

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

IN-VITRO-DIAGNOSTIKUM.

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

HCVQTV2

72 Tests

P/N: 05532264 190

COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®
Wash Reagent

PG WR

5.1 Liters

P/N: 03587797 190

Inhaltsverzeichnis

VERWENDUNGSZWECK	1
ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG DES TESTS	2
TESTPRINZIPIEN	2
REAGENZIEI	5
WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN	7
LAGERUNG UND HANDHABUNG	8
MITGELIEFERTER MATERIALIEN	8
ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL	9
ENTNAHME, TRANSPORT UND LAGERUNG VON PROBEN	10
GEBRAUCHSANLEITUNG	10
QUALITÄTSKONTROLLE	13
ERGEBNISSE	14
GRENZEN DES VERFAHRENS	15
STÖRSUBSTANZEN	16
NICHT-KLINISCHE LEISTUNGSMERKMALE	17
LITERATUR	24

VERWENDUNGSZWECK

Der COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0 ist ein *in vitro*-Nukleinsäure-Amplifikationstest zur quantitativen Bestimmung von von Hepatitis-C-Virus (HCV) RNA der Genotypen 1 bis 6 in EDTA-Humanplasma oder Humanserum mit dem COBAS® AmpliPrep Instrument zur automatisierten Probenaufarbeitung und dem COBAS® TaqMan® Analyzer oder dem COBAS® TaqMan® 48 Analyzer zur automatisierten Amplifikation und Detektion. Der Test ist in Verbindung mit dem klinischen Bild und weiteren Labormarkern einer HCV-Infektion für das Management von Patienten mit chronischer HCV-Infektion bestimmt. Der Test kann frühzeitig im Verlauf einer antiviralen Therapie zur Vorhersage der Wahrscheinlichkeit einer anhaltenden Virusreaktion (Sustained Virologic Response = SVR) verwendet werden. Weiterhin kann er zur Beurteilung der Virusreaktion auf eine antivirale Therapie (Response-gesteuerte Therapie), gemessen an den Veränderungen der HCV-RNA-Konzentration im Serum oder EDTA-Plasma, eingesetzt werden.

Der COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0 ist nicht als HCV-Screening-Test für Blut oder Blutprodukte oder als diagnostischer Test zur Bestätigung einer HCV-Infektion vorgesehen.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG DES TESTS

Das Hepatitis-C-Virus gilt als der primär verantwortliche Erreger bei 90 bis 95 % aller Fälle von Posttransfusionshepatitis¹⁻⁴. HCV ist ein einzelsträngiges Plus-Strang-RNA-Virus, dessen Genom sich aus etwa 9.500 Nukleotiden zusammensetzt, die für 3.000 Aminosäuren kodieren. HCV ist ein hämatogenes Virus, das über Blut und Blutprodukte übertragen werden kann. Der weit verbreitete Einsatz von HCV-Screeningtests im Blut hat das Risiko transfusionsbedingter Hepatitis deutlich reduziert. Die Inzidenz der HCV-Infektion ist am höchsten bei intravenösem Drogenkonsum und geringer bei anderen perkutanen Expositionen⁴. Immunserologischen Untersuchungen zufolge liegt die Prävalenz von HCV-Infektionen weltweit zwischen 0,6 % (Kanada) und 1,5 % (Japan)⁵. Die Rate der spontanen viralen Clearance bei exponierten Personen variiert stark; in klinischen Tests wurden anhand der Messung der Normalisierung der Leberenzyme sowie der Clearance von HCV-RNA im Plasma zwischen 10 und 60 % spontane virale Clearance ermittelt⁵.

HCV-Partikel können nicht aus infizierten Blutproben kultiviert werden; das Vorliegen von Anti-HCV-Antikörpern bei Patienten mit HCV-Infektion hat daher zu der Entwicklung immunserologischer Assays geführt, die speziell auf diese Antikörper ausgerichtet sind. Das Vorhandensein von HCV-Antikörpern gibt jedoch nur Aufschluss über eine frühere HCV-Infektion und kann nicht als Marker einer bestehenden Infektion verwendet werden. Die Bestimmung der Alanin-Aminotransferase-Spiegel (ALT) gilt als Ersatzindikator für eine HCV-Infektion, ist jedoch kein direktes Maß für eine Virämie.

Im Gegensatz dazu gilt die Quantifizierung der HCV-RNA zur Ermittlung des Ausgangswerts der Viruslast und zur Behandlungsüberwachung als geeignetes Mittel, um die Wirksamkeit der antiviralen Kombinationstherapie mit Peginterferon und Ribavirin zu belegen⁶⁻¹⁰. In aktuellen Leitlinien für das Management und die Behandlung von HCV werden quantitative HCV-RNA-Tests vor Beginn der antiviralen Therapie, therapiebegleitend (Response-gesteuerte Therapie) sowie in der Regel 12 bis 24 Wochen nach Behandlungsende empfohlen. Behandlungsziel ist die mit einem sensitiven Test nachweisbare Abwesenheit von HCV-RNA 24 Wochen nach Behandlungsende, da dies darauf schließen lässt, dass eine anhaltende Virusreaktion (Sustained Virologic Response = SVR) erzielt wurde¹¹. Während einer antiviralen Therapie ist häufig eine frühe Virusantwort (Early Virologic Response = EVR), definiert als Abfall der HCV-RNA um mindestens 2 log-Stufen nach 12 Behandlungswochen, zu beobachten. Das Nichterreichen einer EVR ist ein in hohem Maße negativer prädiktiver Wert für die Erzielung einer SVR, der in die Therapieabbruchkriterien (Kriterium der Aussichtslosigkeit) für die Behandlung mit pegyliertem Interferon und Ribavirin aufgenommen wurde¹¹⁻¹³. Ein rasches virologisches Ansprechen (Rapid Viral Response = RVR) mit nicht nachweisbarer HCV-RNA nach 4 Behandlungswochen ist ein in hohem Maße positiver prädiktiver Wert für eine SVR¹⁴. Zur individuelleren Festlegung der Behandlungsdauer mit den neuartigen, direkt wirkenden antiviralen Wirkstoffen wird neuerdings die behandlungsbegleitende Bestimmung der Viruskinetik eingesetzt^{15,16}.

TESTPRINZIPIEN

Der COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0 ist ein Nukleinsäure-Amplifikationstest zur quantitativen Bestimmung von HCV-RNA in humanem Serum oder EDTA-Plasma. Die Probenaufarbeitung erfolgt automatisiert mit dem COBAS® AmpliPrep Instrument; Amplifikation und Detektion erfolgen automatisiert mit dem COBAS® TaqMan® Analyzer oder dem COBAS® TaqMan® 48 Analyzer.

Der COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0 beruht im Wesentlichen auf drei Schritten: (1) Probenaufarbeitung zur Isolierung der HCV-RNA, (2) reverse Transkription der Ziel-RNA zur Erzeugung komplementärer DNA (cDNA) und (3) gleichzeitige PCR-Amplifikation der Ziel-cDNA und Detektion der gespaltenen, zweifach markierten zielspezifischen Oligonukleotid-Detektionssonden.

Probenaufarbeitung

Die Probenaufarbeitung wird beim COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0 automatisch auf dem COBAS® AmpliPrep Instrument mittels eines generischen Bindeverfahrens auf Siliziumdioxidbasis durchgeführt. Das Probenvolumen beträgt 650 µl; bei dem Verfahren werden 500 µl EDTA-Plasma oder Serum verarbeitet. Die HCV-Partikel werden durch Inkubation bei erhöhter Temperatur mit Protease und einem chaotropen Lyse-/Bindungspuffer lysiert, um Nukleinsäuren freizusetzen, und um die freigesetzte HCV-RNA vor RNasen im Serum oder EDTA-Plasma zu schützen. Jeder Probe werden Protease und eine bekannte Anzahl HCV-Quantifizierungsstandard (QS)-RNA-Moleküle zusammen mit dem Lyseagens sowie magnetischen Gaspartikeln zugesetzt. Anschließend wird das Gemisch inkubiert, wobei die HCV-RNA und die HCV-QS-RNA an die Oberfläche der magnetischen Gaspartikel gebunden werden. Ungebundene Substanzen wie Salze, Proteine und andere Zellverunreinigungen werden durch Waschen der magnetischen Gaspartikel entfernt. Nach dem Trennen der Gaspartikel und Beenden der Waschschrte werden die adsorbierten Nukleinsäuren bei erhöhter Temperatur mit einer wässrigen Lösung eluiert. Die verarbeitete Probe, die die freigesetzte HCV-RNA und HCV-QS-RNA enthält, wird dem Amplifikationsgemisch zugegeben und in den COBAS® TaqMan® Analyzer bzw. COBAS® TaqMan® 48 Analyzer überführt.

Reverse Transkription und PCR-Amplifikation

Der COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0 verwendet Primer, die eine Zielsequenz innerhalb der hochkonservierten, nicht translatierten 5'-Region des HCV-Genoms haben, für die reverse Transkription von HCV-RNA in komplementäre DNA (cDNA) und für die PCR-Amplifikation dieser cDNA¹⁷. Die Nukleotidsequenz der Primer wurde so optimiert, dass eine vergleichbare Amplifikation der HCV-Genotypen 1 bis 6 erzielt wird. Die reverse Transkription und die PCR-Amplifikation werden mit einer optimierten Mischung thermostabiler rekombinanter Enzyme durchgeführt: Z05 und Z05D-DNA-Polymerase. In Gegenwart von Manganionen (Mn²⁺) und unter geeigneten Pufferbedingungen weisen Z05 und Z05D sowohl Reverse-Transkriptase- als auch DNA-Polymerase-Aktivität auf. Dadurch können die reverse Transkription und die PCR-Amplifikation gleichzeitig mit der Echtzeit-Detektion des Amplifikats erfolgen.

Die verarbeiteten Proben werden dem Amplifikationsgemisch in Amplifikationsröhrchen (K-Tubes) beigegeben, in denen sowohl die reverse Transkription als auch die PCR-Amplifikation stattfinden. Das Reaktionsgemisch wird erwärmt, so dass sich der Downstream-Primer spezifisch an die HCV-Ziel-RNA und die HCV-QS-RNA anlagern kann. In Gegenwart von Mn²⁺ und überschüssigen Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs), einschließlich Desoxyadenosin-, Desoxyguanosin-, Desoxycytidin- und Desoxyuridintriphosphaten, verlängern die Polymerasen Z05 und Z05D die angelagerten Primer und bilden so einen zur Ziel-RNA komplementären DNA-Strang.

Amplifikation der Zielsequenz

Nach der reversen Transkription der HCV-Ziel-RNA und der HCV-QS-RNA erwärmt der Thermocycler im COBAS® TaqMan® Analyzer oder COBAS® TaqMan® 48 Analyzer das Reaktionsgemisch, wodurch das RNA:cDNA-Hybrid denaturiert und die spezifischen Zielsequenzen für die Primer freigelegt werden. Beim Abkühlen des Gemischs lagern sich die Primer an die Ziel-cDNA an. Die thermostabilen DNA-Polymerasen (Z05 und Z05D) verlängern in Gegenwart von Mn²⁺ und überschüssigen Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs) die angelagerten Primer entlang des Ziel-Templates, was zur Bildung eines doppelsträngigen DNA-Moleküls (des so genannten Amplifikats) führt. Dieser Prozess wird vom COBAS® TaqMan® Analyzer bzw. COBAS® TaqMan® 48 Analyzer automatisch bis zur Erreichung einer festgelegten Anzahl von Zyklen wiederholt, wobei in jedem Zyklus die Menge an DNA-Amplifikat verdoppelt wird. Die erforderliche Anzahl der Zyklen wird im COBAS® TaqMan® Analyzer bzw. COBAS® TaqMan® 48 Analyzer vorprogrammiert. Die Amplifikation erfolgt nur in der von den Primern begrenzten Region des HCV-Genoms; es wird nicht das gesamte HCV-Genom amplifiziert.

Selektive Amplifikation

Die selektive Amplifikation der Ziel-Nukleinsäure in der Probe wird beim COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0 durch Verwendung des Enzyms AmpErase (Uracil-N-Glycosylase) und von Desoxyuridintriphosphat (dUTP) erreicht. Das Enzym AmpErase erkennt desoxyuridinhaltige¹⁸ – nicht aber desoxythymidinhaltige – DNA-Stränge und katalysiert deren Zerstörung. Desoxyuridin ist in natürlich vorkommender DNA nicht enthalten, jedoch in den Amplifikaten immer vorhanden, da Desoxyuridintriphosphat als eines der dNTPs im Master-Mix verwendet wird. Deshalb enthalten nur die Amplifikate Desoxyuridin. Desoxyuridin macht kontaminierende Amplifikate vor der Amplifikation der Ziel-DNA anfällig für die Zerstörung durch das Enzym AmpErase. Zudem wird jedes nichtspezifische Produkt, das nach der ersten Aktivierung des Master-Mix durch Manganionen gebildet wurde, durch das Enzym AmpErase zerstört. Das im Master-Mix enthaltene Enzym AmpErase katalysiert die Spaltung desoxyuridinhaltiger DNA an den Desoxyuridin-Resten durch Öffnen der Desoxyribosekette an der C1-Position. Während der Erwärmung im ersten thermostabilen Schritt tritt ein Bruch des DNA-Strangs des Amplifikats an der Desoxyuridin-Position auf, so dass die DNA nicht weiter amplifiziert werden kann. Das Enzym AmpErase bleibt für einen längeren Zeitraum inaktiv, sobald es Temperaturen über 55 °C ausgesetzt wird (d. h. während der thermostabilen Schritte), und zerstört daher kein während der PCR-Reaktion gebildetes Amplifikat.

Detektion gespaltener, zweifach markierter Sonden und HCV-RNA-Quantifizierung

Der COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0 basiert auf Echtzeit-PCR-Technologie^{24,25}. Die Verwendung von zweifach markierten Fluoreszenzsonden ermöglicht die Echtzeitdetektion der Akkumulation von PCR-Produkten durch Messung der Emissionsintensität der fluoreszierenden Reporterfarbstoffe, die während der Amplifikation freigesetzt werden. Die Sonden bestehen aus HCV- und HCV-QS-spezifischen Oligonukleotidsonden mit einem Reporterfarbstoff und einem Quencherfarbstoff. Beim COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0 werden die HCV- und HCV-QS-Sonden mit unterschiedlichen fluoreszierenden Reporterfarbstoffen markiert. Bei intakten Sonden wird die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffs durch die Nähe des Quencherfarbstoffs aufgrund von Förster-Energietransfer-Effekten unterdrückt. Während der PCR hybridisiert die Sonde mit einer Zielsequenz und wird von der 5' → 3'-Nukleaseaktivität der thermostabilen Z05- und Z05D-DNA-Polymerasen gespalten. Nach Freisetzung und Trennung der Reporter- und Quencherfarbstoffe findet kein Quenching mehr statt und die Fluoreszenzaktivität des Reporterfarbstoffs nimmt zu. Die Amplifikation der HCV-RNA und der HCV-QS-RNA werden unabhängig voneinander bei unterschiedlichen Wellenlängen gemessen. Dieser Vorgang wird für eine festgelegte Anzahl von Zyklen wiederholt, wobei jeder Zyklus die Emissionsintensität der einzelnen Reporterfarbstoffe effektiv verstärkt. Dadurch wird eine unabhängige Identifizierung der HCV-RNA und der HCV-QS-RNA ermöglicht. In welchem PCR-Zyklus eine Wachstumskurve exponentiell zu steigen beginnt, hängt von der Menge des Ausgangsmaterials zu Beginn der PCR ab.

Die quantitative Bestimmung der viralen HCV-RNA erfolgt mit Hilfe des HCV-Quantifizierungsstandards. Dieser dient zur Kompensation von Hemmeffekten und zur Kontrolle des Aufarbeitungs- und Amplifikationsvorgangs, wodurch eine genauere quantitative Bestimmung der HCV-RNA in jeder Probe ermöglicht wird. Der HCV-QS ist ein nicht-infektiöses Armored-RNA-Konstrukt (aRNA), das Fragmente von HCV-Sequenzen mit den gleichen Primer-Bindungsstellen wie die HCV-Ziel-RNA sowie eine eindeutige Sonden-Bindungsregion enthält, welche die Unterscheidung zwischen einem HCV-QS-Amplifikat und einem HCV-Ziel-Amplifikat gestattet.

Der HCV-QS wird mit einer bekannten Anzahl Kopien in jede Probe eingebracht und durch die Probenaufarbeitung, reverse Transkription, PCR-Amplifikation und Detektion der zweifach markierten, gespaltenen Oligonukleotid-Detektionssonden mitgeführt. Der COBAS® TaqMan® Analyzer oder COBAS® TaqMan® 48 Analyzer berechnet die HCV-RNA-Konzentration in den zu untersuchenden Proben durch Vergleich des HCV-Signals mit dem HCV-QS-Signal jeder einzelnen Probe und Kontrolle.

Während der Elongationsphase der PCR im COBAS® TaqMan® Analyzer bzw. COBAS® TaqMan® 48 Analyzer werden die Proben mit Licht einer bestimmten Wellenlänge bestrahlt und dadurch angeregt. Für jede Probe werden Daten zur gefilterten Emissionsfluoreszenz gesammelt. Die für die einzelnen Proben erhaltenen Werte werden dann um die gerätebedingten Schwankungen korrigiert, vom Gerät an die AMPLILINK Software gesendet und in einer Datenbank gespeichert. Mit Hilfe von Vorprüfungen wird festgestellt, ob die Daten für die HCV-RNA und die HCV-QS-RNA gültige Datensätze darstellen. Liegen die Daten außerhalb der voreingestellten Grenzwerte, werden Alarmhinweise (Flags) generiert. Nach erfolgreichem Abschluss aller Vorprüfungen werden die Fluoreszenzwerte bearbeitet, um Ct-Werte für die HCV-RNA und die HCV-QS-RNA zu generieren. Die mit dem COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0 mitgelieferten chargenspezifischen Kalibrierkonstanten werden unter Verwendung von Kalibriermaterial generiert. Sie dienen zur Berechnung der Titerwerte für die Proben und Kontrollen anhand der Differenz zwischen den Ct-Werten der HCV-RNA und der HCV-QS-RNA. Der COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0 wurde gegen den internationalen WHO-Standard für Hepatitis-C-Virus-RNA (für auf Nukleinsäure-Amplifikationstechniken basierende Tests) (NIBSC-Code 96/798)²³ standardisiert. Die Titerergebnisse werden in internationalen Einheiten (IE/ml) angegeben.

REAGENZIEN

COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV

Quantitative Test, v2.0

(P/N: 05532264 190)

HCVQTV2

72 Tests

HCV QT v2.0 CS1

(HCV-Reagenzkassette mit magnetischen Glaspartikeln)

Magnetische Glaspartikel

Tris-Puffer

0,09 % Natriumazid

0,1 % Methylparaben

1 x 72 Tests

1 x 7,0 ml

HCV QT v2.0 CS2

(HCV-Lysereagenzkassette)

Natriumcitratdihydrat

42,5 % Guanidinthiocyanat

< 6 % Polydocanol

0,9 % Dithiothreitol

1 x 72 Tests

1 x 78 ml

HCV QT v2.0 CS3

HCV-Multireagenzkassette mit:

Pase

(Proteinase-Lösung)

Tris-Puffer

< 0,05 % EDTA

Calciumchlorid

Calciumacetat

≤ 7,8 % Proteinase

Glyzerin

1 x 72 Tests

1 x 3,8 ml

EB

(Elutionspuffer)

Tris-Base-Puffer

0,09 % Natriumazid

1 x 8,1 ml

HCV QT v2.0 CS4

HCV-testspezifische Reagenzkassette mit:

QS

(HCV-Quantifizierungsstandard)

Tris-Puffer

EDTA

< 0,002 % Poly rA RNA (synthetisch)

< 0,001 % Armored-HCV-RNA-Konstrukt mit HCV-

Primer-Bindungssequenzen und einer eindeutigen

Sonden-Bindungsregion (nicht-infektiöse RNA aus MS2-Bakteriophage)

0,05 % Natriumazid

1 x 72 Tests

1 x 3,6 ml

MMX (HCV-Master-Mix)	1 x 3,5 ml
Tricinpuffer	
Kaliumacetat	
Kaliumhydroxid	
< 20 % Dimethylsulfoxid	
Glyzerin	
< 0,004 % dATP, dCTP, dGTP, dUTP	
< 0,002 % Upstream- und Downstream-HCV-Primer für die 5'-UTR-Region des HCV-Genoms	
< 0,001 % fluoreszenzmarkierte, für HCV und den HCV-Quantifizierungsstandard spezifische Oligonukleotidsonden	
< 0,001 % Oligonukleotid-Aptamer	
< 0,05 % Z05- und Z05D-DNA-Polymerase (mikrobiell)	
< 0,1 % AmpErase-Enzym (Uracil-N-Glykosylase) (mikrobiell)	
0,09 % Natriumazid	
Mn²⁺ (Manganlösung)	1 x 19,8 ml
< 0,5 % Manganacetat	
Eisessig	
0,09 % Natriumazid	
HCV H(+)C, v2.0	6 x 0,85 ml
(Hoch positive HCV-Kontrolle)	
< 0,001 % Armored HCV-RNA-Konstrukt mit HCV-Sequenzen (nicht-infektiöse RNA aus MS2-Bakteriophage)	
Negatives Humanplasma, in Tests nicht reaktiv auf HCV-Antikörper, HIV-1/2-Antikörper, HIV-p24-Antigen und HBsAg; HIV-1-RNA, HCV-RNA und HBV-DNA durch PCR-Methoden nicht nachweisbar	
0,1 % ProClin [®] 300 als Konservierungsmittel	
HCV L(+)C, v2.0	6 x 0,85 ml
(Schwach positive HCV-Kontrolle)	
< 0,001 % Armored HCV-RNA-Konstrukt mit HCV-Sequenzen (nicht-infektiöse RNA aus MS2-Bakteriophage)	
Negatives Humanplasma, in Tests nicht reaktiv auf HCV-Antikörper, HIV-1/2-Antikörper, HIV-p24-Antigen und HBsAg; HIV-1-RNA, HCV-RNA und HBV-DNA durch PCR-Methoden nicht nachweisbar	
0,1 % ProClin [®] 300 als Konservierungsmittel	
CTM (-) C	6 x 1,0 ml
[COBAS [®] TaqMan [®] Negativkontrolle (Humanplasma)]	
Negatives Humanplasma, in Tests nicht reaktiv auf HCV-Antikörper, HIV-1/2-Antikörper, HIV-p24-Antigen und HBsAg; HIV-1-RNA, HCV-RNA und HBV-DNA durch PCR-Methoden nicht nachweisbar	
0,1 % ProClin [®] 300 als Konservierungsmittel	
HCV H(+)C, v2.0 Clip	1 x 6 Clips
(Barcode-Clip für hoch positive HCV-Kontrolle)	
HCV L(+)C, v2.0 Clip	1 x 6 Clips
(Barcode-Clip für schwach positive HCV-Kontrolle)	
HCV (-) C, v2.0 Clip	1 x 6 Clips
(Barcode-Clip für HCV-Negativkontrolle)	

PG WR

(COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® Waschreagenz)
Natriumcitratdihydrat
< 0,1 % N-Methylisothiazolon-HCl

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Wie bei allen Testverfahren ist gute Laborpraxis eine unerlässliche Voraussetzung für die ordnungsgemäße Durchführung dieses Tests. Aufgrund der hohen Sensitivität dieses Tests ist besonders darauf zu achten, dass die Reagenzien und Amplifikationsgemische nicht kontaminiert werden.

- A. *IN-VITRO*-DIAGNOSTIKUM.
- B. Dieser Test darf nur für Humanserum oder -plasma verwendet werden, das im Antikoagulans EDTA gesammelt wurde.
- C. Nicht mit dem Mund pipettieren.
- D. In den Arbeitsbereichen des Labors nicht essen, trinken oder rauchen. Beim Umgang mit Proben und Testreagenzien Einweghandschuhe, Laborkittel und Schutzbrille tragen. Nach Umgang mit Proben und Testreagenzien gründlich die Hände waschen.
- E. Bei der Entnahme von Aliquots aus den Kontrollfläschchen Kontamination der Reagenzien durch Mikroorganismen und Ribonuklease vermeiden.
- F. Es wird empfohlen, sterile Einwegpipetten und RNase-freie Pipettenspitzen zu verwenden.
- G. Kontrollen aus unterschiedlichen Chargen oder verschiedenen Fläschchen der gleichen Charge nicht miteinander vermischen.
- H. Reagenzkassetten oder Kontrollen aus verschiedenen Kits nicht miteinander vermischen.
- I. Die COBAS® AmpliPrep-Kassetten nicht öffnen und keine Flaschen auswechseln, mischen, entfernen oder hinzufügen.
- J. Nicht verbrauchte Reagenzien, Abfallmaterial und Proben gemäß den geltenden Vorschriften entsorgen.
- K. Kit nach dem Verfallsdatum nicht mehr verwenden.
- L. Sicherheitsdatenblätter (Safety Data Sheets, SDS) sind auf Anfrage bei der zuständigen Roche-Vertretung erhältlich.
- M. Proben und Kontrollen sind als potenziell infektiös und gemäß den Vorschriften für sicheres Arbeiten im Labor, wie in *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*¹⁹ sowie im CLSI-Dokument M29-A3²⁰ beschrieben, zu behandeln. Alle Arbeitsflächen sind mit einer frisch zubereiteten Lösung aus 0,5 %igem Natriumhypochlorit in entionisiertem oder destilliertem Wasser gründlich zu reinigen und zu desinfizieren.
- N. **CTM (-) C, HCV L(+)**C**, v2.0** und **HCV H(+)**C**, v2.0** enthalten aus Humanblut gewonnenes Humanplasma. Das Ausgangsmaterial wurde getestet und für nicht reaktiv bezüglich Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAg), Antikörper gegen HIV-1/2 und HCV sowie HIV-p24-Antigen befunden. Bei der Untersuchung von negativem Humanplasma mittels PCR-Methoden konnte weder HIV-1-RNA, HCV-RNA noch HBV-DNA nachgewiesen werden. Mit keiner der bekannten Testmethoden kann jedoch eine Übertragung von Infektionserregern durch humane Blutprodukte ausgeschlossen werden. Deshalb sind alle Materialien humanen Ursprungs, einschließlich **CTM (-) C, HCV L(+)**C**, v2.0** und **HCV H(+)**C**, v2.0**, als potenziell infektiös zu betrachten.
- O. **MGP, EB, QS, Mn²⁺** und **MMX** enthalten Natriumazid. Natriumazid kann bei der Reaktion mit Blei- und Kupferleitungen hochexplosive Metallazide bilden. Beim Ausgießen natriumazidhaltiger Lösungen in Laborwaschbecken mit reichlich Wasser nachspülen, um Azidansammlung zu vermeiden.

- P. Beim Umgang mit Reagenzien Augenschutz, Laborkittel und Einweghandschuhe tragen. Haut, Augen und Schleimhäute vor Kontakt mit diesen Materialien schützen. Bei Kontakt sofort mit reichlich Wasser abspülen. Unbehandelt können Verätzungen entstehen. Falls diese Reagenzien verschüttet werden, vor dem Trockenwischen mit Wasser verdünnen.
- Q. **HCV QT v2.0 CS2** und Flüssigabfall, einschließlich gebrauchte COBAS® AmpliPrep Probenverarbeitungseinheiten (SPUs) vom COBAS® AmpliPrep Instrument, die Guanidinthiocyanat enthalten, nicht mit Natriumhypochloritlösung (Haushaltsbleiche) in Kontakt kommen lassen. Diese Gemische können ein hochgiftiges Gas bilden.

LAGERUNG UND HANDHABUNG

- A. **HCV QT v2.0 CS1, HCV QT v2.0 CS2, HCV QT v2.0 CS3** und **HCV QT v2.0 CS4** bei 2-8 °C lagern. Nicht angebrochene Reagenzien bleiben bis zum angegebenen Verfallsdatum stabil. Geöffnet bleiben diese Reagenzien bei 2-8 °C 70 Tage bzw. maximal bis zum Verfallsdatum stabil. **HCV QT v2.0 CS1, HCV QT v2.0 CS2, HCV QT v2.0 CS3** und **HCV QT v2.0 CS4** können insgesamt bis zu maximal 96 Stunden im COBAS® AmpliPrep Instrument verbleiben. Zwischen den Gerätezyklen müssen die Reagenzien bei 2-8 °C gelagert werden.
- B. **HCV H(+)C, v2.0, HCV L(+)C, v2.0** und **CTM (-) C** bei 2-8 °C lagern. Die Kontrollen bleiben bis zum angegebenen Verfallsdatum stabil. Nach dem Öffnen nicht verbrauchtes Material verwerfen.
- C. Die Barcode-Clips **[HCV H(+)C, v2.0 Clip, HCV L(+)C, v2.0 Clip** und **HCV (-) C, v2.0 Clip]** bei 2-30 °C lagern.
- D. **PG WR** bei 2-30 °C lagern. **PG WR** bleibt ungeöffnet bis zum angegebenen Verfallsdatum stabil. Geöffnet bleibt dieses Reagenz bei 2-30 °C 28 Tage bzw. maximal bis zum Verfallsdatum stabil.

MITGELIEFERTER MATERIALIEN

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

HCVQTV2

HCV QT v2.0 CS1

(HCV-Reagenzkassette mit magnetischen Glaspartikeln)

HCV QT v2.0 CS2

(HCV-Lysereagenzkassette)

HCV QT v2.0 CS3

(HCV-Multireagenzkassette)

HCV QT v2.0 CS4

(HCV-testspezifische Reagenzkassette)

HCV H(+)C, v2.0

(Hoch positive HCV-Kontrolle)

HCV L(+)C, v2.0

(Schwach positive HCV-Kontrolle)

CTM (-) C

[COBAS® TaqMan® Negativkontrolle (Humanplasma)]

HCV H(+)C, v2.0 Clip

(Barcode-Clip für hoch positive HCV-Kontrolle)

HCV L(+)C, v2.0 Clip

(Barcode-Clip für schwach positive HCV-Kontrolle)

HCV (-) C, v2.0 Clip

(Barcode-Clip für HCV-Negativkontrolle)

PG WR

(COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® Waschreagenz)

ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

Geräte und Software

- COBAS® AmpliPrep Instrument
- COBAS® TaqMan® Analyzer oder COBAS® TaqMan® 48 Analyzer
- Docking Station (optional)
- **cobas p** 630 instrument (optional)
- AMPLILINK Software, Version 3.3 oder Version 3.4
- Control Unit für die AMPLILINK Software, mit Drucker
- Geräte- und Anwendungshandbücher:
 - Gerätehandbuch für das COBAS® AmpliPrep Instrument zur Verwendung mit der AMPLILINK Software, Version 3.3 und 3.4
 - Gerätehandbuch für den COBAS® TaqMan® Analyzer zur Verwendung mit der AMPLILINK Software, Version 3.3 und 3.4
 - Gerätehandbuch für den COBAS® TaqMan® 48 Analyzer zur Verwendung mit der AMPLILINK Software, Version 3.3 und 3.4
 - Anwendungshandbuch für die AMPLILINK Software, Version 3.3, zur Verwendung mit dem COBAS® AmpliPrep Instrument, COBAS® TaqMan® Analyzer, COBAS® TaqMan® 48 Analyzer, COBAS® AMPLICOR Analyzer und **cobas p** 630 instrumentoder
 - Anwendungshandbuch für die AMPLILINK Software, Version 3.4
 - Optional: Benutzerhandbuch für das **cobas p** 630 instrument, Softwareversion 2.2
- Testdefinitionsdatei (TDF). Den Namen und die aktuelle Version der TDF finden Sie auf der dem Kit beiliegenden Produktinformationskarte.

Weiteres Material

- Probenrack (SK24-Rack)
- Reagenzienrack
- SPU-Rack
- K-Carrier
- K-Carrier-Transporter
- K-Carrier-Rack
- Pipetten mit RNase-freien Aerosolfilter- oder Kolbenhub-Pipettenspitzen (Kapazität 1000 µl); die Genauigkeit der Pipetten darf nicht mehr als 3 % vom Nennvolumen abweichen. Um eine Kreuzkontamination der Proben und Amplifikate zu verhindern, müssen RNase-freie Aerosolfilter- oder Kolbenhub-Pipettenspitzen verwendet werden.
- Einweghandschuhe, puderfrei
- Vortexer

Einwegartikel

- Probenverarbeitungseinheiten (SPUs)
- Probenröhrchen (S-Tubes) mit Barcode-Clips
- K-Tip-Rack
- K-Tubes, Packung mit 12 x 96 Stück

ENTNAHME, TRANSPORT UND LAGERUNG VON PROBEN

HINWEIS: *Alle Proben und Kontrollen wie potenzielle Überträger von Infektionserregern behandeln.*

Entnahme und Lagerung von Proben

Der COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0 ist für die Analyse von Serum- oder EDTA-Plasmaproben vorgesehen. Das Blut ist in SST® Serumtrennröhrchen, BD Vacutainer® PPT™ Plasmaporbereitungsröhrchen für molekulare diagnostische Tests oder in sterilen Röhrchen mit EDTA (lila Deckel) als Antikoagulans zu entnehmen. Bei der Handhabung der Sammelröhrchen die Anweisungen des Herstellers beachten. Frisch entnommene Proben (Vollblut) können vor dem Zentrifugieren bis zu 24 Stunden bei 2-25 °C gelagert werden. Nach dem Zentrifugieren muss das Serum oder EDTA-Plasma in ein steriles Polypropylenröhrchen gegeben werden. Es wird empfohlen, die Proben in Aliquots von ca. 1000 µl in sterilen 2,0-ml-Polypropylenröhrchen mit Schraubverschluss (z. B. 2-ml-Mikroröhrchen mit Schraubverschluss von Sarstedt) zu lagern. Serum- oder EDTA-Plasmaproben können wie folgt gelagert werden:

- Bei 2-8 °C bis zu 72 Stunden
- Bei -20 °C bis -80 °C bis zu 6 Wochen

Serum- und EDTA-Plasmaproben können höchstens fünfmal ohne Verlust von HCV-RNA eingefroren und wieder aufgetaut werden.

Probentransport

Beim Transport von Vollblut, Serum oder EDTA-Plasma sind die geltenden Vorschriften für den Transport von Krankheitserregern zu beachten²¹. Vollblutproben müssen bei 2-25 °C transportiert und innerhalb von 24 Stunden nach der Entnahme zentrifugiert werden. EDTA-Plasma oder Serum kann bei 2-8 °C oder tiefgefroren bei -20 °C bis -80 °C transportiert werden.

GEBRAUCHSANLEITUNG

Ausführliche Informationen zur Bedienung, zu den Konfigurationsmöglichkeiten, zum Ausdrucken von Ergebnissen und zur Interpretation von Alarmhinweisen, Anmerkungen und Fehlermeldungen sind den unter „Geräte und Software“ aufgeführten Handbüchern für die AMPLILINK Software der Version 3.3 oder Version 3.4 zu entnehmen.

Batch-Umfang und Arbeitsablauf

Die Reagenzien jedes Kits reichen für 72 Tests aus, die in Batches von 12 bis 24 Tests durchgeführt werden können. In jedem Batch muss mindestens je eine Kontrolle [**CTM (-) C, HCV L(+)-C, v2.0** und **HCV H(+)-C, v2.0**] mitgeführt werden (siehe Abschnitt „Qualitätskontrolle“). Der Lauf auf dem COBAS® TaqMan® Analyzer oder COBAS® TaqMan® 48 Analyzer muss innerhalb von 120 Minuten nach Abschluss der Proben- und Kontrollaufarbeitung gestartet werden. Die verarbeiteten Proben und Kontrollen NICHT EINFRIEREN oder bei 2-8 °C LAGERN.

Aufarbeitung der Proben und Kontrollen

Tiefgefrorene Proben bei Raumtemperatur vollständig auftauen lassen und vor der Verwendung 3-5 Sekunden mit dem Vortexer mischen. Kontrollen sind vor dem Gebrauch aus der Kühlung (2-8 °C) zu nehmen, auf Raumtemperatur zu äquilibrieren und 3-5 Sekunden mit dem Vortexer zu mischen.

Teil A. Wartung und Systeminitialisierung

- A1. Das COBAS® AmpliPrep Instrument ist im Bereitschaftsmodus einsatzbereit.
- A2. Die Control Unit für die AMPLILINK Software einschalten (ON). Die Control Unit wie folgt vorbereiten:
 1. Beim Betriebssystem Microsoft Windows anmelden.
 2. Auf das Symbol für die AMPLILINK Software doppelklicken.
 3. Zugewiesene Benutzer-ID und Kennwort eingeben, um die AMPLILINK Software zu starten.
- A3. Im Bildschirm **Status** den Vorrat an Waschreagenz (**PG WR**) überprüfen und ggf. nachfüllen.
- A4. Alle auf der Registerkarte **Due** aufgeführten Wartungsschritte ausführen. Das COBAS® AmpliPrep Instrument führt automatisch einen Spülzyklus durch.

Teil B. Laden der Reagenzkassetten

HINWEIS: *Alle Reagenzkassetten sind aus der Kühlung (2-8 °C) zu nehmen, sofort in das COBAS® AmpliPrep Instrument zu laden und im Gerät mindestens 30 Minuten auf Raumtemperatur zu äquilibrieren, bevor die erste Probe verarbeitet wird. Die Reagenzkassetten dürfen sich nicht außerhalb des Geräts auf Raumtemperatur erwärmen, da sich sonst Kondenswasser auf den Barcode-Etiketten bilden kann. Die Barcode-Etiketten nicht abwischen, wenn sich Kondenswasser gebildet hat.*

- B1. **HCV QT v2.0 CS1** in ein Reagenzienrack setzen. **HCV QT v2.0 CS2**, **HCV QT v2.0 CS3** und **HCV QT v2.0 CS4** in ein separates Reagenzienrack setzen.
- B2. Das Reagenzienrack mit **HCV QT v2.0 CS1** in Rackposition A des COBAS® AmpliPrep Instrument setzen.
- B3. Das Reagenzienrack mit **HCV QT v2.0 CS2**, **HCV QT v2.0 CS3** und **HCV QT v2.0 CS4** in Rackposition **B**, **C**, **D** oder **E** des COBAS® AmpliPrep Instrument setzen (weitere detaillierte Informationen sind den entsprechenden Gerätehandbüchern zu entnehmen).

Teil C. Laden der Verbrauchsmaterialien

HINWEIS: *Die erforderliche Anzahl COBAS® AmpliPrep Reagenzkassetten, Probenverarbeitungseinheiten (SPUs), Probenröhrchen (S-Tubes), K-Tips und K-Tubes bestimmen. Für jede Probe bzw. Kontrolle wird eine SPU, ein Input S-Tube, ein K-Tip und ein K-Tube benötigt.*

Für die Verwendung des COBAS® AmpliPrep Instrument in Verbindung mit dem COBAS® TaqMan® Analyzer oder COBAS® TaqMan® 48 Analyzer sind mehrere Konfigurationen möglich. Je nach Konfiguration die entsprechende Anzahl Reagenzkassettenracks, Probenracks mit Input S-Tubes, SPU-Racks, K-Tip-Racks, K-Tube-Racks und K-Carriern auf K-Carrier-Racks in die jeweiligen Rackpositionen im COBAS® AmpliPrep Instrument einsetzen.

- C1. Die SPUs in ein bzw. mehrere SPU-Racks setzen und die Racks in Rackposition **J**, **K** oder **L** des COBAS® AmpliPrep Instrument einsetzen.
- C2. Je nach Konfiguration die bestückten K-Tube-Racks in Rackposition **M**, **N**, **O** oder **P** des COBAS® AmpliPrep Instrument setzen.
- C3. Die bestückten K-Tip-Racks in Rackposition **M**, **N**, **O** oder **P** des COBAS® AmpliPrep Instrument setzen.
- C4. Je nach Konfiguration die K-Carrier auf K-Carrier-Racks in Rackposition **M**, **N**, **O** oder **P** des COBAS® AmpliPrep Instrument setzen.

Teil D. Anforderung und Laden der Proben

- D1. Probenracks wie folgt vorbereiten: Alle Positionen im Probenrack, in die eine Probe (S-Tube) eingesetzt werden soll, mit einem Barcode-Etiketten-Clip versehen. Alle Positionen im Probenrack, in die eine Kontrolle (S-Tube) eingesetzt werden soll, mit einem der spezifischen Barcode-Etiketten-Clips für die Kontrollen [CTM (-) C, HCV L(+)**C**, v2.0 und HCV H(+)**C**, v2.0] versehen. Die Chargennummer der Kontrollen auf den Barcode-Etiketten-Clips muss mit der Chargennummer auf den Kontrollfläschchen im Kit identisch sein. Darauf achten, dass die richtige Kontrolle in die Position mit dem passenden Kontroll-Barcode-Clip eingesetzt wird. In jede Position mit Barcode-Etiketten-Clip ein Input S-Tube setzen.
- D2. Mit Hilfe der AMPLILINK Software für jede Probe und Kontrolle auf der Registerkarte **Sample** des Fensters **Orders** Probenanforderungen erstellen. Die entsprechende Testdatei auswählen und mit Speichern abschließen.
- D3. Auf der Registerkarte **Sample Rack** im Fenster **Orders** den Probenrackpositionen Proben- und Kontrollanforderungen zuweisen. Die Probenracknummer des in Schritt D1 vorbereiteten Racks verwenden.
- D4. Den Sample Rack Order-Bericht zur Verwendung als Arbeitsbogen ausdrucken.
- D5. Die Racks mit den Proben und Kontrollen in dem für das Hinzufügen von Proben und Kontrollen vorgesehenen Bereich wie folgt vorbereiten: Alle Proben und Kontrollen [CTM (-) C, HCV L(+)**C**, v2.0 und HCV H(+)**C**, v2.0] 3 bis 5 Sekunden mit dem Vortexer mischen. Darauf achten, dass die Handschuhe beim Umgang mit den Proben und Kontrollen nicht kontaminiert werden.
- D6. Mit einer Mikropipette mit RNase-freier Aerosolfilter- oder Kolbenhub-Pipettenspitze 650 µl jeder Probe und Kontrolle [CTM (-) C, HCV L(+)**C**, v2.0 und HCV H(+)**C**, v2.0] in das entsprechende, mit Barcode versehene Input S-Tube geben. **Darauf achten, dass keine Partikel oder Fibringerinnsel von der ursprünglichen Probe in das Input S-Tube übertragen werden.** Die Proben und Kontrollen sind in die zugewiesenen Röhrchenpositionen zu überführen, die auf dem in Schritt D4 genannten Arbeitsbogen angegeben sind. Die Chargennummer der Kontrollen auf den Barcode-Etiketten-Clips muss mit der Chargennummer auf den Kontrollfläschchen im Kit identisch sein. Die richtige Kontrolle in die Position mit dem passenden Kontroll-Barcode-Clip einsetzen. **Darauf achten, dass der obere Teil der S-Tubes nicht mit den Proben oder Kontrollen kontaminiert wird.**
- D7. Informationen zur Probenaufarbeitung mit dem **cobas p 630** instrument finden Sie im Benutzerhandbuch für das **cobas p 630** instrument.
- D8. Je nach Konfiguration die mit Input S-Tubes bestückten Probenracks in Rackposition **F**, **G** oder **H** des COBAS® AmpliPrep Instrument setzen.
- D9. Je nach Konfiguration die Probenracks mit Input S-Tubes und K-Tubes (für jedes Input S-Tube wird ein K-Tube in die Position rechts neben dem Input S-Tube geladen) in Rackposition **F**, **G** oder **H** des COBAS® AmpliPrep Instrument laden.

Teil E. Start des Laufs auf dem COBAS® AmpliPrep Instrument

- E1. Das COBAS® AmpliPrep Instrument über die AMPLILINK Software starten.

Teil F. Ende des Laufs auf dem COBAS® AmpliPrep Instrument und Überführung in den COBAS® TaqMan® Analyzer oder COBAS® TaqMan® 48 Analyzer (nur für manuelle Überführung)

- F1. Vorliegen von Alarmhinweisen (Flags) oder Fehlermeldungen prüfen.
- F2. Die verarbeiteten Proben und Kontrollen je nach Konfiguration auf Probenracks (COBAS® TaqMan® Analyzer ohne Docking Station) bzw. K-Carrier-Racks (COBAS® TaqMan® 48 Analyzer) aus dem COBAS® AmpliPrep Instrument nehmen.
- F3. Den Flüssigabfall aus dem COBAS® AmpliPrep Instrument entfernen.

HINWEIS: *Alle verarbeiteten Proben und Kontrollen müssen nach Abschluss der Proben- und Kontrollaufarbeitung lichtgeschützt aufbewahrt werden.*

Amplifikation und Detektion

Vorbereitung des COBAS® TaqMan® Analyzers oder COBAS® TaqMan® 48 Analyzers

Der Lauf auf dem COBAS® TaqMan® Analyzer oder COBAS® TaqMan® 48 Analyzer muss innerhalb von 120 Minuten nach Abschluss der Proben- und Kontrollaufarbeitung gestartet werden. Die verarbeiteten Proben und Kontrollen NICHT EINFRIEREN oder bei 2-8 °C LAGERN.

Teil G. Laden der verarbeiteten Proben

- G1. Je nach Gerätekonfiguration die entsprechenden Schritte zur Überführung der K-Tubes in den COBAS® TaqMan® Analyzer bzw. COBAS® TaqMan® 48 Analyzer ausführen:

Teil H. Start des Laufs auf dem COBAS® TaqMan® Analyzer oder COBAS® TaqMan® 48 Analyzer

- H1. Je nach verwendeter Konfiguration den COBAS® TaqMan® Analyzer oder COBAS® TaqMan® 48 Analyzer starten.

Teil I. Ende des Laufs auf dem COBAS® TaqMan® Analyzer oder COBAS® TaqMan® 48 Analyzer

- I1. Nach Abschluss des Laufs auf dem COBAS® TaqMan® Analyzer bzw. COBAS® TaqMan® 48 Analyzer den Ergebnisbericht ausdrucken. Den Ergebnisbericht auf Alarmhinweise (Flags) oder Fehlermeldungen prüfen. Proben mit Alarmhinweisen bzw. Meldungen werden interpretiert wie im Abschnitt „Ergebnisse“ beschrieben. Nachdem die Daten akzeptiert wurden, sind diese im Archiv zu speichern.
- I2. Die gebrauchten K-Tubes aus dem COBAS® TaqMan® Analyzer bzw. COBAS® TaqMan® 48 Analyzer entnehmen.

QUALITÄTSKONTROLLE

In jedem Test-Batch muss je eine COBAS® TaqMan® Negativkontrolle, eine schwach positive HCV-Kontrolle und eine hoch positive HCV-Kontrolle mitgeführt werden. Der Batch ist gültig, wenn keine Alarmhinweise für die Kontrollen [**HCV L(+)**C, **v2.0**, **HCV H(+)**C, **v2.0** und **CTM (-)** C] vorliegen.

Die Kontrollen können an jeder beliebigen Position im Probenrack mitgeführt werden.

Der Ergebnisausdruck der Batches ist auf Alarmhinweise (Flags) und Anmerkungen zu überprüfen, um sicherzustellen, dass der jeweilige Batch gültig ist.

Negativkontrolle

Für **CTM (-)** C muss das Ergebnis „Target Not Detected“ lauten. Wird **CTM (-)** C als ungültig markiert, ist der gesamte Batch ungültig. In diesem Fall ist das gesamte Testverfahren (Aufarbeitung der Proben und Kontrollen, Amplifikation und Detektion) zu wiederholen. Falls die Negativkontrolle **CTM (-)** C in verschiedenen Batches durchgehend ungültig ist, wenden Sie sich bitte an den technischen Kundendienst der zuständigen Roche-Vertretung.

Positivkontrollen

Der Sollbereich für **HCV L(+)**C, **v2.0** und **HCV H(+)**C, **v2.0** ist für jedes Reagenz spezifisch und ist in den Barcodes der Reagenzkassetten des COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0 angegeben.

Die IE/ml-Werte der HCV-RNA für **HCV L(+)**C, **v2.0** und **HCV H(+)**C, **v2.0** müssen innerhalb der Sollbereiche liegen. Wenn eine oder beide Positivkontrollen als ungültig markiert sind, ist der gesamte Batch ungültig. In diesem Fall ist das gesamte Testverfahren (Aufarbeitung der Proben und Kontrollen, Amplifikation und Detektion) zu wiederholen. Wenn der HCV-RNA-Titer einer oder beider Positivkontrollen in verschiedenen Batches durchgehend außerhalb des entsprechenden Sollbereichs liegt, wenden Sie sich bitte an den technischen Kundendienst der zuständigen Roche-Vertretung.

ERGEBNISSE

Die HCV-RNA-Konzentration der Proben und Kontrollen wird automatisch vom COBAS® TaqMan® Analyzer oder COBAS® TaqMan® 48 Analyzer bestimmt. Die HCV-RNA-Konzentration wird in Internationalen Einheiten (IE) pro ml angegeben.

AMPLILINK Software:

- Ermittelt den Ct-Wert für die HCV-RNA und die HCV-QS-RNA.
- Ermittelt die HCV-RNA-Konzentration anhand der Ct-Werte für die HCV-RNA und HCV-QS-RNA und der chargenspezifischen Kalibrierkoeffizienten, die in den Barcodes der Kassetten angegeben sind.
- Ermittelt, ob die errechneten IE/ml-Werte für **HCV L(+)**C**, v2.0** und **HCV H(+)**C**, v2.0** innerhalb der Sollbereiche liegen.

Batch-Validierung:

Das Ergebnisfenster der AMPLILINK Software oder der Ergebnisausdruck sind auf Alarmhinweise und Meldungen zu überprüfen, um sicherzustellen, dass der jeweilige Batch gültig ist.

Bei den Kontrollen wird überprüft, ob der für die Kontrolle erhaltene IE/ml-Wert im jeweiligen Sollbereich liegt. Liegt der IE/ml-Wert einer Kontrolle außerhalb des Sollbereichs, wird ein Alarmhinweis (Flag) erzeugt, der anzeigt, dass die Kontrolle ungültig ist.

Der Batch ist gültig, wenn keine Alarmhinweise für die Kontrollen [**HCV L(+)**C**, v2.0**, **HCV H(+)**C**, v2.0** und **CTM (-) **C****] vorliegen.

Der Batch ist ungültig, wenn für die HCV-Kontrollen einer der folgenden Alarmhinweise angezeigt wird:

Negativkontrolle:

Alarmhinweis	Ergebnis	Interpretation
NC_INVALID	Invalid	Ungültiges Ergebnis oder der errechnete Titer-Wert der Negativkontrolle ist nicht negativ, d. h. das Ergebnis „Target Not Detected“ wird nicht generiert.

Schwach positive HCV-Kontrolle:

Alarmhinweis	Ergebnis	Interpretation
LPCINVALID	Invalid	Ungültiges Ergebnis oder der errechnete Titerwert für die schwach positive Kontrolle liegt nicht im Sollbereich.

Hoch positive HCV-Kontrolle:

Alarmhinweis	Ergebnis	Interpretation
HPCINVALID	Invalid	Ungültiges Ergebnis oder der errechnete Titerwert für die hoch positive Kontrolle liegt nicht im Sollbereich.

Falls der Batch ungültig ist, gesamtes Testverfahren (Aufarbeitung der Proben und Kontrollen, reverse Transkription, Amplifikation und Detektion) wiederholen.

Interpretation der Ergebnisse:

Ist der Batch gültig, ist auf dem Ergebnisausdruck für jede einzelne Probe zu prüfen, ob Alarmhinweise oder Anmerkungen vorliegen.

⇒ Ein gültiger Batch kann sowohl gültige als auch ungültige Probenergebnisse beinhalten, je nachdem, ob für die einzelnen Proben Alarmhinweise und/oder Anmerkungen angezeigt werden.

Probenergebnisse sind wie folgt zu interpretieren:

Ergebnis	Interpretation
Target Not Detected	Der Ct-Wert für HCV liegt oberhalb des Grenzwertes oder es wurde kein Ct-Wert für HCV gemessen. Ergebnisse als „HCV-RNA nicht nachgewiesen“ angeben.
<1.50E+01 IU/mL	Der errechnete IE/ml-Wert liegt unterhalb der unteren Quantifizierungsgrenze (Lower Limit of Quantitation = LLOQ) des Tests. Ergebnisse als „HCV-RNA nachgewiesen, weniger als 15 IE/ml HCV-RNA“ angeben.
≥1.50E+01 IU/mL und ≤1.00E+08 IU/mL	Errechnete Ergebnisse, die größer oder gleich 15 IE/ml und kleiner oder gleich 1,00E+08 IE/ml sind, liegen innerhalb des linearen Bereichs des Tests. Ergebnisse als „XX IE/ml HCV-RNA nachgewiesen“ angeben.
>1.00E+08 IU/mL	Die errechneten Ergebnisse liegen oberhalb des linearen Bereichs des Tests. Ergebnisse als „größer als 1,00E+08 IE/ml HCV-RNA“ angeben. Wenn quantitative Ergebnisse gewünscht werden, die ursprüngliche Probe je nach Matrix mit HCV-negativem Humanserum oder EDTA-Plasma verdünnen und den Test wiederholen. Das dabei ermittelte Ergebnis mit dem Verdünnungsfaktor multiplizieren.

Wenn für das Probenergebnis „Failed“, „Invalid“ oder „Aborted“ angezeigt wird, sind weitere Informationen dem Anwendungshandbuch zur AMPLILINK Software der Version 3.3 oder Version 3.4 (siehe Abschnitt „Zusätzlich benötigtes Material“) zu entnehmen.

HINWEIS: *Hoch positive Proben können auch ein ungültiges Ergebnis mit dem Alarmhinweis „QS_INVALID“ liefern. Wenn quantitative Ergebnisse gewünscht werden, die ursprüngliche Probe je nach Matrix mit HCV-negativem Humanserum oder EDTA-Plasma verdünnen und den Test wiederholen. Das dabei ermittelte Ergebnis mit dem Verdünnungsfaktor multiplizieren.*

GRENZEN DES VERFAHRENS

1. Dieser Test wurde nur für die Bestimmung von Humanserum oder -plasma, das mit EDTA als Antikoagulans gesammelt wurde, validiert. Wenn andere Arten von Proben getestet werden, können falsche Ergebnisse erzielt werden.
2. Mutationen in den hochkonservierten Regionen des viralen Genoms, die durch die Primer bzw. Sonden des Tests abgedeckt sind, treten zwar selten auf, können jedoch zu fälschlicherweise niedrigen Werten bei der quantitativen Bestimmung oder zur Nichterkennung des Virus führen.
3. Die HCV-RNA-Quantifizierung hängt von der Anzahl der in der Probe enthaltenen Virenpartikel ab und kann durch das Probenentnahmeverfahren, patientenbezogene Faktoren (Alter, Vorhandensein von Symptomen usw.) und/oder das Infektionsstadium beeinflusst werden.
4. Zuverlässige Ergebnisse sind nur bei Anwendung sachgemäßer Verfahren für Entnahme, Transport, Lagerung und Bearbeitung der Proben gewährleistet.
5. Die Kontaminationsgefahr durch Amplifikate wird durch den Zusatz des Enzyms AmpErase zum COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV-Master-Mix verringert. Eine Kontamination durch HCV-positive Kontrollen und klinische Proben lässt sich jedoch nur durch Gute Laborpraxis (GLP) und sorgfältige Einhaltung der in dieser Packungsbeilage beschriebenen Vorgehensweisen vermeiden.

- Dieses Produkt sollte nur von Personal verwendet werden, das in der Bedienung des **cobas p 630** instruments (optional), des COBAS® AmpliPrep Instrument und des COBAS® TaqMan® Analyzers bzw. des COBAS® TaqMan® 48 Analyzers entsprechend geschult ist. Der Bediener sollte über eingehende Kenntnisse zu den auf den Geräten ausgeführten Anwendungen verfügen und die gute Laborpraxis einhalten.
- Dieses Produkt darf nur zusammen mit dem **cobas p 630** instrument (optional), dem COBAS® AmpliPrep Instrument und dem COBAS® TaqMan® Analyzer bzw. dem COBAS® TaqMan® 48 Analyzer verwendet werden.
- Bevor Benutzer zwischen verschiedenen Verfahren wechseln, sollten sie aufgrund der inhärenten Unterschiede zwischen den Verfahren in ihrem Labor Studien zur Korrelation der Methoden durchführen, um die Unterschiede der Verfahren zu ermitteln.

STÖRSUBSTANZEN

Erhöhte Triglyzeridwerte (3300 mg/dl), erhöhtes direktes Bilirubin (25 mg/dl) und indirektes Bilirubin (20 mg/dl), erhöhte Albuminwerte (6000 mg/dl), Hämoglobinwerte (200 mg/dl) und Human-DNA-Werte (40 mg/dl) in Proben sowie Autoimmunerkrankungen wie systemischer Lupus erythematosus (SLE), rheumatoide Arthritis (RA) und antinukleäre Antikörper (ANA) haben keinen störenden Einfluss auf die quantitative Bestimmung der HCV-RNA mit dem COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0.

Die folgenden Präparate haben in Tests bei einer maximalen Plasmakonzentration (C_{max}) und dem dreifachen C_{max} keinen Störeinfluss auf die quantitative Bestimmung der HCV-RNA mit dem COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0:

Nukleotid-Reverse-Transkriptase- und DNA-Polymerase-Inhibitoren Tenofovir Adefovir dipivoxil	Nicht-Nukleosid-Reverse-Transkriptase-Inhibitoren Efavirenz Nevirapin
HIV-Protease-Inhibitoren Atazanavir Saquinavir Ritonavir Lopinavir/Ritonavir Nelfinavir Darunavir Tipranavir Fosamprenavir	Nukleosid-Reverse-Transkriptase-Inhibitoren Lamivudin Zidovudin Stavudin Abacavir Didanosin Emtricitabin Entecavir Telbivudin
HIV-Fusionsinhibitor Enfuvirtid	HIV-Entry-Inhibitor Maraviroc
Substanzen zur Behandlung von Herpes-Viren Ganciclovir Valganciclovir Acyclovir	Immunmodulatoren Peginterferon alfa-2b Ribavirin Peginterferon alfa-2a
HIV-Integrase-Inhibitor Raltegravir	

NICHT-KLINISCHE LEISTUNGSMERKMALE

A. Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze (LOD) des COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0 wurde durch Analyse von Reihenverdünnungen des internationalen WHO-Standards für Hepatitis-C-Virus-RNA für auf Nukleinsäure-Amplifikationstechniken basierende Tests (vom NIBSC erhalten; Genotyp 1a) in HCV-negativem humanen EDTA-Plasma oder Serum bestimmt. Für jede Matrix wurden drei unabhängige Verdünnungsreihen analysiert. Insgesamt wurden für jeden Matrixtyp bis zu 252 Replikate pro Konzentrationsstufe getestet. Die Untersuchung wurde mit drei Reagenzchargen des COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0 durchgeführt.

Die Ergebnisse für EDTA-Plasma und Serum sind in den Tabellen 1 und 2 dargestellt. Sie belegen, dass mit dem COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0 HCV-RNA in Konzentrationen von 15 IE/ml oder mehr mit einer Trefferquote von ≥ 95 % nachgewiesen wurde. Der Unterschied zwischen Serum und EDTA-Plasma war statistisch nicht signifikant.

Tabelle 1
Nachweisgrenze in EDTA-Plasma, ermittelt mit dem internationalen WHO-Standard für Hepatitis-C-Virus-RNA für auf Nukleinsäure-Amplifikationstechniken basierende Tests

Eingangstitier (IE/ml HCV-RNA)	Anzahl gültiger Replikate	Anzahl positiver Replikate	Trefferquote in %
50	251	251	100
25	251	250	100
15	251	246	98
10	252	236	94
5	252	180	71
2,5	251	121	48
0	250	0	0
LOD gemäß PROBIT bei 95 % Trefferquote	11 IE/ml (95 %-Konfidenzintervall: 10-13 IE/ml)		
LOD gemäß Trefferquote	15 IE/ml		

Tabelle 2
Nachweisgrenze in Serum, ermittelt mit dem internationalen WHO-Standard für Hepatitis-C-Virus-RNA für auf Nukleinsäure-Amplifikationstechniken basierende Tests

Eingangstitier (IE/ml HCV-RNA)	Anzahl gültiger Replikate	Anzahl positiver Replikate	Trefferquote in %
50	188	188	100
25	189	188	99
15	189	185	98
10	189	172	91
5	189	140	74
2,5	189	92	49
0	189	0	0
LOD gemäß PROBIT bei 95 % Trefferquote	12 IE/ml (95 %-Konfidenzintervall: 10-14 IE/ml)		
LOD gemäß Trefferquote	15 IE/ml		

B. Präzision

Zur Bestimmung der Präzision des COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0 wurden Reihenverdünnungen von klinischen HCV-Proben (Genotyp 1a) oder von Armored HCV-RNA (aRNA) in HCV-negativem humanem EDTA-Plasma oder Serum analysiert.

Sechs Verdünnungsstufen wurden in 3 Replikaten pro Stufe in 12 Durchgängen an 4 Tagen getestet. Für jede Probe wurde das gesamte Testverfahren mit dem COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0 einschließlich Probenaufarbeitung, Amplifikation und Detektion durchgeführt. Die Untersuchung wurde mit drei Reagenzchargen des COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0 durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Der COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0 weist bei drei Reagenzchargen in Konzentrationsbereichen von 3,0E+02 IE/ml bis 1,0E+08 IE/ml eine gute Präzision auf.

Tabelle 3
Präzision des COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0
(EDTA-Plasma- und Serumproben)*

Nennkonzentration [IE/ml]	Präzision als Gesamt-SD [\log_{10}]					
	EDTA-Plasma			Serum		
	Charge 1	Charge 2	Charge 3	Charge 1	Charge 2	Charge 3
3,0E+02	0,22	0,07	0,09	0,07	0,05	0,09
3,0E+03	0,15	0,07	0,07	0,06	0,06	0,06
3,0E+04	0,06	0,05	0,07	0,05	0,07	0,08
3,0E+05	0,08	0,07	0,08	0,05	0,05	0,04
3,0E+06	0,14	0,04	0,07	0,11	0,06	0,07
1,0E+08	0,07	0,05	0,11	0,07	0,06	0,08

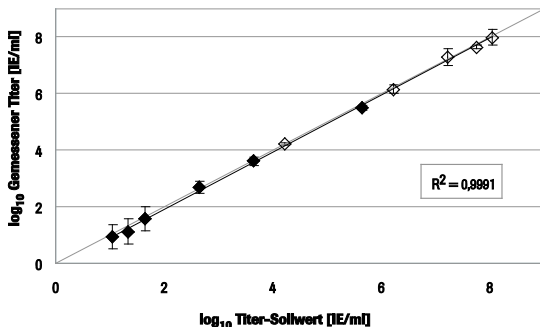
* Titerdaten werden als lognormalverteilt betrachtet und nach der \log_{10} -Transformation analysiert. Die Spalten 2-7 zeigen die Gesamt-Standardabweichung (SD) des \log_{10} -transformierten Titers für jede der drei Reagenzchargen.

C. Linearer Bereich

Die Evaluierung des linearen Bereichs des COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0 wurde mit zwei Linearitätspanels durchgeführt. Diese Panels bestanden aus Verdünnungen einer HCV-RNA-positiven klinischen Probe für den unteren und mittleren Teil des dynamischen Bereichs (bis 3,0E+05 IE/ml) sowie aRNA für den oberen Teil des dynamischen Bereichs (bis 2,0E+08 IE/ml) in EDTA-Plasma oder in Serum. Die Untersuchung wurde mit zwei Reagenzchargen des COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0 gemäß den in CLSI EP6-A²² festgelegten Methoden durchgeführt. Alle 11 Panelproben für EDTA-Plasma sowie alle 14 Panelproben für Serum wurden in bis zu 16 Replikaten pro Konzentrationsstufe, Matrix und Reagenzcharge getestet.

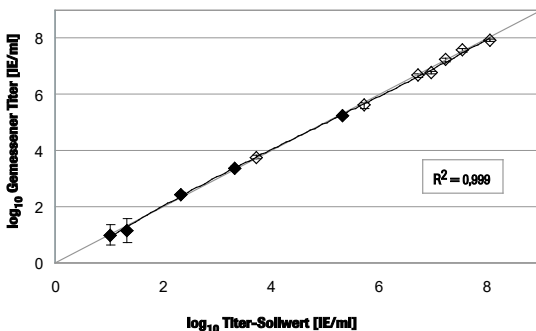
Der COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0 ist linear im Bereich von 15 IE/ml HCV-RNA bis mindestens 1,0E+08 IE/ml HCV-RNA mit einer zulässigen Abweichung von der absoluten Linearität von +/- 0,2 \log_{10} (repräsentative Ergebnisse siehe Abbildungen 1 und 2). Im gesamten linearen Bereich liegt die Genauigkeit des Tests innerhalb von +/- 0,2 \log_{10} .

Abbildung 1
Bestimmung des linearen Bereichs für den COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV
Quantitative Test, v2.0 in EDTA-Plasmaproben



Das Regressionsdiagramm zeigt die Mittelwerte der gemessenen Probenergebnisse für klinische Proben (schwarze Raute) sowie aRNA-Proben (weiße Raute) im Verhältnis zum log₁₀-Titer-Sollwert. Die Regressionslinie (fett; von 11 bis 1,1E+08 IE/ml) ist zur Veranschaulichung des linearen Verhaltens des Tests zusammen mit der Diagonalen (grau) dargestellt. Die Standardabweichungen der log₁₀-Titer sind als Fehlerbalken dargestellt; der R²-Wert ist angegeben.

Abbildung 2
Bestimmung des linearen Bereichs für den COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV
Quantitative Test, v2.0 in Serumproben



Das Regressionsdiagramm zeigt die Mittelwerte der gemessenen Probenergebnisse für klinische Proben (schwarze Raute) sowie aRNA-Proben (weiße Raute) im Verhältnis zum log₁₀-Titer-Sollwert. Die Regressionslinie (schwarz; von 11 bis 1,2E+08 IE/ml) ist zur Veranschaulichung des linearen Verhaltens des Tests zusammen mit der Diagonalen (grau) dargestellt. Die Standardabweichungen der log₁₀-Titer sind als Fehlerbalken dargestellt; der R²-Wert ist angegeben.

D. Genotypen-/Subtypenerfassung

Die Inklusivität von HCV-Genotypen mit dem COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0 wurde durch Überprüfung (i) der Nachweisgrenze für die Genotypen 1 bis 6 und (ii) des linearen Bereichs für die Genotypen 1 bis 6 evaluiert.

Verifizierung der Nachweisgrenze für die Genotypen 1 bis 6

Klinische HCV-RNA-Proben für 8 verschiedene Genotypen/Subtypen (1a, 1b, 2a, 2b, 3, 4, 5 und 6) wurden in EDTA-Plasma oder Serum auf drei verschiedene Konzentrationsstufen verdünnt. Für jede Stufe wurde mit bis zu 70 Replikaten eine Trefferquote ermittelt. Die Untersuchung wurde mit einer Reagenzcharge des COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0 durchgeführt.

Die Ergebnisse für EDTA-Plasma und Serum sind in den Tabellen 4 und 5 dargestellt. Sie belegen, dass mit dem COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0 HCV-RNA für 8 verschiedene Genotypen/Subtypen in Konzentrationen von 15 IE/ml oder mehr mit einer Trefferquote von $\geq 95\%$ nachgewiesen wurde. Der Unterschied zwischen Serum und EDTA-Plasma war statistisch nicht signifikant.

Tabelle 4
Verifizierung der Nachweisgrenze von HCV-RNA-Genotypen in EDTA-Plasma

Genotyp	5 IE/ml			15 IE/ml			45 IE/ml		
	Anzahl gültiger Replikate	Anzahl positiver Replikate	Trefferquote in %	Anzahl gültiger Replikate	Anzahl positiver Replikate	Trefferquote in %	Anzahl gültiger Replikate	Anzahl positiver Replikate	Trefferquote in %
1a	63	44	70	63	63	100	63	63	100
1b	63	47	75	63	62	98	63	63	100
2a	63	43	68	63	61	97	62	61	98
2b	62	57	92	62	62	100	62	62	100
3	62	58	94	63	63	100	62	62	100
4	63	43	68	63	62	98	63	63	100
5	63	47	75	62	62	100	62	62	100
6	63	55	87	63	62	98	63	63	100

Tabelle 5
Verifizierung der Nachweisgrenze von HCV-RNA-Genotypen in Serum

Genotyp	5 IE/ml			15 IE/ml			45 IE/ml		
	Anzahl gültiger Replikate	Anzahl positiver Replikate	Trefferquote in %	Anzahl gültiger Replikate	Anzahl positiver Replikate	Trefferquote in %	Anzahl gültiger Replikate	Anzahl positiver Replikate	Trefferquote in %
1a	63	45	71	62	62	100	63	63	100
1b	62	48	77	63	63	100	63	63	100
2a	63	47	75	61	60	98	63	63	100
2b	63	42	67	63	61	97	63	63	100
3	63	58	92	63	63	100	63	63	100
4	63	41	65	63	62	98	63	63	100
5	62	46	74	61	60	98	62	62	100
6	70	58	83	70	69	99	69	69	100

Verifizierung des linearen Bereichs für die Genotypen 1 bis 6

Klinische HCV-Proben für 8 verschiedene Genotypen/Subtypen (1a, 1b, 2a, 2b, 3, 4, 5 und 6) wurden in bis zu 22 Konzentrationsstufen getestet. Diese Panels bestanden aus Verdünnungen HCV-RNA-positiver klinischer Genotypproben für den unteren und mittleren Teil des dynamischen Bereichs sowie genotypspezifischer aRNA für den oberen Teil des dynamischen Bereichs (Genotypen 1a, 1b, 3 und 4 bis zur oberen Quantifizierungsgrenze) oder für den gesamten dynamischen Bereich (Genotypen 2a, 2b, 5 und 6) in EDTA-Plasma. Die Untersuchung wurde mit einer Reagenzcharge des COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0 durchgeführt. Alle 22 Panelproben wurden in bis zu 15 Replikaten getestet.

Der lineare Bereich des COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0 wurde mit einer zulässigen Abweichung von der absoluten Linearität von +/- 0,2 log₁₀ mit den HCV-Genotypen 1 bis 6 in einem Bereich von 13 IE/ml HCV-RNA bis mindestens 1,4E+08 IE/ml HCV-RNA verifiziert.

E. Diagnostische Sensitivität

Die diagnostische Sensitivität des COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0 wurde durch Analyse einzelner HCV-RNA-positiver EDTA-Plasma- oder Serumproben (insgesamt 488 Ergebnisse) unter Verwendung von zwei Reagenzchargen des COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0 bestimmt. Alle Proben waren HCV-RNA-positiv. Die diagnostische Sensitivität des COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0 in diesem Panel ist 100 % (einseitige untere 95 %-Konfidenzgrenze: ≥ 99,4 %).

F. Spezifität

Die Spezifität des COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0 wurde durch Analyse von HCV-RNA- und seronegativen EDTA-Plasma- oder Serumproben von Blutspendern ermittelt. Die einzelnen EDTA-Plasma- und Serumproben (insgesamt 600 Ergebnisse) wurden mit zwei Reagenzchargen des COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0 getestet. Alle Proben waren HCV-RNA-negativ. Die Spezifität des COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0 in diesem Panel ist 100 % (einseitige untere 95 %-Konfidenzgrenze: ≥ 99,5 %).

G. Analytische Spezifität

Die analytische Spezifität des COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0 wurde durch Verdünnung hochtitriger Stammlösungen unterschiedlicher Krankheitserreger (siehe Tabelle 6) mit HCV-RNA-positiven und HCV-RNA-negativen klinischen EDTA-Plasma- oder Serumproben evaluiert. Keiner der Nicht-HCV-Krankheitserreger beeinträchtigte die Leistung des Tests oder führte zu einem falsch-positiven Ergebnis des COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0.

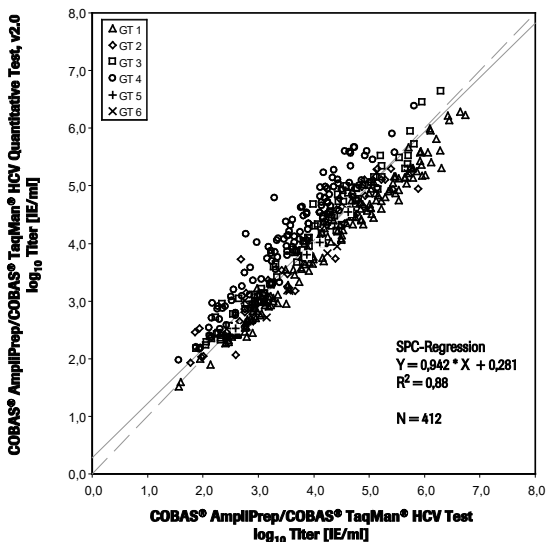
Tabelle 6
Krankheitserreger für die Ermittlung der analytischen Spezifität

Nicht-HCV-Flaviviren West-Nil-Virus St.-Louis-Enzephalitis-Virus Murray-Valley-Enzephalitis-Virus Dengue-Virus Typ 1, 2, 3 und 4 Gelbfiebervirus Zika-Virus FSME-Virus (Stamm HYPR)	Viren Adenovirus Typ 5 Cytomegalievirus Epstein-Barr-Virus Hepatitis-B-Virus Hepatitis-A-Virus HIV-1 Humanes T-Zell-lymphotropes Virus Typ 1 und 2 Humanes Herpesvirus Typ 6 Herpes-Simplex-Virus Typ 1 und 2 Influenza A Humanes Papillomavirus Varicella-Zoster-Virus
Bakterien <i>Propionibacterium acnes</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	
Hefen <i>Candida albicans</i>	

H. Leistung im Vergleich zum COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Test

Zum Vergleich der Leistungsmerkmale des COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0 und des COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Test wurden Serum- und EDTA-Plasmaproben von HCV-infizierten Patienten (verdünnt und unverdünnt) analysiert. Die Ergebnisse von insgesamt 412 in Doppelbestimmung analysierten EDTA-Plasma- und Serumproben aller Genotypen waren gültig und lagen bei beiden Tests innerhalb des Quantifizierungsbereichs. Eine Deming-Regressionsanalyse sowie eine Bland-Altman-Analyse wurden durchgeführt. Die Ergebnisse der Deming-Regressionsanalyse sind in Abbildung 3 dargestellt.

Abbildung 3
Korrelation des COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0
und des COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Test
(GT = Genotyp)

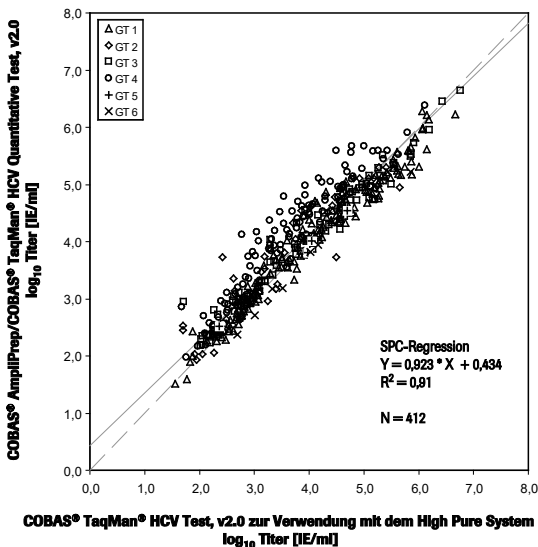


Die Deming-Regressionsanalyse wurde durchgeführt. Der R-Quadrat-Wert betrug 0,88 für alle Proben und 0,94 bei Ausschluss der Proben für Genotyp 4 aus der Analyse. Nach der Bland-Altman-Analyse zeigte die Korrelation eine mittlere \log_{10} -Titerdifferenz von 0,1 (Analyse aller Proben) bzw. -0,1 (Ausschluss der Proben für Genotyp 4).

I. Leistung im Vergleich zum COBAS® TaqMan® HCV Test v2.0 zur Verwendung mit dem High Pure System

Zum Vergleich der Leistungsmerkmale des COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0 und des COBAS® TaqMan® HCV Test, v2.0 zur Verwendung mit dem High Pure System wurden Serum- und EDTA-Plasmaproben von HCV-infizierten Patienten analysiert. Die Ergebnisse von insgesamt 412 in Doppelbestimmung analysierten EDTA-Plasma- und Serumproben aller Genotypen waren gültig und lagen bei beiden Tests innerhalb des Quantifizierungsbereichs. Eine Deming-Regressionsanalyse sowie eine Bland-Altman-Analyse wurden durchgeführt. Die Ergebnisse der Deming-Regressionsanalyse sind in Abbildung 4 dargestellt.

Abbildung 4
Korrelation des COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0
und des COBAS® TaqMan® HCV Test, v2.0 zur Verwendung mit dem High Pure System
(GT = Genotyp)



Die Deming-Regressionsanalyse wurde durchgeführt; der R-Quadrat-Wert betrug 0,91. Nach der Bland-Altman-Analyse zeigte die Korrelation eine mittlere \log_{10} -Titerdifferenz von 0,1.

LITERATUR

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, Banea L. 2006. Acute hepatitis C virus infection: Diagnosis pathogenesis, treatment. *JGLD* **15**:249-256.
6. Mc Hutchison JG, Gordon SC, Schiff ER et al. 1998. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. *N Engl J Med* **339**:1485-1492.
7. Davis GL, Esteban-Mur R, Rustgi V et al. 1998. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin for the treatment of relapse of chronic hepatitis C. *N Engl J Med* **339**:1493-1499.
8. Manns MP, McHutchinson JG, Gordon SC et al. 2001. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomized trial. *Lancet* **358**:958-965.
9. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR et al. 2002. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* **347**:975-982.
10. Hadziyannis SJ, Sette H Jr., Morgan TR et al. 2004. Peginterferon-[alpha] 2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med* **140**:346-355.
11. Ghany MG, Strader DB, Thomas DL et al. 2009. Diagnosis management and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology* **49**:1335-1374.
12. NIH Consensus and State-of-the-Science Statements. Management of Hepatitis C. 2002. **19**:1-46.
13. EASL International Consensus Conference on Hepatitis C. Consensus Statement. 1999. *Hepatology* **30**:956-961.
14. Jensen DM, Morgan TR, Marcellin P et al. 2006. Early identification of HCV genotype 1 patients responding to 24 weeks peginterferon alpha-2a (40 kd)/ribavirin therapy. *Hepatology* **43**:954-960.
15. Poordad F, McCone J Jr., Bacon BR et al. 2011. Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* **364**:1195-1206.
16. Jacobson IM, McHutchinson JG, Dusheiko G et al. 2011. Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* **364**:2405-2416.
17. Bukh J, Purcell RH and Miller RH. 1992. Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**:4942-4946.
18. Longo MC, Berninger MS and Hartley JL. 1990. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* **93**:125-128.
19. U.S. Department of Health and Human Services. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 5th Edition, HHS Publication No. (CDC) 21-1112; December 2009.
20. Clinical and Laboratory Standards Institute. Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections: Approved Guideline - 3rd Edition. CLSI Document M29-A3. CLSI: Wayne, PA 2005.

21. International Air Transport Association. Dangerous Goods Regulations, 49th Edition. 2008.
22. Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline. CLSI Document EP6-A. CLSI: Wayne, PA 2002.
23. Saldanha, J., Heath, A., Aberham, C., Albrech, J., Gentili, G., Gessner, M. and Pisani, G.2005. World Health Organization collaborative study to establish a replacement WHO international standard for hepatitis C virus RNA nucleic acid amplification technology assays. *Vox Sanguinis* **88**:202-204.
24. Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., and Griffith, R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Bio-Technology* **10**:413-417.
25. Heid, C.A., Stevens, J., Livak, J.K., and Williams, P.M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Research* **6**:986-994.

Dokumentversionsübersicht

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

Die Nummer der benannten Stelle unter dem CE Zeichen wurde aktualisiert.
Bei Fragen wenden Sie sich bitte an Ihre Roche-Vertretung vor Ort.



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



Distributed by

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

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, Germany

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

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

Roche Diagnostics
2, Avenue du Vercors
38240 Meylan, France

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

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

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

Marken und Patente

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

©2019 Roche Molecular Systems, Inc.

02/2019

Doc Rev. 3.0 (Mfg-US)

07941692001-03



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116
68305 Mannheim
Germany



Die folgenden Symbole werden jetzt bei der Kennzeichnung von Roche PCR-Diagnostikprodukten verwendet.



Zusatz-Software



In-vitro-Diagnostikum



Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft



Unterer Grenzwert des Sollbereichs



Barcode-Datenblatt



Hersteller



Chargenbezeichnung



Im Dunkeln aufbewahren



Biogefährdung



Ausreichend für $\langle n \rangle$ Tests



Bestellnummer



Temperaturbegrenzung



Gebrauchsanweisung beachten



Testdefinitionsdatei



Inhalt der Packung



Oberer Grenzwert des Sollbereichs



Vertrieb



Verwendbar bis



Nur zur Beurteilung der IVD-Leistung



Globale Artikelnummer GTIN



Dieses Produkt erfüllt die Anforderungen der Europäischen Richtlinie 98/79/EG für *in-vitro*-diagnostische medizinische Geräte.