um corante supressor. No teste qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0, as sondas do HCV e do CI do HCV estão marcadas com diferentes corantes sinalizadores fluorescentes. Quando estas sondas estão intactas, a fluorescência do corante sinalizador é suprimida pela proximidade do corante supressor devido aos efeitos de transferência de energia do tipo Förster. Durante a PCR, a sonda hibridiza-se para uma sequência alvo e é clivada pela actividade da nuclease 5' → 3' das polimerases do ADN Z05 e Z05D termoestáveis. Uma vez libertados e separados os corantes de sinalização e de supressão, a supressão deixa de ocorrer, e é aumentada a actividade fluorescente do corante sinalizador. As amplificações do ARN do HCV e do ARN do CI do HCV são determinadas independentemente a diferentes comprimentos de onda. Este processo é repetido durante um número designado de ciclos, sendo a intensidade da emissão dos corantes sinalizadores individuais aumentada eficazmente com cada ciclo, permitindo a identificação independente do ARN do HCV e do ARN do CI do HCV.

Em processos de amplificação de ácidos nucleicos, a eficiência pode ser reduzida por inibidores que possam estar presentes na amostra. O CI do HCV foi adicionado ao teste qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 para permitir a identificação das amostras processadas que contêm substâncias passíveis de interferir com a amplificação por PCR. O CI do HCV é uma estrutura de armoured RNA (aRNA) não infecciosa que contém fragmentos de sequências de HCV com locais de ligação do iniciador idênticos aos do ARN alvo do HCV e uma região única de ligação da sonda que permite que o amplicon do CI do HCV se distinga do amplicon alvo do HCV. É utilizado como um controlo da extracção e amplificação de cada amostra processada independentemente.

Durante a fase de prolongamento da PCR no analisador COBAS® TaqMan® ou no analisador COBAS® TaqMan® 48, as amostras são iluminadas e excitadas por luz filtrada, e são recolhidos dados de fluorescência das emissões filtradas para cada amostra. As leituras de cada amostra são então corrigidas tendo em conta as flutuações de equipamentos. Estas leituras de fluorescência são enviadas pelo equipamento para o software AMPLILINK e armazenadas numa base de dados. Verificações prévias são utilizadas para determinar se os dados de ARN do HCV e de ARN do CI do HCV representam conjuntos válidos, sendo gerados alarmes quando os dados se encontram fora dos limites predefinidos. Depois de concluídas e aprovadas todas as verificações prévias, as leituras de fluorescência são processadas para gerar valores de Ct para o ARN do HCV e para o ARN do CI do HCV. Os resultados são indicados como positivos ou negativos.

REAGENTES

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

HCVQLV2

72 testes

HCV QL v2.0 CS1

(Cassete de Reagente de Partículas Magnéticas de Vidro HCV)

Partículas magnéticas de vidro

Tampão Tris

0,09% de azida sódica

0,1% de metilparabeno

1 x 72 testes

1 x 7,0 ml

HCV QL v2.0 CS2

(Cassete de Reagente de Lise do HCV)

Citrato de sódio dihidratado

42,5% de tiocianato de guanidina

< 6% de polidocanol

0,9% de ditiotretol

1 x 72 testes

1 x 78,0 ml

HCV QL v2.0 CS3

1 x 72 testes

Cassete Multi-Reagente de HCV contendo:

Pase

1 x 3,8 ml

(Solução de proteinase)

Tampão Tris

< 0,05% de EDTA

Cloreto de cálcio

Acetato de cálcio

- 7,8% de Proteinase

Glicerol

EB

1 x 8,1 ml

(Tampão de eluição)

Tampão base Tris

0,09% de azida sódica

HCV QL v2.0 CS4

1 x 72 testes

Cassete de Reagente Específica de Teste HCV contendo:

IC

1 x 3,6 ml

(Controlo interno do HCV)

Tampão Tris

EDTA

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

< 0,001% de estrutura de Armored RNA do HCV contendo sequências de ligação do iniciador do HCV e uma região única de ligação da sonda

(ARN não infeccioso em bacteriófagos MS2)

0,05% de azida sódica

MMX

1 x 3,5 ml

(Mistura Principal HCV)

Tampão de tricina

Acetato de potássio

Hidróxido de potássio

< 20% de sulfóxido de dimetilo

Glicerol

< 0,004% de dATP, dCTP, dGTP, dUTP

< 0,002% de iniciadores a montante e a jusante para a região 5' UTR (não traduzida) do HCV

< 0,001% de sondas oligonucleotídicas de marcação fluorescente específicas para o HCV e para o Controlo Interno do HCV

< 0,001% de aptâmero oligonucleotídico

< 0,05% das polimerases do ADN Z05 e Z05D

(de origem microbiana)

< 0,1% de enzima de AmpErase (uracil-N-glicosilase)

(de origem microbiana)

0,09% de azida sódica

Mn²⁺

1 x 19,8 ml

(Solução de Manganês COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®)

< 0,5% de acetato de manganês

Ácido acético glacial

0,09% de azida sódica

HCV (+) C, v2.0

6 x 0,85 ml

(Controlo Positivo do HCV)

< 0,001% de estrutura de Armored RNA do HCV contendo sequências do HCV (ARN não infeccioso em bacteriófagos MS2)

Plasma humano negativo, não reactivo em testes para anticorpos contra HCV, anticorpos contra HIV-1/2, antígeno p24 do HIV e HBsAg; ARN do HIV-1,

ARN do HCV e ADN do HBV não detectáveis por métodos de PCR

0,1% de conservante ProClin® 300

CTM (-) C

6 x 1,0 ml

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

Plasma humano negativo, não reactivo em testes para anticorpos contra HCV,
anticorpos contra HIV-1/2, antígeno p24 do HIV e HBsAg; ARN do HIV-1,
ARN do HCV e ADN do HBV não detectáveis por métodos de PCR

0,1% de conservante ProClin® 300

HCV (+) C, v2.0 Clip

1 x 6 Clipes

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

HCV (-) C, v2.0 Clip

1 x 6 Clipes

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

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

1 x 5,1 l

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

PG WR

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

Citrato de sódio dihidratado

< 0,1% de N-Metilisotiazolona-HCl

ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES DE PROCEDIMENTO

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

- A. PARA UTILIZAÇÃO EM DIAGNÓSTICO *IN VITRO*.
- B. Este teste destina-se a ser utilizado com plasma ou soro humano colhido no anticoagulante EDTA.
- C. Não pipetar com a boca.
- D. Não comer, beber ou fumar em áreas de trabalho laboratorial. Usar luvas protectoras descartáveis, batas de laboratório e protecção para os olhos quando manusear amostras e reagentes do kit. Lavar cuidadosamente as mãos após manusear amostras e reagentes do teste.
- E. Evite a contaminação microbiana e por ribonuclease dos reagentes quando remover as alíquotas dos frascos de controlo.
- F. Recomenda-se a utilização de pipetas e de pontas de pipeta isentas de RNase esterilizadas e descartáveis.
- G. Não misture controlos de lotes diferentes nem de frascos diferentes do mesmo lote.
- H. Não misture cassetes de reagente ou controlos de kits diferentes.
- I. Não abra cassetes COBAS® AmpliPrep, nem troque, misture, retire ou acrescente frascos.
- J. Elimine os reagentes não usados, resíduos e amostras em conformidade com os regulamentos nacionais, federais, estaduais e locais.
- K. Não utilize os kits fora do prazo de validade.
- L. Estão disponíveis Folhas de Dados de Segurança (SDS, Safety Data Sheets) que podem ser solicitadas ao representante local da Roche.

- M. As amostras e os controlos deverão ser manipulados como se fossem infecciosos, utilizando procedimentos de laboratório seguros, tais como os delineados em *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*¹¹ e no Documento M29-A3¹² do CLSI. Limpe e desinfete cuidadosamente todas as superfícies de trabalho com uma solução recentemente preparada de hipocloreto de sódio a 0,5 % em água desionizada ou destilada.
- N. Os **CTM (-) C** e **HCV (+) C, v2.0** contêm plasma humano derivado do sangue humano. O material de origem foi submetido a testes e considerado como não reactivo para a presença de antígeno de superfície da Hepatite B (HBsAg), anticorpos contra o HIV-1/2 e o HCV, e antígeno p24 do HIV. Os testes de Plasma Humano Negativo através de métodos PCR não mostraram quaisquer ARN de HIV-1, ARN de HCV ou ADN de HBV detectáveis. Nenhum método de teste conhecido pode oferecer uma garantia completa de que os produtos derivados do sangue humano não transmitirão agentes infecciosos. Por conseguinte, todos os materiais de origem humana, incluindo os **CTM (-) C** e **HCV (+) C, v2.0**, deverão ser considerados como potencialmente infecciosos.
- O. Os **MPG, EB, IC, Mn²⁺** e **MMX** contêm azida sódica. A azida sódica pode reagir com tubagens de chumbo e de cobre, produzindo azidas metálicas altamente explosivas. Ao eliminar soluções com azida sódica pela canalização do laboratório, lave os canos com água em abundância, de modo a evitar a acumulação de azidas.
- P. Use protecção para os olhos, batas de laboratório e luvas descartáveis quando manusear qualquer reagente. Evitar o contacto destes materiais com a pele, olhos ou membranas mucosas. Se ocorrer contacto, lavar imediatamente com água em abundância. Caso não seja efectuado tratamento, podem surgir queimaduras. Caso ocorra derramamento destes reagentes, dilua com água antes de limpar.
- Q. Não permita que **HCV QL v2.0 CS2** e desperdícios líquidos incluindo Unidades de Processamento de Amostras (SPUs) COBAS® AmpliPrep usadas do equipamento COBAS® AmpliPrep, que contêm tiocianato de guanidina, entrem em contacto com solução de hipocloreto de sódio (líxivia). Estas misturas podem produzir um gás altamente tóxico.

REQUISITOS DE ARMAZENAMENTO E MANUSEAMENTO

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

MATERIAIS FORNECIDOS

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

HCVQLV2

HCV QL v2.0 CS1

(Cassete de Reagente de Partículas Magnéticas de Vidro HCV)

HCV QL v2.0 CS2

(Cassete de Reagente de Lise do HCV)

HCV QL v2.0 CS3

(Cassete de Multi-Reagentes do HCV)

HCV QL v2.0 CS4

(Cassete de Reagente Específica de Teste HCV)

HCV (+) C, v2.0

(Controlo positivo do HCV)

CTM (-) C

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

HCV (+) C, v2.0 Clip

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

HCV (-) C, v2.0 Clip

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

COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® Wash Reagent

Reagente de Lavagem COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®

PG WR

PG WR

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

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

Equipamentos e Software

- Equipamento COBAS® AmpliPrep
 - Analisador COBAS® TaqMan® ou analisador COBAS® TaqMan® 48
 - Docking Station (Estação de Ancoragem) - (opcional)
 - Equipamento **cobas p 630** (opcional)
 - Software AMPLILINK versão série 3.3 ou versão série 3.4
 - Unidade de controlo para o software AMPLILINK, com impressora
 - Manuais do equipamento e do software:
 - Manual do equipamento COBAS® AmpliPrep para utilização com o software AMPLILINK versão série 3.3 ou versão série 3.4
 - Manual do equipamento para o analisador COBAS® TaqMan® para utilização com o software AMPLILINK versão série 3.3 ou versão série 3.4
 - Manual do equipamento para o analisador COBAS® TaqMan® 48 para utilização com o software AMPLILINK versões série 3.3 e 3.4
 - Manual de Aplicação do software AMPLILINK Versão Série 3.3 para utilização com o equipamento COBAS® AmpliPrep, o analisador COBAS® TaqMan®, o analisador COBAS® TaqMan® 48, o analisador COBAS® AMPLICOR e o equipamento **cobas p 630**
- ou
- Manual da Aplicação do Software AMPLILINK Versão Série 3.4
 - Opcional: manual do Operador do equipamento **cobas p 630**, versão do software 2.2

- Ficheiro de Definição de Teste (TDF). Para o nome e a versão actual do TDF, consulte o cartão informativo do produto fornecido no kit.

Outros materiais

- Rack de amostras (rack SK 24)
- Rack de reagentes
- Rack de SPUs
- Suporte-K
- Transportador de suporte-K
- Rack de suportes-K
- Pipetas com pontas com barreira para aerossóis ou de deslocamento positivo isentas de RNase (capacidade de 1000 µl); a precisão das pipetas deve situar-se dentro de 3% do volume indicado. Devem ser usadas pontas com barreira para aerossóis ou de deslocamento positivo e isentas de RNase para impedir a contaminação cruzada da amostra e do amplicon.
- Luvas descartáveis isentas de pó
- Misturador de agitação forte

Produtos descartáveis

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

COLHEITA, TRANSPORTE E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS

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

Colheita e Armazenamento de Amostras

O teste qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 destina-se a ser utilizado com amostras de soro ou plasma EDTA. O sangue deverá ser colhido em Tubos de Separação de Soro SST®, Tubos de Preparação de Plasma BD Vacutainer® PPT™ para métodos de teste de diagnóstico molecular ou em tubos esterilizados utilizando EDTA (topo lilás) como anticoagulante. Para o manuseamento dos tubos de colheita, siga as instruções do fabricante. As amostras acabadas de colher (sangue total) poderão ser conservadas entre 2 a 25 °C durante até 24 horas antes da centrifugação. Depois da centrifugação, transfira o soro ou plasma EDTA para um tubo de polipropileno esterilizado. Recomenda-se que as amostras sejam armazenadas em alíquotas de aproximadamente 1.000 µl, em tubos de polipropileno esterilizados de 2,0 ml, com tampas de enroscar (tais como os micro tubos de 2 ml com tampa de enroscar da Sarstedt). As amostras de soro ou plasma EDTA podem ser armazenadas:

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

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

Transporte de Amostras

O transporte de sangue total, soro ou plasma EDTA deve obedecer às regulamentações nacionais, federais, estaduais e locais relativas ao transporte de agentes etiológicos¹³. O sangue total deve ser transportado entre 2 e 25 °C e centrifugado no prazo de 24 horas após a colheita. O plasma EDTA ou o soro podem ser transportados entre 2 °C e 8 °C ou congelados entre -20 °C e -80 °C.

INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

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

Tamanho do lote e Configuração

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

Preparação de Amostras e Controlos

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

Configuração do equipamento COBAS® AmpliPrep

Parte A. Manutenção e Purga

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

Parte B. Carregamento de Cassetes de Reagente

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

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

Parte C. Carregamento de Produtos Descartáveis

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

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

- C1. Coloque as SPU(s) no(s) rack(s) de SPU(s) e carregue a(s) rack(s) na posição de rack **J, K** ou **L** do equipamento COBAS® AmpliPrep.
- C2. Consoante a configuração utilizada, carregue rack(s) cheia(s) de tubos-K na posição de rack **M, N, O** ou **P** do equipamento COBAS® AmpliPrep.
- C3. Carregue rack(s) cheia(s) de pontas-K na posição de rack **M, N, O** ou **P** do equipamento COBAS® AmpliPrep.
- C4. Consoante a configuração utilizada, carregue suportes-K em rack(s) de suportes-K na posição de rack **M, N, O** ou **P** do equipamento COBAS® AmpliPrep.

Parte D. Pedido e Carregamento de Amostras

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

Parte E. Início da execução no equipamento COBAS® AmpliPrep

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

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

F1. Verifique se existem alarmes ou mensagens de erro.

F2. Retire as amostras e os controles processados do equipamento COBAS® AmpliPrep em racks de amostras (para o analisador COBAS® TaqMan® sem Estação de Acoplagem) ou em racks de suportes-K (para o analisador COBAS® TaqMan® 48), consoante a configuração.

F3. Remova os desperdícios do equipamento COBAS® AmpliPrep.

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

Amplificação e detecção

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

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

Parte G. Carregamento de Amostras Processadas

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

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

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

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

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

I2. Retire os tubos-K usados do analisador COBAS® TaqMan® ou do analisador COBAS® TaqMan® 48.

CONTROLO DE QUALIDADE

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

Não existe qualquer requisito relativamente à posição dos controlos no suporte de amostras.

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

Controlo Negativo

O **CTM (-) C** deve produzir um resultado "Negative". Se o **CTM (-) C** for assinalado com um alarme de inválido, todo o lote é considerado inválido. Todo o processo deverá ser repetido (preparação de amostras e controlos, amplificação e detecção). Se o **CTM (-) C** for consistentemente inválido em vários lotes, contacte o seu representante local da Roche para obter assistência técnica.

Controlo Positivo

O **HCV (+) C, v2.0** deve produzir um resultado "Positive". Se o **HCV (+) C, v2.0** for assinalado com um alarme de inválido, todo o lote é considerado inválido. Todo o processo deverá ser repetido (preparação de amostras e controlos, amplificação e detecção). Se o **HCV (+) C, v2.0** for consistentemente inválido em vários lotes, contacte o seu representante local da Roche para obter assistência técnica.

RESULTADOS

O analisador **COBAS® TaqMan®** ou o analisador **COBAS® TaqMan® 48** determina automaticamente a presença de ARN do HCV das amostras e controlos.

Software AMPLILINK:

- Determina o Ct do ARN do HCV e do ARN do CI do HCV.
- Determina a presença de ARN do HCV e de ARN do CI do HCV com base nos valores de Ct do ARN do HCV e do ARN do CI do HCV.

Validação do lote:

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

Para pedidos de controlo, é efectuada uma verificação para determinar se o valor de Ct do controlo está dentro do respectivo intervalo específico. Se o valor de Ct do controlo ficar fora do seu intervalo, é gerado um alarme para indicar que o controlo falhou.

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

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

Controlo Negativo:

Alarme	Resultado	Interpretação
NC_INVALID	Invalid	Um resultado inválido ou o resultado do controlo negativo não é negativo.

Controlo Positivo do HCV:

Alarme	Resultado	Interpretação
PC_INVALID	Invalid	Um resultado inválido ou o resultado do controlo positivo não é positivo.

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

Interpretação dos resultados:

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

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

Os resultados de amostras são interpretados conforme se segue:

Resultado	Interpretação
Negative	O valor de Ct do HCV está acima do limite para o ensaio ou não foi obtido nenhum valor de Ct do HCV. Os resultados devem ser reportados como "ARN do HCV não detectado".
Positive	Os resultados devem ser reportados como "ARN do HCV detectado".

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

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

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

SUBSTÂNCIAS INTERFERENTES

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

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

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

AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO NÃO CLÍNICO

A. Limite de Detecção

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

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

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

Título de Entrada (ARN do HCV em UI/ml)	Número de Exemplares Válidos	Número de Positivos	Taxa de Positividade (%)
50	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 por PROBIT a uma taxa de positividade de 95%	12 UI/ml Intervalo de confiança de 95%: 10 a 13 UI/ml		
LOD por taxa de positividade	15 UI/ml		

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

Título de Entrada (ARN do HCV em UI/ml)	Número de Exemplares Válidos	Número de Positivos	Taxa de Positividade (%)
50	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 por PROBIT a uma taxa de positividade de 95%	11 UI/ml Intervalo de confiança de 95%: 10 a 13 UI/ml		
LOD por taxa de positividade	15 UI/ml		

B. Precisão

A precisão do teste qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 foi determinada por análise de diluições em série do Padrão Internacional da OMS para o ARN do vírus da Hepatite C para Ensaios de Tecnologia de Ácidos Nucleicos, em soro ou plasma EDTA humano negativo para o HCV.

Foram testados 2 níveis de diluição (5 UI/ml e 50 UI/ml) em até 168 exemplares, em 12 execuções, em 4 dias. Cada amostra foi submetida ao procedimento completo do teste qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0, incluindo preparação de amostras, amplificação e detecção. O estudo foi realizado utilizando 3 lotes de reagentes do teste qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0. Todos os dados de precisão válidos foram avaliados calculando a taxa de positividade em % para cada membro do painel por lote de reagente (ambas as matrizes combinadas).

O teste qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 demonstrou um desempenho consistente a níveis de concentração de 5 UI/ml e 50 UI/ml para amostras de plasma EDTA e soro em todos os 3 lotes de reagente testados (Tabela 3).

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

Concentração nominal (UI/ml)	Taxa de positividade (%)		
	Lote 1	Lote 2	Lote 3
5	74	70	74
50	100	100	100

C. Inclusividade

O desempenho do teste qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 em genótipos do HCV foi avaliado verificando o Limite de Detecção dos genótipos 1 a 6.

Foram diluídas amostras clínicas de ARN do HCV de 8 diferentes genótipos/subtipos (1a, 1b, 2a, 2b, 3, 4, 5 e 6) a 3 diferentes níveis de concentração em plasma EDTA ou em soro, e foi efectuada uma determinação da taxa de positividade para cada nível, com até 63 exemplares. O estudo foi realizado utilizando 1 lote de reagentes do teste qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0.

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

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

Genótipo	5 UI/ml			15 UI/ml			45 UI/ml		
	N.º de exemplares válidos	N.º de positivos	Taxa de positividade (%)	N.º de exemplares válidos	N.º de positivos	Taxa de positividade (%)	N.º de exemplares válidos	N.º de positivos	Taxa de positividade (%)
1a	63	44	70	63	63	100	63	63	100
1b	63	47	75	63	62	98	63	63	100
2a	63	43	68	63	61	97	62	61	98
2b	62	57	92	62	62	100	62	62	100
3	62	58	94	63	63	100	62	62	100
4	63	43	68	63	62	98	63	63	100
5	63	46	73	62	62	100	62	62	100
6	63	54	86	62	62	100	63	63	100

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

Genótipo	5 UI/ml			15 UI/ml			45 UI/ml		
	N.º de exemplares válidos	N.º de positivos	Taxa de positividade (%)	N.º de exemplares válidos	N.º de positivos	Taxa de positividade (%)	N.º de exemplares válidos	N.º de positivos	Taxa de positividade (%)
1a	63	45	71	62	62	100	63	63	100
1b	62	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. Sensibilidade do diagnóstico

A sensibilidade do diagnóstico do teste qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 foi determinada analisando amostras individuais de plasma EDTA ou soro positivas para o ARN do HCV (337 resultados totais) com 2 lotes de reagentes do teste qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0. Todas as amostras tiveram resultados positivos para o ARN do HCV. Neste painel, a sensibilidade do diagnóstico do teste qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 é de 100% (limite inferior de confiança de 95% unilateral: $\geq 99,1\%$).

Além disso, a sensibilidade do diagnóstico do teste qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 foi avaliada durante a seroconversão. Os membros de 10 painéis de seroconversão do HCV disponíveis no mercado, cada um destes colhido de um dador de plasma individual durante um período de seroconversão de anticorpos do HCV, foram testados com um lote de reagentes do teste qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0. Quando comparado com os imuno-ensaios enzimáticos (IEE) Abbott HCV 2.0 de referência serológica, o teste qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 detectou o HCV mais cedo em 10 dos 10 painéis de seroconversão. Quando comparado com outro teste NAT (o teste COBAS® AMPLICOR HCV, v2.0), o teste qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 detectou o ARN do HCV mais cedo (em 2 dos 10 painéis) ou no mesmo dia depois da data da primeira colheita de sangue (em 8 dos 10 painéis).

E. Especificidade

A especificidade do teste qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 foi determinada analisando amostras de soro ou de plasma EDTA negativas para o ARN do HCV e soro-negativas, obtidas de dadores de sangue. Foram testadas amostras individuais de plasma EDTA e soro (500 resultados totais) com 2 lotes de reagentes do teste qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0. 499 amostras tiveram resultados negativos para o ARN do HCV. Neste painel, a especificidade do teste qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 é de 99,8% (limite inferior de confiança de 95% unilateral: $\geq 99,1\%$).

F. Especificidade analítica

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

Tabela 6
Amostras de Especificidade Analítica

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

G. Desempenho comparado ao Teste COBAS® AMPLICOR HCV, v2.0

O desempenho do teste qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 e o desempenho do Teste COBAS® AMPLICOR HCV, v2.0 foram comparados por análise de amostras de soro e plasma EDTA de doentes infectados com o HCV. Foi analisado em duplicado um total de 463 amostras dos genótipos 1 a 6 de plasma EDTA e genótipos 1 a 4 de soro. Os resultados de 436 amostras de plasma EDTA e de soro foram positivas e estavam dentro do intervalo de detecção de ambos os testes, levando a uma concordância positiva de 100% entre o teste qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 e o Teste COBAS® AMPLICOR HCV, v2.0. Foram excluídos da análise de dados os resultados de 27 amostras; 3 amostras não possuíam volume suficiente para o Teste COBAS® AMPLICOR HCV, v2.0, 4 amostras produziram resultados de "Target Not Detected" em todas as medições de ambos os testes, 8 amostras produziram resultados discrepantes nas 2 réplicas em cada um dos testes, 12 amostras produziram resultados discrepantes entre os dois testes [razão para exclusão: todas estas amostras possuíam concentrações de HCV abaixo do limite de detecção do Teste COBAS® AMPLICOR HCV, v2.0, limite de detecção de plasma (95% de velocidade de detecção): 50 UI/ml, limite de detecção de soro: 60 UI/ml]. Todas as amostras negativas de plasma EDTA e de soro testadas (200 resultados totais) eram válidas e tiveram resultado negativo, levando a uma concordância negativa de 100% entre o teste qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 e o Teste COBAS® AMPLICOR HCV, v2.0.

BIBLIOGRAFIA

1. Choo Q-L., Kuo G, Weiner AJ, Overby LR., Bradley DW and Houghton M. 1989. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis viral genome. *Science* **244**:359-362.
2. Armstrong GL, Wasley A, Simard EP et al. 2006. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1999 through 2002. *Ann Intern Med* **144**:705-714.
3. Rustgi VK. 2007. The epidemiology of hepatitis C infection in the United States. *J Gastroenterol* **42**:513-521.
4. Lauer GM, Walker BD. 2001. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* **345**:41-52.
5. Caruntu FA, 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*. 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.

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



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



Distributed by

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

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, Germany

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

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

Roche Diagnostics
2, Avenue du Vercors
38240 Meylan, France

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

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

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

Marcas comerciais e patentes

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

©2019 Roche Molecular Systems, Inc.

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

07941706001-04



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116
68305 Mannheim
Germany



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



Software auxiliar



Código da corrida



Representante autorizado na Comunidade Europeia



Risco biológico



Folha de dados de códigos de barras



Referência de catálogo



Consulte as instruções de utilização



Apenas para avaliação de desempenho do IVD



Conteúdo suficiente para $<n>$ testes



Limite inferior do intervalo atribuído



Conteúdo do kit



Fabricante



Distribuído por



Armazenar no escuro



Dispositivo médico para diagnóstico *in vitro*



Limite de temperatura



Ficheiro de definição de teste



Prazo de validade



Limite superior do intervalo atribuído



Global Trade Item Number



Data do fabrico

Rx Only

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



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