

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

PER USO DIAGNOSTICO *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

## Indice generale

<b>USO PREVISTO</b> .....	1
<b>RIASSUNTO E SPIEGAZIONE DEL TEST</b> .....	2
<b>PRINCIPI DELLA PROCEDURA</b> .....	2
<b>REAGENTI</b> .....	4
<b>AVVERTENZE E PRECAUZIONI PROCEDURALI</b> .....	6
<b>REQUISITI PER LA MANIPOLAZIONE E LA CONSERVAZIONE</b> .....	7
<b>MATERIALE FORNITO</b> .....	8
<b>MATERIALE NECESSARIO MA NON FORNITO</b> .....	8
<b>PRELIEVO, TRASPORTO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI</b> .....	9
<b>ISTRUZIONI PER L'USO</b> .....	9
<b>CONTROLLO DI QUALITÀ</b> .....	12
<b>RISULTATI</b> .....	13
<b>LIMITAZIONI PROCEDURALI</b> .....	14
<b>SOSTANZE INTERFERENTI</b> .....	15
<b>VALUTAZIONE DELLE PRESTAZIONI NON CLINICHE</b> .....	16
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	21

## USO PREVISTO

Il test qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV v2.0 è un test di amplificazione dell'acido nucleico *in vitro*, destinato alla rilevazione dei genotipi 1-6 dell'RNA del virus dell'epatite C (HCV) in siero o plasma umano trattato con EDTA mediante l'uso dello strumento COBAS® AmpliPrep per la preparazione automatica dei campioni e dell'analizzatore COBAS® TaqMan® o COBAS® TaqMan® 48 per l'amplificazione e la rilevazione automatizzate. Il test qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV v2.0 è indicato per pazienti afflitti da patologia epatica supportata da evidenza clinica e/o biochimica e dalla presenza di anticorpi anti-HCV, oltre che per pazienti afflitti da sospetta infezione attiva da HCV. Il test può essere utilizzato per confermare la positività dei campioni agli anticorpi. La rilevazione dell'RNA di HCV indica che il virus si sta replicando e dimostra pertanto che è in atto un'infezione.

**Il test qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV v2.0 non è destinato all'uso come test di screening per la presenza del virus HCV in sangue o emoderivati.**

## RIASSUNTO E SPIEGAZIONE DEL TEST

Il virus dell'epatite C (HCV) è considerato il principale agente eziologico nel 90-95% dei casi di epatite post-trasfusionale<sup>1-4</sup>. L'HCV è un virus con RNA a singolo filamento a senso positivo, con un genoma di circa 9.500 nucleotidi codificanti per 3.000 aminoacidi. Essendo un virus ematogeno, l'HCV può essere trasmesso dal sangue e dagli emoderivati. L'ampia adozione di misure di screening anti-HCV del sangue ha abbassato in modo significativo il rischio di epatite associata a trasfusioni. L'incidenza dell'infezione da HCV aumenta se è associata ad abuso di stupefacenti per via endovenosa e, in misura minore, ad altre esposizioni percutanee<sup>4</sup>. La prevalenza globale dell'infezione da HCV, determinata con test immunosierologici, varia dallo 0,6% in Canada all'1,5% in Giappone<sup>3</sup>. I tassi di clearance virale spontanea negli individui esposti è altamente variabile; in un 10-60% di casi sono state osservate, mediante misurazione clinica, la normalizzazione degli enzimi epatici e la clearance dell'RNA dell'HCV nel plasma<sup>5</sup>.

Le particelle del virus HCV appartenenti a campioni di sangue infetto non possono essere messe in coltura; pertanto, la presenza di anticorpi anti-HCV in pazienti infettati da HCV ha determinato lo sviluppo di dosaggi immunosierologici specifici per tali anticorpi. La presenza di anticorpi anti-HCV è tuttavia una misura di un'esposizione pregressa all'infezione da HCV, ma non può essere considerata un marker di infezione in atto. La misurazione dei livelli di alanina aminotransferasi (ALT) è considerata un indicatore surrogato dell'infezione da HCV, ma non rappresenta una misura diretta di viremia.

La rilevazione dell'RNA di HCV con i test basati sugli acidi nucleici costituisce un metodo alternativo di ricerca dell'evidenza di un'infezione in atto. I test per la ricerca degli acidi nucleici consentono infatti di rilevare la viremia HCV prima della sieroconversione immunologica<sup>6,7</sup>. Grazie alla capacità di rilevare l'RNA dell'HCV direttamente, ovvero indipendentemente dalla condizione immunologica del paziente, i test basati sugli acidi nucleici sono un valido strumento di ricerca dell'RNA dell'HCV nei pazienti immunocompromessi<sup>8</sup>.

## PRINCIPI DELLA PROCEDURA

Il test qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV v2.0 è un test di amplificazione dell'acido nucleico che consente di rilevare l'RNA del virus dell'epatite C (HCV) nel siero o nel plasma umano trattato con EDTA. Per la preparazione automatizzata dei campioni viene utilizzato lo strumento COBAS® AmpliPrep, mentre per l'amplificazione e la rilevazione automatizzate viene utilizzato l'analizzatore COBAS® TaqMan® oppure l'analizzatore COBAS® TaqMan® 48.

Il test qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV v2.0 si basa su tre procedure principali: (1) preparazione dei campioni per estrarre l'RNA dell'HCV; (2) trascrizione inversa dell'RNA target per generare il DNA complementare (cDNA); (3) amplificazione PCR del cDNA target e simultanea rilevazione delle sonde oligonucleotidiche con doppio marcatore fluorescente scisse e target-specifiche.

### Preparazione dei campioni

Per il test qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV v2.0 viene utilizzata la preparazione automatizzata dei campioni sullo strumento COBAS® AmpliPrep, che si basa su una tecnica generica di cattura con la silice. Il volume iniziale del campione è di 650 µl, mentre per l'analisi occorrono 500 µl di siero o plasma in EDTA. Le particelle del virus HCV vengono lisate tramite incubazione a temperatura elevata con un tampone di lisi/legame caotropico e proteasi, in modo da rilasciare gli acidi nucleici e proteggere l'RNA dell'HCV liberato dalle RNasi nel siero o nel plasma in EDTA. La proteasi e un numero noto di molecole di RNA del Controllo Interno (IC) dell'HCV vengono introdotti in ogni campione insieme al reagente di lisi e alle particelle magnetiche. In seguito la miscela viene incubata e l'RNA dell'HCV e l'RNA dell'IC dell'HCV sono legati alla superficie delle particelle magnetiche. Le sostanze che non formano legami, ad esempio i sali, le proteine e le altre impurità cellulari, vengono eliminate attraverso il lavaggio delle particelle magnetiche. Dopo aver separato le particelle e aver completato le fasi di lavaggio, gli acidi nucleici adsorbiti vengono eluiti a temperatura elevata con una soluzione acquosa. Il campione trattato, che contiene l'RNA dell'HCV e l'RNA dell'IC dell'HCV, viene aggiunto alla miscela di amplificazione e trasferito sull'analizzatore COBAS® TaqMan® o COBAS® TaqMan® 48.

## Trascrizione inversa e amplificazione PCR

Il test qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV v2.0 utilizza la trascrizione inversa dell'RNA dell'HCV in DNA complementare (cDNA) e l'amplificazione PCR del cDNA tramite primer che definiscono una sequenza compresa nella regione altamente conservata della regione 5' non tradotta del genoma dell'HCV<sup>9</sup>. La sequenza nucleotidica dei primer è stata ottimizzata per produrre un'amplificazione comparabile dei genotipi 1-6 dell'HCV. La reazione di trascrizione inversa e di amplificazione mediante PCR viene eseguita tramite una miscela ottimizzata di enzimi ricombinanti termostabili: DNA polimerasi Z05 e Z05D. In presenza di manganese ( $Mn^{2+}$ ) e in condizioni tampone appropriate, le polimerasi Z05 e Z05D manifestano entrambe sia attività di trascrittasi inversa, sia di polimerasi del DNA. Ciò fa sì che sia la trascrizione inversa che l'amplificazione PCR possano avvenire simultaneamente alla rilevazione real-time dell'amplicone.

I campioni trattati vengono aggiunti alla miscela di amplificazione nelle apposite provette (provette K), dove avvengono sia la trascrizione inversa che l'amplificazione PCR. La miscela di reazione viene riscaldata per consentire a un primer a valle (downstream) di appaiarsi in modo specifico (annealing) all'RNA target dell'HCV e all'RNA dell'IC dell'HCV. In presenza di  $Mn^{2+}$  e di un eccesso di deossinucleotidi trifosfati (dNTP), tra i quali i trifosfati di deossiadenosina, deossiguanosina, deossicitidina e deossiridina, le polimerasi Z05 e Z05D estendono i primer appaiati formando un filamento di DNA complementare (cDNA) all'RNA target.

### Amplificazione del target

Dopo la trascrizione inversa dell'RNA target dell'HCV e dell'RNA dell'IQ dell'HCV, il termociclatore nell'analizzatore COBAS® TaqMan® o COBAS® TaqMan® 48 riscalda la miscela di reazione per denaturare gli ibridi RNA:cDNA ed esporre le specifiche sequenze target del primer. A mano a mano che la miscela si raffredda, i primer si appaiano (annealing) al cDNA target. In presenza di  $Mn^{2+}$  e di un eccesso di deossinucleotidi trifosfati (dNTP), le DNA polimerasi termostabili (Z05 e Z05D) estendono i primer appaiati lungo gli stampi target producendo una molecola di DNA a doppio filamento denominata amplicone. L'analizzatore COBAS® TaqMan® o l'analizzatore COBAS® TaqMan® 48 ripete automaticamente questa procedura per un determinato numero di cicli, raddoppiando ad ogni ciclo la quantità di DNA amplicone. Il numero di cicli necessari è pre-programmato nell'analizzatore COBAS® TaqMan® o nell'analizzatore COBAS® TaqMan® 48. L'amplificazione interessa esclusivamente la regione del genoma HCV compresa tra i primer; non viene amplificato l'intero genoma HCV.

### Amplificazione selettiva

L'amplificazione selettiva dell'acido nucleico target dal campione è ottenuta nel test qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV v2.0 grazie all'uso dell'enzima AmpErase (uracil-N-glicosilasi) e del trifosfato di deossiridina (dUTP). L'enzima AmpErase riconosce e catalizza la distruzione dei filamenti di DNA contenenti deossiridina<sup>10</sup>, ma non del DNA contenente deossitimidina. La deossiridina non è presente nel DNA naturale, ma è sempre presente nell'amplicone perché il trifosfato di deossiridina è uno dei dNTP usati nel reagente Master Mix e, di conseguenza, soltanto l'amplicone contiene deossiridina. La deossiridina rende l'amplicone contaminante suscettibile alla distruzione da parte dell'enzima AmpErase prima dell'amplificazione del DNA target. Inoltre qualsiasi prodotto non specifico, formatosi dopo l'attivazione iniziale del Master Mix tramite manganese, viene distrutto dall'enzima AmpErase. L'enzima AmpErase, che è contenuto nel reagente Master Mix, catalizza la scissione del DNA contenente deossiridina a livello dei residui di deossiridina, aprendo la catena di deossiribosio nella posizione C1. Quando viene riscaldata nella prima fase del ciclo termico, la catena di DNA dell'amplicone si spezza in corrispondenza della posizione della deossiridina, rendendo il DNA non amplificabile. L'enzima AmpErase rimane inattivo per un periodo di tempo prolungato dopo essere stato esposto a temperature superiori a 55°C (quindi durante le fasi del ciclo termico), di conseguenza non distrugge l'amplicone target durante il corso della reazione PCR.

## Rilevazione delle sonde oligonucleotidiche con doppio marcatore fluorescente scisse e RNA di HCV

Il test qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV v2.0 utilizza la tecnologia PCR real-time<sup>14,15</sup>. L'uso di sonde fluorescenti con doppio marcatore consente di identificare in tempo reale l'accumulo dei prodotti della PCR, grazie al monitoraggio dell'intensità delle emissioni dei fluorocromi reporter rilasciati durante l'amplificazione. Le sonde sono costituite da oligonucleotidi specifici per l'HCV e per l'IC dell'HCV, marcati con un fluorocromo reporter e un fluorocromo quencher. Nel test qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV v2.0, le sonde dell'HCV e dell'IC dell'HCV sono marcate con fluorocromi reporter differenti. Quando le sonde sono integre, la fluorescenza del fluorocromo reporter viene soppressa dalla vicinanza del fluorocromo quencher per effetto del trasferimento di energia di tipo Förster. Durante la reazione a catena della polimerasi (PCR), la sonda ibridizza ad una sequenza target e viene scissa dall'attività della 5' → 3' nucleasi delle DNA polimerasi Z05 e Z05D termostabili. Non appena i fluorocromi reporter e quencher vengono liberati e si separano, cessa l'attività di soppressione (quenching) mentre si intensifica l'attività fluorescente del fluorocromo reporter. L'amplificazione dell'RNA dell'HCV e dell'RNA dell'IC dell'HCV viene misurata in modo indipendente, a lunghezze d'onda diverse. Questo procedimento viene ripetuto per un numero di cicli predefinito, in ognuno dei quali l'intensità di emissione dei singoli coloranti reporter aumenta consentendo l'identificazione indipendente dell'RNA dell'HCV e dell'RNA dell'IC dell'HCV.

Nei procedimenti di amplificazione degli acidi nucleici, l'efficienza del metodo può essere pregiudicata dalla presenza di inibitori nei campioni. L'IC dell'HCV è stato incluso nel test qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV v2.0 per consentire l'identificazione dei campioni trattati che contengono sostanze potenzialmente interferenti con l'amplificazione PCR. L'IC dell'HCV è un costrutto di Armored RNA (aRNA) non infettivo, contenente frammenti di sequenze di HCV con siti di legame per il primer identici a quelli dell'RNA target dell'HCV e una regione esclusiva di legame per la sonda, che consente di distinguere l'amplicone dell'IC dell'HCV dall'amplicone target dell'HCV. Svolge un ruolo di controllo dell'estrazione e dell'amplificazione per ogni campione trattato in modo indipendente.

Durante la fase di estensione della reazione PCR sull'analizzatore COBAS® TaqMan® o sull'analizzatore COBAS® TaqMan® 48, i campioni subiscono l'azione della luce filtrata e, per ogni campione, vengono raccolti i dati della fluorescenza di emissione a sua volta filtrata. Le letture provenienti da ogni campione vengono quindi corrette per tenere conto delle fluttuazioni strumentali. Queste letture della fluorescenza vengono trasmesse dallo strumento al software AMPLILINK e memorizzate in un database. Vengono eseguite alcune verifiche preliminari per determinare se i dati relativi all'RNA dell'HCV e all'RNA dell'IC dell'HCV rappresentano insieme i dati validi. Se i dati non rientrano nei limiti predefiniti, vengono generati alcuni avvisi (flag). Una volta completate e superate tutte le verifiche preliminari, le letture della fluorescenza vengono elaborate per generare i valori Ct per l'RNA dell'HCV e per l'RNA dell'IC dell'HCV. I risultati possono essere positivi o negativi.

### REAGENTI

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

**HCVQLV2**

**72 test**

(P/N: 05480477 190)

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

(Cassetta reagenti con particelle magnetiche HCV)

Particelle magnetiche

Tampone Tris

0,09% Sodio azide

0,1% Metilparabene

1 x 72 test

1 x 7,0 ml

<b>HCV QL v2.0 CS2</b>	1 x 72 test
(Cassetta reagente di lisi HCV)	1 x 78,0 ml
Diidrato di citrato di sodio	
42,5% Tiocianato di guanidina	
< 6% Polidocanolo	
0,9% Ditiotreitolo	
<b>HCV QL v2.0 CS3</b>	1 x 72 test
Cassetta multireagente HCV contenente:	
<b>Pase</b>	1 x 3,8 ml
(Soluzione proteinasi)	
Tampone Tris	
< 0,05% EDTA	
Cloruro di calcio	
Acetato di calcio	
- 7,8% Proteinasi	
Glicerolo	
<b>EB</b>	1 x 8,1 ml
(Tampone di eluizione)	
Tampone Tris base	
0,09% Sodio azide	
<b>HCV QL v2.0 CS4</b>	1 x 72 test
Cassetta di reagente specifico del test HCV, contenente:	
<b>IC</b>	1 x 3,6 ml
(Controllo Interno HCV)	
Tampone Tris	
EDTA	
< 0,002% Poly rA RNA (sintetico)	
< 0,001% Costrutto di Armored RNA di HCV contenente sequenze di legame per i primer dell'HCV e una regione di legame univoca per la sonda (RNA non infettivo in batteriofago MS2)	
0,05% Sodio azide	
<b>MMX</b>	1 x 3,5 ml
(Master Mix HCV)	
Tampone tricina	
Acetato di potassio	
Iodossido di potassio	
< 20% Dimetil sulfoxide	
Glicerolo	
< 0,004% dATP, dCTP, dGTP, dUTP	
< 0,002% Primer HCV upstream e downstream della regione 5' non tradotta dell'HCV	
< 0,001% Sonde oligonucleotidiche fluorescenti specifiche per l'HCV e per il Controllo Interno dell'HCV	
< 0,001% Aptamero oligonucleotidico	
< 0,05% DNA Polimerasi Z05 e Z05D (batterica)	
< 0,1% Enzima AmpErase (uracil-N-glicosilasi) (batterico)	
0,09% Sodio azide	
<b>Mn<sup>2+</sup></b>	1 x 19,8 ml
(Soluzione di manganese COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®)	
< 0,5% Acetato di manganese	
Acido acetico glaciale	
0,09% Sodio azide	

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

6 x 0,85 ml

(Controllo positivo HCV)

< 0,001% Costrutto di Armored RNA di HCV contenente sequenze di HCV (RNA non infettivo in batteriofago MS2)

Plasma umano negativo, definito non reattivo in base ai test per la determinazione di anticorpi anti-HCV, anticorpi anti-HIV-1/2, antigene p24 di HIV e HBsAg; RNA di HIV-1, RNA di HCV e DNA di HBV non rilevabili con le metodiche PCR

0,1% Conservante ProClin® 300

**CTM (-) C**

6 x 1,0 ml

[Controllo negativo COBAS® TaqMan® (plasma umano)]

Plasma umano negativo, definito non reattivo in base ai test per la determinazione di anticorpi anti-HCV, anticorpi anti-HIV-1/2, antigene p24 di HIV e HBsAg;

RNA di HIV-1, RNA di HCV e DNA di HBV non rilevabili con le metodiche PCR

0,1% Conservante ProClin® 300

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

1 x 6 clip

(Clip con codice a barre per controllo positivo HCV)

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

1 x 6 clip

(Clip con codice a barre per controllo negativo HCV)

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

1 x 5,1 l

Reagente di lavaggio COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®

(P/N: 03587797 190)

**PG WR**

(Reagente di lavaggio COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®)

Diidrato di citrato di sodio

&lt; 0,1% N-Metilisotiazolone-HCl

**AVVERTENZE E PRECAUZIONI PROCEDURALI**

Per qualsiasi procedura di analisi è importante eseguire i test attenendosi alla buona prassi di laboratorio. Data l'elevata sensibilità di questo test, prestare attenzione per evitare la contaminazione di reagenti e miscele di amplificazione.

- A. PER USO DIAGNOSTICO *IN VITRO*.
- B. Questo test è destinato all'uso con plasma o siero umano raccolto in anticoagulante EDTA.
- C. Non pipettare con la bocca.
- D. Evitare di mangiare, bere e fumare nelle aree di lavoro del laboratorio. Durante la manipolazione dei campioni e dei reagenti del kit, indossare guanti monouso protettivi, camici da laboratorio e protezioni per gli occhi. Dopo avere manipolato i campioni e i reagenti del test, lavarsi accuratamente le mani.
- E. Evitare la contaminazione microbica e da ribonucleasi dei reagenti durante il prelievo delle aliquote dai flaconi di controllo.
- F. Si consiglia di usare pipette sterili monouso e puntali privi di ribonucleasi.
- G. Non combinare controlli di lotti diversi o di flaconi diversi dello stesso lotto.
- H. Non mescolare cassette di reagenti o controlli appartenenti a kit diversi.
- I. Non aprire le cassette COBAS® AmpliPrep e non scambiare, mescolare, rimuovere o aggiungere flaconi.
- J. Smaltire i reagenti inutilizzati, i rifiuti e i campioni nel rispetto dei regolamenti locali, regionali e nazionali.
- K. Non utilizzare il kit oltre la data di scadenza.

- L. Le schede di sicurezza (Safety Data Sheets, SDS) sono disponibili su richiesta presso la sede Roche locale.
- M. I campioni e i controlli devono essere manipolati come se fossero infettivi, adottando le procedure di sicurezza del laboratorio delineate in *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*<sup>11</sup> e nel documento CLSI M29-A3<sup>12</sup>. Pulire e disinfettare accuratamente tutte le superfici di lavoro con una soluzione fresca di ipoclorito di sodio allo 0,5% in acqua deionizzata o distillata.
- N. I controlli **CTM (-) C** e **HCV (+) C, v2.0** contengono plasma umano derivato da sangue umano. Il materiale di origine è stato analizzato ed è risultato non reattivo alla presenza dell'antigene di superficie dell'epatite B (HBsAg), degli anticorpi anti-HIV-1/2 e anti-HCV e dell'antigene p24 dell'HIV. L'analisi del plasma umano negativo mediante le tecniche PCR non ha evidenziato la presenza di quantità rilevabili di RNA dell'HIV-1, RNA dell'HCV e DNA dell'HBV. Nessun metodo di analisi attualmente disponibile è in grado di garantire con certezza assoluta che i prodotti derivati da sangue umano non trasmettano agenti infettivi. Di conseguenza tutti i materiali di origine umana, inclusi i controlli **CTM (-) C** e **HCV (+) C, v2.0**, devono essere considerati potenzialmente infettivi.
- O. I reagenti **MGP, EB, IC, Mn<sup>2+</sup>** e **MMX** contengono sodio azide. La sodio azide può reagire con le tubature di piombo e rame formando azidi metalliche fortemente esplosive. Quando le soluzioni contenenti sodio azide vengono smaltite nei livelli del laboratorio, è necessario sciacquare gli scarichi con abbondanti quantità d'acqua per impedire l'accumulo di azidi.
- P. Durante la manipolazione dei reagenti, indossare camici da laboratorio, guanti monouso e una protezione adeguata per gli occhi. Evitare il contatto di questi materiali con la pelle, gli occhi o le membrane mucose. In caso di contatto accidentale, lavare immediatamente con abbondante acqua. Intervenire tempestivamente per prevenire possibili ustioni. In caso di fuoriuscita accidentale di questi reagenti, diluire con acqua prima di asciugare.
- Q. Evitare che il reagente **HCV QL v2.0 CS2** e i rifiuti liquidi, incluse le unità SPU COBAS® AmpliPrep già utilizzate sullo strumento COBAS® AmpliPrep, che contengono tiocianato di guanidina, entrino in contatto con la soluzione di ipoclorito di sodio (candeggina). Tali miscele possono produrre gas altamente tossici.

#### REQUISITI PER LA MANIPOLAZIONE E LA CONSERVAZIONE

- A. Prima dell'uso, ispezionare visivamente ogni cassetta e fiala di reagente per escludere eventuali perdite. In caso di perdite accertate, non utilizzare il materiale per il test.
- B. Conservare i reagenti **HCV QL v2.0 CS1**, **HCV QL v2.0 CS2**, **HCV QL v2.0 CS3** e **HCV QL v2.0 CS4** a 2-8°C. Se sigillati, questi reagenti sono stabili fino alla data di scadenza indicata. Dopo l'apertura, questi reagenti sono stabili per 70 giorni a 2-8°C o fino alla data di scadenza indicata, se precedente. I reagenti **HCV QL v2.0 CS1**, **HCV QL v2.0 CS2**, **HCV QL v2.0 CS3** e **HCV QL v2.0 CS4** possono essere utilizzati per un massimo di 96 ore cumulative sullo strumento COBAS® AmpliPrep. I reagenti devono essere conservati a 2-8°C tra un ciclo dello strumento e il successivo.
- C. Conservare i controlli **HCV (+) C, v2.0** e **CTM (-) C** a 2-8°C. I controlli restano stabili fino alla data di scadenza indicata. Dopo l'apertura, è necessario smaltire le parti inutilizzate.
- D. Conservare a 2-30°C le clip con il codice a barre [**HCV (+) C, v2.0 Clip** e **HCV (-) C, v2.0 Clip**].
- E. Conservare a 2-30°C il reagente **PG WR**. Il reagente **PG WR** è stabile fino alla data di scadenza indicata. Dopo l'apertura, il reagente è stabile per 28 giorni a 2-30°C o fino alla data di scadenza, se precedente.

## MATERIALE FORNITO

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

HCVQLV2

#### HCV QL v2.0 CS1

(Cassetta reagenti con particelle magnetiche HCV)

#### HCV QL v2.0 CS2

(Cassetta reagente di lisi HCV)

#### HCV QL v2.0 CS3

(Cassetta multireagente HCV)

#### HCV QL v2.0 CS4

(Cassetta reagente specifico del test HCV)

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

(Controllo positivo HCV)

#### CTM (-) C

[Controllo negativo COBAS® TaqMan® (plasma umano)]

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

(Clip con codice a barre per controllo positivo HCV)

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

(Clip con codice a barre per controllo negativo HCV)

### COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® Wash Reagent

Reagente di lavaggio COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®

PG WR

#### PG WR

(Reagente di lavaggio COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®)

## MATERIALE NECESSARIO MA NON FORNITO

### Strumentazione e software

- Strumento COBAS® AmpliPrep
  - Analizzatore COBAS® TaqMan® o analizzatore COBAS® TaqMan® 48
  - Docking Station (opzionale)
  - **cobas p** 630 instrument (opzionale)
  - AMPLILINK Software versione serie 3.3 o 3.4
  - Unità di controllo per l'AMPLILINK Software, con stampante
  - Manuali dello strumento e del software:
    - Manuale dello strumento - COBAS® AmpliPrep Instrument per l'uso con l'AMPLILINK Software versione serie 3.3 e 3.4
    - Manuale dello strumento - COBAS® TaqMan® Analyzer per l'uso con l'AMPLILINK Software versione serie 3.3 e 3.4
    - Manuale dello strumento - COBAS® TaqMan® 48 Analyzer per l'uso con l'AMPLILINK Software versione serie 3.3 e 3.4
    - Manuale dell'applicazione - AMPLILINK Software versione serie 3.3 per l'uso con il COBAS® AmpliPrep Instrument, il COBAS® TaqMan® Analyzer, il COBAS® TaqMan® 48 Analyzer, il COBAS® AMPLICOR Analyzer e il **cobas p** 630 instrument
- oppure
- Manuale dell'applicazione - AMPLILINK Software versione serie 3.4
  - Opzionale: Manuale Operatore del **cobas p** 630 instrument, versione software 2.2

- File di definizione del test (Test Definition File, TDF). Per informazioni sul nome e l'attuale versione del file TDF, vedere la scheda informativa del prodotto fornita con il kit.

#### **Altro materiale**

- Rack per campioni (rack SK 24)
- Rack per reagenti
- Rack per SPU
- K-carrier
- Dispositivo di trasporto dei K-carrier
- Rack per K-carrier
- Pipettatori con puntali muniti di barriera antiaerosol o a spostamento positivo, privi di ribonucleasi (da 1000 µl); i pipettatori devono garantire un'accuratezza entro il 3% del volume dichiarato. È necessario utilizzare puntali con barriera antiaerosol o a spostamento positivo privi di RNasi, in modo da prevenire la contaminazione crociata del campione e dell'amplicone.
- Guanti monouso, senza talco
- Miscelatore vortex

#### **Materiale di consumo**

- Unità di trattamento campioni (SPU)
- Provetta per campioni iniziali (provetta S) e clip con codice a barre
- Rack per puntali K
- Confezione di provette K da 12 x 96

### **PRELIEVO, TRASPORTO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI**

**NOTA:** *manipolare tutti i campioni e i controlli come se fossero in grado di trasmettere agenti infettivi.*

#### **Prelievo e conservazione dei campioni**

Il test qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV v2.0 è destinato all'uso con campioni di siero o plasma trattato con EDTA. Il sangue deve essere raccolto in provette SST® per la separazione del siero, in provette BD Vacutainer® PPT™ per la preparazione del plasma destinato ai metodi di analisi di diagnostica molecolare oppure in provette sterili con anticoagulante EDTA (tappo viola). Per la gestione delle provette di raccolta, attenersi alle istruzioni del produttore. I campioni di sangue appena prelevato (sangue intero) possono essere conservati a 2-25°C per un massimo di 24 ore prima della centrifugazione. Dopo la centrifugazione, trasferire il siero o il plasma con EDTA in una provetta sterile in polipropilene. Si consiglia di conservare i campioni in aliquote di circa 1.000 µl in provette sterili da 2,0 ml con tappo a vite in polipropilene (ad esempio, microprovette Sarstedt da 2 ml con tappo a vite). Conservare i campioni di siero o di plasma con EDTA secondo le seguenti modalità:

- A 2-8°C per un massimo di 72 ore
- Tra -20°C e -80°C per un massimo di 6 settimane

I campioni di siero o plasma con EDTA possono essere congelati e scongelati per un massimo di cinque volte senza perdita di RNA di HCV.

#### **Trasporto dei campioni**

Il trasporto di sangue intero, siero o plasma con EDTA deve essere conforme a tutte le normative riguardanti gli agenti eziologici<sup>13</sup>. Il sangue intero deve essere trasportato a 2-25°C e centrifugato entro 24 ore dal prelievo. Il siero o il plasma in EDTA possono essere trasportati a 2-8°C o congelati a temperature comprese tra -20°C e -80°C.

## ISTRUZIONI PER L'USO

Per istruzioni operative dettagliate, una descrizione approfondita delle possibili configurazioni, la stampa dei risultati e l'interpretazione di flag, commenti e messaggi di errore, consultare i manuali dell'AMPLILINK Software versione serie 3.3 e 3.4, elencati nella sezione "Strumentazione e software".

### Dimensioni dei batch e flusso di lavoro

Ogni kit contiene reagenti sufficienti per 72 test, che possono essere suddivisi in batch di 12-24 test. È necessario che in ogni batch siano inclusi almeno uno ciascuno dei controlli **[CTM (-) C and HCV (+) C, v2.0]** (vedere la sezione "Controllo di qualità"). È necessario avviare la seduta sull'analizzatore COBAS® TaqMan® o sull'analizzatore COBAS® TaqMan® 48 entro 120 minuti dal termine della preparazione dei campioni e dei controlli. **NON CONGELARE o CONSERVARE** i campioni e i controlli trattati a 2-8°C.

### Preparazione dei campioni e dei controlli

Se i campioni sono congelati, lasciarli a temperatura ambiente fino al loro completo scongelamento e agitarli in vortex per 3-5 secondi prima dell'uso. Prelevare i controlli dal luogo in cui sono conservati a 2-8°C, lasciarli equilibrare a temperatura ambiente e agitarli in vortex per 3-5 secondi prima dell'uso.

#### Configurazione dello strumento COBAS® AmpliPrep

#### **Parte A. Manutenzione e priming**

- A1. Lo strumento COBAS® AmpliPrep è pronto per il funzionamento in modalità stand-by.
- A2. Accendere l'unità di controllo dell'AMPLILINK Software (posizione **ON**). Preparare l'unità di controllo come segue:
  1. Effettuare l'accesso al sistema operativo Microsoft Windows.
  2. Fare doppio clic sull'icona del software AMPLILINK.
  3. Aprire una sessione del software AMPLILINK inserendo l'ID utente e la password assegnati.
- A3. Controllare la quantità di reagente di lavaggio **PG WR** disponibile nella schermata **Status** e aggiungere altro reagente, se necessario.
- A4. Eseguire tutte le attività di manutenzione elencate nella scheda **Due**. Lo strumento COBAS® AmpliPrep eseguirà automaticamente il priming del sistema.

#### **Parte B. Caricamento delle cassette di reagenti**

**NOTA:** *prelevare tutte le cassette di reagenti dal luogo in cui sono conservate a 2-8°C, caricarle immediatamente sullo strumento COBAS® AmpliPrep e lasciarle equilibrare a temperatura ambiente sullo strumento per almeno 30 minuti, prima di avviare il trattamento del primo campione. Evitare che le cassette di reagenti raggiungano la temperatura ambiente all'esterno dello strumento, in quanto potrebbe formarsi della condensa sulle etichette del codice a barre. Non tentare di asciugare l'eventuale condensa strofinando le etichette del codice.*

- B1. Posizionare il reagente **HCV QL v2.0 CS1** sul rack per reagenti. Posizionare i reagenti **HCV QL v2.0 CS2**, **HCV QL v2.0 CS3** e **HCV QL v2.0 CS4** su un rack per reagenti separato.
- B2. Caricare il rack per reagenti che contiene il reagente **HCV QL v2.0 CS1** nella posizione del rack **A** dello strumento COBAS® AmpliPrep.
- B3. Caricare il rack per reagenti che contiene i reagenti **HCV QL v2.0 CS2**, **HCV QL v2.0 CS3** e **HCV QL v2.0 CS4** nelle posizioni rack **B**, **C**, **D** o **E** dello strumento COBAS® AmpliPrep (per informazioni dettagliate, consultare il manuale dello strumento in uso).

### Parte C. Caricamento del materiale di consumo

**NOTA:** calcolare il numero necessario di cassette di reagenti COBAS® AmpliPrep, unità SPU, provette per campioni iniziali (provette S), puntali K e provette K. Per ogni campione o controllo occorrono un'unità SPU, una provetta S, un puntale K e una provetta K.

Sono disponibili diverse configurazioni per l'uso dello strumento COBAS® AmpliPrep insieme all'analizzatore COBAS® TaqMan® o all'analizzatore COBAS® TaqMan® 48. A seconda della configurazione prescelta, caricare il numero appropriato di rack con le cassette dei reagenti, rack per campioni con le provette S, rack per SPU, rack per puntali K, rack per provette K e K-carrier nelle posizioni rack corrispondenti sullo strumento COBAS® AmpliPrep.

- C1. Posizionare le unità SPU sui rack per SPU e caricare i rack nelle posizioni rack **J, K o L** dello strumento COBAS® AmpliPrep.
- C2. A seconda della configurazione prescelta, caricare i rack pieni di provette K nelle posizioni rack **M, N, O o P** dello strumento COBAS® AmpliPrep.
- C3. Caricare i rack pieni di puntali K nelle posizioni rack **M, N, O o P** dello strumento COBAS® AmpliPrep.
- C4. A seconda della configurazione prescelta, caricare i K-carrier sui rack per K-carrier nelle posizioni rack **M, N, O o P** dello strumento COBAS® AmpliPrep.

### Parte D. Creazione degli ordini e caricamento dei campioni

- D1. Preparare i rack per campioni nel modo seguente: applicare una clip con codice a barre in ogni posizione del rack per campioni nella quale verrà inserito un campione (provetta S). Applicare una delle clip con codice a barre specifiche per i controlli [**CTM (-) C** e **HCV (+) C, v2.0**] in ogni posizione del rack per campioni nella quale verrà inserito un controllo (provetta S). Sulle clip con il codice a barre dei controlli dovrebbero essere stampati numeri di lotto identici a quelli stampati sulle fiale dei controlli contenute nel kit. Fare attenzione ad assegnare il controllo corretto alla posizione con la clip corrispondente. Inserire una provetta S in ogni posizione in cui è presente una clip con codice a barre.
- D2. Nel software AMPLILINK procedere alla creazione degli ordini per ogni campione e ogni controllo (finestra **Orders**, scheda **Sample**). Selezionare il file del test appropriato e completare l'operazione salvando.
- D3. Assegnare gli ordini per i campioni e i controlli alle posizioni rack riservate ai campioni (finestra **Orders**, scheda **Sample Rack**). Il numero del rack per campioni deve corrispondere a quello del rack preparato al passaggio D1.
- D4. Stampare il report **Sample Rack Order** per utilizzarlo come foglio di lavoro.
- D5. Preparare i rack per i campioni e i controlli nell'area del laboratorio riservata a questo scopo. Agitare in vortex ogni campione e controllo [**CTM (-) C** e **HCV (+) C, v2.0**] per 3-5 secondi. Evitare di contaminare i guanti durante la manipolazione dei campioni e dei controlli.
- D6. Trasferire 650 µl di ogni campione e controllo [**CTM (-) C** e **HCV (+) C, v2.0**] nella provetta S appropriata (provvista della clip con il codice a barre) utilizzando un micropipettatore con puntale dotato di barriera antiaerosol o a spostamento positivo privo di RNasi. **Evitare di trasferire sostanze particellari e/o coaguli di fibrina dal campione di origine alla provetta S iniziale.** I campioni e i controlli devono essere trasferiti nelle posizioni delle provette loro assegnate e il tutto deve essere annotato nel foglio di lavoro descritto al passaggio D4. Sulle clip con il codice a barre dei controlli dovrebbero essere stampati numeri di lotto identici a quelli stampati sulle fiale dei controlli contenute nel kit. Fare attenzione ad assegnare il controllo corretto alla posizione nella quale è presente la clip con il codice a barre corrispondente. **Evitare di contaminare la parte superiore delle provette S con campioni o controlli.**
- D7. Se si utilizza lo strumento **cobas p 630** per la preparazione dei campioni, consultare il Manuale Operatore dello strumento **cobas p 630**.
- D8. A seconda della configurazione prescelta, caricare i rack per campioni contenenti le provette S nelle posizioni rack **F, G o H** dello strumento COBAS® AmpliPrep.
- D9. A seconda della configurazione prescelta, caricare i rack per campioni contenenti le provette S e le provette K (una per ogni provetta S, caricata nella posizione a destra accanto alle provette S) nelle posizioni rack **F, G o H** dello strumento COBAS® AmpliPrep.

## **Parte E. Avvio della seduta sullo strumento COBAS® AmpliPrep**

E1. Avviare lo strumento COBAS® AmpliPrep utilizzando il software AMPLILINK.

## **Parte F. Fine della seduta sullo strumento COBAS® AmpliPrep e trasferimento dei campioni sull'analizzatore COBAS® TaqMan® o sull'analizzatore COBAS® TaqMan® 48 (solo trasferimento manuale)**

F1. Controllare se sono presenti avvisi (flag) o messaggi di errore.

F2. Rimuovere i campioni e i controlli trattati dallo strumento COBAS® AmpliPrep sui rack per campioni (nel caso dell'analizzatore COBAS® TaqMan® senza Docking Station) o sui rack per K-carrier (nel caso dell'analizzatore COBAS® TaqMan® 48), a seconda della configurazione in uso.

F3. Rimuovere i rifiuti dallo strumento COBAS® AmpliPrep.

**NOTA: al termine della preparazione dei campioni e dei controlli, non esporre alla luce i campioni e i controlli trattati.**

## **Amplificazione e rilevazione**

Configurazione dell'analizzatore COBAS® TaqMan® o dell'analizzatore COBAS® TaqMan® 48

È necessario avviare la seduta sull'analizzatore COBAS® TaqMan® o sull'analizzatore COBAS® TaqMan® 48 entro 120 minuti dal termine della preparazione dei campioni e dei controlli. NON CONGELARE o CONSERVARE i campioni e i controlli trattati a 2-8°C.

## **Parte G. Caricamento dei campioni trattati**

G1. A seconda della configurazione dello strumento, eseguire le procedure appropriate per trasferire le provette K sull'analizzatore COBAS® TaqMan® o sull'analizzatore COBAS® TaqMan® 48.

## **Parte H. Avvio della seduta sull'analizzatore COBAS® TaqMan® o sull'analizzatore COBAS® TaqMan® 48**

H1. Avviare la seduta sull'analizzatore COBAS® TaqMan® o sull'analizzatore COBAS® TaqMan® 48, a seconda della configurazione usata.

## **Parte I. Termine della seduta sull'analizzatore COBAS® TaqMan® o sull'analizzatore COBAS® TaqMan® 48**

I1. Al termine della seduta sull'analizzatore COBAS® TaqMan® o sull'analizzatore COBAS® TaqMan® 48, stampare un report dei risultati. Controllare se nel report dei risultati sono presenti avvisi (flag) o messaggi di errore. I campioni con avvisi (flag) e commenti vengono interpretati secondo la modalità descritta nella sezione "Risultati". Archiviare i dati dopo averli accettati.

I2. Rimuovere le provette K usate dall'analizzatore COBAS® TaqMan® o dall'analizzatore COBAS® TaqMan® 48.

## **CONTROLLO DI QUALITÀ**

È necessario che in ogni batch di test siano inclusi un controllo negativo COBAS® TaqMan® e un controllo positivo HCV. Il batch è valido se non sono presenti avvisi (flag) per nessuno dei controlli [HCV (+) C, v2.0 e CTM (-) C].

I controlli possono occupare qualsiasi posizione libera sul rack campioni.

Controllare la stampa del batch per individuare eventuali avvisi (flag) o commenti a conferma della validità del batch.

## Controllo negativo

Il controllo **CTM (-) C** deve generare un risultato "Negative". Se il controllo **CTM (-) C** genera un flag "Invalid", l'intero batch non è valido. Ripetere l'intera procedura, incluse la preparazione, l'amplificazione e la rilevazione dei campioni e dei controlli. Se il controllo **CTM (-) C** genera risultati che sono costantemente non validi in più batch, richiedere assistenza tecnica all'ufficio Roche locale.

## Controllo positivo

Il controllo **HCV (+) C, v2.0** deve generare un risultato "Positive". Se il controllo **HCV (+) C, v2.0** ha un flag "Invalid", l'intero batch non è valido. Ripetere l'intera procedura, incluse la preparazione, l'amplificazione e la rilevazione dei campioni e dei controlli. Se il controllo **HCV (+) C, v2.0** genera risultati che sono costantemente non validi in più batch, richiedere assistenza tecnica all'ufficio Roche locale.

## RISULTATI

L'analizzatore **COBAS® TaqMan®** e l'analizzatore **COBAS® TaqMan® 48** determinano in modo automatico la presenza dell'RNA dell'HCV per i campioni e i controlli.

### Software AMPLILINK:

- Determina il valore Ct per l'RNA dell'HCV e per l'RNA dell'IC dell'HCV.
- Determina la presenza dell'RNA dell'HCV e dell'RNA dell'IC dell'HCV sulla base dei valori Ct per l'RNA dell'HCV e per l'RNA dell'IC dell'HCV.

### Convalida del batch:

Controllare la finestra o la stampa dei risultati del software AMPLILINK per individuare eventuali avvisi (flag) o commenti a conferma della validità del batch.

Nel caso di ordini che riguardano i controlli, viene effettuata una verifica per determinare se il valore Ct del controllo rientra nell'intervallo specificato. Se il valore Ct per il controllo non rientra nell'intervallo specificato, viene generato un avviso (FLAG) per segnalare l'errore del controllo.

Il batch è valido se non sono presenti avvisi (flag) per nessuno dei controlli **[HCV (+) C, v2.0 e CTM (-) C]**.

Il batch non è valido se per i controlli dell'HCV sono presenti i seguenti avvisi (flag):

### Controllo negativo:

Flag	Risultato	Interpretazione
NC_INVALID	Invalid	Un risultato non valido, oppure il risultato del controllo negativo non è negativo.

### Controllo positivo HCV:

Flag	Risultato	Interpretazione
PC_INVALID	Invalid	Un risultato non valido, oppure il risultato del controllo positivo non è positivo.

Se il batch non è valido, ripetere l'intero batch, incluse le fasi di preparazione dei campioni e dei controlli, trascrizione inversa, amplificazione e rilevazione.

## Interpretazione dei risultati:

Se il batch è valido, controllare se sono presenti avvisi (flag) o commenti sulla stampa dei risultati.

⇒ Un batch valido può includere risultati dei campioni sia validi che non validi, a seconda degli avvisi (flag) e/o dei commenti generati per i singoli campioni.

## I risultati dei campioni devono essere interpretati nel modo seguente:

Risultato	Interpretazione
Negative	Valore Ct per HCV superiore al limite per il dosaggio oppure nessun valore Ct ottenuto per HCV. Classificare i risultati come "RNA di HCV non rilevato".
Positive	Classificare i risultati come "RNA di HCV rilevato".

Se il risultato del campione visualizzato è "Failed", "Invalid" o "Aborted", consultare il Manuale dell'applicazione - AMPLILINK Software versione serie 3.3 o 3.4, come indicato nella sezione "Materiale necessario ma non fornito".

## LIMITAZIONI PROCEDURALI

1. Questo test è stato validato solo per l'uso con siero o plasma umano raccolto in anticoagulante EDTA. L'uso di altri tipi di campioni per lo svolgimento del test può generare risultati non accurati.
2. Anche se rare, le mutazioni delle regioni altamente conservate del genoma virale coperte dai primer e/o dalla sonda del test possono dare luogo alla mancata identificazione del virus.
3. La rilevazione dell'RNA dell'HCV dipende dal numero di particelle virali presenti nel campione e può essere influenzata dal metodo di prelievo del campione, da fattori legati al paziente (ad esempio età e presenza di sintomi) e/o dallo stadio dell'infezione.
4. L'affidabilità dei risultati dipende dall'adeguatezza delle procedure di prelievo, trasporto, conservazione e trattamento dei campioni.
5. La presenza dell'enzima AmpErase nel Master Mix COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV riduce il rischio di contaminazione da ampliconi. La contaminazione dovuta a controlli HCV-positivi e campioni clinici può tuttavia essere evitata soltanto con l'adozione di una corretta prassi di laboratorio e con il rispetto rigoroso delle procedure specificate in questo foglietto illustrativo.
6. L'uso di questo prodotto deve essere riservato a personale adeguatamente addestrato all'uso dello strumento **cobas p 630** (opzionale), dello strumento COBAS® AmpliPrep e dell'analizzatore COBAS® TaqMan® o dell'analizzatore COBAS® TaqMan® 48. L'operatore deve avere una conoscenza approfondita delle sedute applicative sugli strumenti e deve attenersi alla buona prassi di laboratorio.
7. Questo prodotto può essere usato soltanto con lo strumento **cobas p 630** (opzionale), lo strumento COBAS® AmpliPrep e gli analizzatori COBAS® TaqMan® o COBAS® TaqMan® 48.
8. Viste le differenze intrinseche tra le tecnologie, è consigliabile che gli utenti, prima di passare da una tecnologia a un'altra, svolgano studi sulla correlazione tra i metodi in laboratorio allo scopo di valutare tali differenze.

## SOSTANZE INTERFERENTI

È dimostrato che la presenza nei campioni di livelli elevati di trigliceridi (3.300 mg/dl), bilirubina coniugata (25 mg/dl) e non coniugata (20 mg/dl), albumina (6.000 mg/dl), emoglobina (200 mg/dl) e DNA umano (40 mg/dl) e di malattie autoimmuni come il Lupus Eritematoso Sistemico (LES), l'Artrite Reumatoide (AR) e gli Anticorpi Antinucleari (ANA), non interferisce con la rilevazione dell'RNA dell'HCV da parte del test qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV v2.0.

I composti farmaceutici elencati di seguito, analizzati al livello plasmatico di picco ( $C_{max}$ ) e con un valore 3 volte superiore al livello  $C_{max}$  non hanno prodotto interferenze con la rilevazione dell'RNA dell'HCV da parte del test qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV v2.0.

<b>Inibitori nucleotidici della trascrittasi inversa e della DNA polimerasi</b> Tenofovir Adefovir dipivoxil	<b>Inibitori non nucleosidici della trascrittasi inversa</b> Efavirenz Nevirapina
<b>Inibitori della proteasi per HIV</b> Atazanavir Saquinavir Ritonavir Lopinavir/Ritonavir Nelfinavir Darunavir Tipranavir Fosamprenavir	<b>Inibitori nucleosidici della trascrittasi inversa</b> Lamivudina Zidovudina Stavudina Abacavir Didanosina Emtricitabina Entecavir Telbivudina
<b>Inibitore della fusione dell'HIV</b> Enfuvirtide	<b>Inibitori d'ingresso dell'HIV</b> Maraviroc
<b>Composti per il trattamento dei virus dell'herpes</b> Ganciclovir Valganciclovir Acyclovir	<b>Immunomodulatori</b> PegInterferone alfa-2b Ribavirina PegInterferone alfa-2a
<b>Inibitore dell'integrasi dell'HIV</b> Raltegravir	

## VALUTAZIONE DELLE PRESTAZIONI NON CLINICHE

### A. Limite di rilevazione

Il limite di rilevazione (Limit of Detection, LOD) del test qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV v2.0 è stato determinato mediante l'analisi di diluizioni seriali dello Standard Internazionale dell'OMS per l'RNA del virus dell'epatite C destinato ai saggi basati sulla tecnologia di amplificazione dell'acido nucleico, genotipo 1a, ottenuto dal NIBSC, in siero o plasma umano in EDTA HCV-negativo. Per ogni matrice sono state analizzate tre serie di diluizioni indipendenti. In totale sono state eseguite 252 analisi per livello di concentrazione per ogni tipo di matrice. Lo studio è stato effettuato utilizzando tre lotti di reagenti del test qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV v2.0.

I risultati per il siero e il plasma in EDTA sono illustrati nelle Tabelle 1 e 2 e dimostrano che il test qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV v2.0 ha rilevato l'RNA dell'HCV a concentrazioni pari a 15 UI/ml o superiori con un tasso di successo  $\geq 95\%$ . La differenza tra siero e plasma in EDTA non è statisticamente rilevante.

**Tabella 1**

**Limite di rilevazione nel plasma in EDTA, determinato sulla base dello Standard Internazionale dell'OMS per l'RNA del virus dell'epatite C per i saggi basati sulla tecnologia di amplificazione dell'acido nucleico**

<b>Titolo iniziale (UI/ml di RNA dell'HCV)</b>	<b>Numero di repliche valide</b>	<b>Numero di positivi</b>	<b>Tasso di successo (%)</b>
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 tramite PROBIT con tasso di successo 95%</b>	<b>12 UI/ml (intervallo di confidenza 95%: 10-13 UI/ml)</b>		
<b>LOD per tasso di successo</b>	<b>15 UI/ml</b>		

**Tabella 2**

**Limite di rilevazione nel siero, determinato sulla base dello Standard Internazionale dell'OMS per l'RNA del virus dell'epatite C per i saggi basati sulla tecnologia di amplificazione dell'acido nucleico**

Titolo iniziale (UI/ml di RNA dell'HCV)	Numero di repliche valide	Numero di positivi	Tasso di successo (%)
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 tramite PROBIT con tasso di successo 95%</b>	<b>11 UI/ml (intervallo di confidenza 95%: 10-13 UI/ml)</b>		
<b>LOD per tasso di successo</b>	<b>15 UI/ml</b>		

## B. Precisione

La precisione del test qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV v2.0 è stata determinata mediante l'analisi di diluizioni seriali dello Standard Internazionale dell'OMS per l'RNA del virus dell'epatite C destinato ai saggi basati sulla tecnologia di amplificazione dell'acido nucleico in siero o plasma umano in EDTA HCV-negativo.

Sono stati analizzati due livelli di concentrazione (5 UI/ml e 50 UI/ml) per un massimo di 168 repliche con 12 sedute in 4 giorni. Ogni campione è stato sottoposto all'intera procedura prevista per il test qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV v2.0, incluse la preparazione dei campioni, l'amplificazione e la rilevazione. Lo studio è stato effettuato utilizzando tre lotti di reagenti del test qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV v2.0. Tutti i dati validi sono stati valutati calcolando il tasso di successo in % per ogni componente del pannello per lotto di reagenti (con le due matrici combinate).

Le prestazioni del test qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV v2.0 sono state uniformi ai livelli di concentrazione di 5 UI/ml e 50 UI/ml per i campioni di siero e di plasma in EDTA con tutti e tre i lotti di reagenti analizzati (Tabella 3).

**Tabella 3**

**Precisione del test qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV v2.0  
(combinazioni di campioni di siero e plasma in EDTA)**

Concentrazione nominale [UI/ml]	Tasso di successo (%)		
	Lotto 1	Lotto 2	Lotto 3
5	74	70	74
50	100	100	100

### C. Inclusività

Le prestazioni del test qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV v2.0 con i genotipi di HCV sono state valutate verificando il limite di rilevazione (LOD) per i genotipi 1-6.

I campioni clinici di RNA di HCV per 8 diversi genotipi/sottotipi (1a, 1b, 2a, 2b, 3, 4, 5 e 6) sono stati diluiti fino a tre diversi livelli di concentrazione in siero o plasma in EDTA. È stato quindi determinato il tasso di successo per ogni livello con un massimo di 63 repliche. Lo studio è stato condotto utilizzando un lotto di reagenti del test qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV v2.0.

I risultati per il siero e il plasma in EDTA sono illustrati nelle Tabelle 4 e 5 e dimostrano che il test qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV v2.0 ha rilevato l'RNA dell'HCV per 8 diversi genotipi/sottotipi a concentrazioni pari a 15 UI/ml o superiori, con un tasso di successo  $\geq 95\%$ . La differenza tra siero e plasma in EDTA non è statisticamente rilevante.

**Tabella 4**  
**Verifica del limite di rilevazione per i genotipi di RNA di HCV (campioni di plasma in EDTA)**

Genotipo	5 UI/ml			15 UI/ml			45 UI/ml		
	Numero di repliche valide	Numero di positivi	Tasso di successo (%)	Numero di repliche valide	Numero di positivi	Tasso di successo (%)	Numero di repliche valide	Numero di positivi	Tasso di successo (%)
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

**Tabella 5**  
**Verifica del limite di rilevazione per i genotipi di RNA di HCV (campioni di siero)**

Genotipo	5 UI/ml			15 UI/ml			45 UI/ml		
	Numero di repliche valide	Numero di positivi	Tasso di successo (%)	Numero di repliche valide	Numero di positivi	Tasso di successo (%)	Numero di repliche valide	Numero di positivi	Tasso di successo (%)
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. Sensibilità diagnostica

La sensibilità diagnostica del test qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV v2.0 è stata determinata analizzando singoli campioni di siero o plasma in EDTA positivi all'RNA di HCV (337 risultati in totale) con due lotti di reagenti del test qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV v2.0. Tutti i campioni analizzati sono risultati positivi all'RNA dell'HCV. In questo pannello, la sensibilità diagnostica del test qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV v2.0 è stata del 100% (limite inferiore di confidenza al 95% monolaterale:  $\geq 99,1\%$ ).

Inoltre, la sensibilità diagnostica del test qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV v2.0 è stata valutata durante la sierconversione. I membri dei 10 pannelli di sierconversione HCV disponibili in commercio, ciascuno dei quali prelevato da un singolo donatore di plasma durante un periodo di sierconversione dell'anticorpo HCV, sono stati analizzati con un lotto di reagenti del test qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV v2.0. Il test qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV v2.0 ha rilevato il virus HCV in 10 pannelli di sierconversione su 10 prima dell'immunodosaggio enzimatico sierologico di riferimento Abbott HCV EIA 2.0. Se confrontato con un altro test NAT, ovvero il test COBAS® AMPLICOR HCV v2.0, il test qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV v2.0 ha rilevato l'RNA dell'HCV prima (in 2 pannelli su 10) oppure nella stessa giornata dopo il primo prelievo (in 8 pannelli su 10).

## E. Specificità

La specificità dei test qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV v2.0 è stata determinata analizzando campioni di siero o di plasma in EDTA sieronegativi o negativi all'HCV di RNA, ottenuti da donatori di sangue. I campioni di siero e plasma in EDTA (500 risultati in totale) sono stati analizzati individualmente con due lotti di reagenti del test qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV v2.0. 499 campioni analizzati sono risultati negativi all'RNA dell'HCV. In questo pannello, la specificità del test qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV v2.0 è stata del 99,8% (limite inferiore di confidenza al 95% monolaterale:  $\geq 99,1\%$ ).

## F. Specificità analitica

La specificità analitica del test qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV v2.0 è stata valutata diluendo alcuni stock di diversi patogeni con titolo elevato (vedere Tabella 6) con campioni clinici di plasma in EDTA positivi e negativi all'RNA dell'HCV. Nessuno dei patogeni diversi dall'HCV ha interferito con le prestazioni del test o generato risultati falsi positivi con il test qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV v2.0.

**Tabella 6**  
**Specificità analitica dei campioni**

<b>Flavivirus non HCV</b> Virus del Nilo Occidentale Virus dell'encefalite di St. Louis Virus dell'encefalite della Murray Valley Virus della Dengue tipi 1, 2, 3 e 4 Virus della febbre gialla Virus Zika Virus FSME (ceppo HYPR)	<b>Virus</b> Adenovirus tipo 5 Citomegalovirus Virus di Epstein Barr Virus dell'epatite B Virus dell'epatite A HIV-1 Virus linfotropico delle cellule T umane tipo 1 e 2 Virus dell'herpes umano tipo 6 Virus dell'herpes simplex tipo 1 e 2 Influenza A Papillomavirus umano Virus varicella-zoster
<b>Batteri</b> <i>Propionibacterium acnes</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	
<b>Lieviti</b> <i>Candida albicans</i>	

## **G. Prestazioni a confronto con il test COBAS® AMPLICOR HCV v2.0**

Le prestazioni del test qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV v2.0 sono state confrontate con quelle del test COBAS® AMPLICOR HCV v2.0 analizzando campioni di siero e di plasma in EDTA ottenuti da pazienti infetti da HCV. In totale 463 campioni appartenenti ai genotipi 1-6 per il plasma in EDTA e ai genotipi 1-4 per il siero sono stati analizzati in duplicato. I 436 campioni di plasma in EDTA e siero sono risultati positivi entro l'intervallo di rilevazione di entrambi i test, evidenziando una concordanza positiva del 100% tra il test qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV v2.0 e il test COBAS® AMPLICOR HCV v2.0. I risultati di 27 campioni sono stati esclusi dall'analisi dei dati; 3 campioni avevano un volume insufficiente per l'analisi con il test COBAS® AMPLICOR HCV v2.0, 4 campioni hanno prodotto risultati del tipo "Target Not Detected" per tutte le misurazioni in entrambi i test, 8 campioni hanno prodotto risultati discrepanti nelle 2 ripetizioni per ciascun test, 12 campioni hanno prodotto risultati discrepanti tra i due test [criterio di esclusione: tutti i campioni avevano concentrazioni di HCV inferiori al valore LOD del test COBAS® AMPLICOR HCV v2.0, LOD (tasso di sensibilità 95%) plasma: 50 UI/ml, LOD siero: 60 UI/ml]. Tutti i campioni di plasma in EDTA e siero negativi che sono stati analizzati (200 risultati in totale) hanno prodotto risultati validi negativi, evidenziando una concordanza negativa del 100% tra il test qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV v2.0 e il test 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. Gretch D, del la Rosa D, Corey L and Carithers R. 1996. Assessment of Hepatitis C viremia using molecular amplification technologies. *Viral Hepat Rev* **2**:85-96.
7. Young KKY, Resnick R and Myers TW. 1993. Detection of hepatitis C virus RNA by a combined reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. *J Clin Microbiol* **31**:882-886.
8. NIH. 1997. Management of Hepatitis C. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement #105.
9. Bukh J, Purcell RH and Miller RH. 1992. Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**:4942-4946.
10. Longo MC, Berninger MS and Hartley JL. 1990. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* **93**:125-128.
11. U.S. Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*. 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.

<b>Revisione del documento</b>	
Doc. Rev. 3.0 (Mfg-US) 02/2019	<p>Aggiornato il numero dell'organismo notificato sotto la marcatura CE.</p> <p>Per ulteriori domande e chiarimenti, è possibile rivolgersi al rappresentante Roche locale.</p>
Doc. Rev. 4.0 (Mfg-US) 09/2019	<p>Aggiornamento della sezione <b>REQUISITI PER LA MANIPOLAZIONE E LA CONSERVAZIONE</b> per indicare all'utente di ispezionare visivamente il prodotto prima dell'uso per cercare eventuali segni di perdite e, in presenza di queste, non utilizzare il prodotto.</p> <p>Inserimento dell'indirizzo web Roche: <a href="http://www.roche.com">www.roche.com</a>.</p> <p>Aggiornamento della pagina dei simboli armonizzati.</p> <p>Per ulteriori domande e chiarimenti, è possibile rivolgersi al rappresentante Roche locale.</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  
Jaguará, Building 10  
05321-010 São Paulo, SP Brazil

### Marchi e brevetti

Vedere <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



I seguenti simboli appaiono su tutte le confezioni di prodotti diagnostici PCR di Roche.



Software ausiliario



Codice del batch



Mandatario nella Comunità Europea



Rischio biologico



Foglio di dati del barcode



Numero di catalogo



Consultare le istruzioni per l'uso



Solo per valutazione delle prestazioni IVD



Contenuto sufficiente per  $<n>$  test



Limite inferiore dell'intervallo assegnato



Contenuto del kit



Fabbricante



Distribuito da



Conservare al buio



Dispositivo medico-diagnostico *in vitro*



Limiti di temperatura



File di definizione del test



Utilizzare entro la data



Limite superiore dell'intervallo assegnato



Global Trade Item Number



Data di produzione

Rx Only

Solo USA: la legge federale degli Stati Uniti limita la vendita di questo dispositivo a personale medico abilitato o provvisto di prescrizione medica.



Questo prodotto è conforme ai requisiti della Direttiva Europea 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici *in vitro*.