

Ianuarie 2019

Manualul *artus*[®] HCV QS-RGQ Kit



72

Versiunea 2

Destinat utilizării cu
instrumentele QIASymphony[®] SP/AS și
Rotor-Gene[®] Q

IVD

CE⁰¹⁹⁷

REF

4538366



QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1
40724 Hilden
GERMANIA

R2 MAT

1115368

Cuprins

Domeniul de utilizare	5
Rezumatul și explicarea produsului	5
Informații despre agenții patogeni	6
Context	6
Definirea afecțiunii clinice	6
Strategii terapeutice curente	7
Materiale furnizate	9
Conținutul kitului	9
Materiale necesare, dar nefurnizate	10
Prepararea probelor	10
Adaptoare pentru QIASymphony SP	10
Reactivi și consumabile pentru QIASymphony SP	10
Adaptoare pentru QIASymphony AS	11
Reactivi și consumabile pentru QIASymphony AS	11
Echipamente	12
Substanțe de control externe de proces complet	12
Avertizări și precauții	13
Avertizări	14
Precauții generale	15
Depozitarea și manipularea reactivilor	16
Procedură	16
Colectarea speciemenelor	16
Transportul și depozitarea speciemenelor	17
Prepararea speciemenelor	17

Detecția ARN-ului specific HCV	18
Procedură.....	19
Prepararea ARN-ului de transport și adăugarea substanței de control interne în probe.....	19
Introducere în instrumentele QIASymphony SP/AS.....	20
Purificarea ARN-ului viral	21
Seturi de control al dozării și seturi de parametri ai testului	21
Protocol: Izolarea ARN-ului și configurarea testului pe QIASymphony SP/AS.....	22
Elemente importante înainte de începere.....	22
Operațiuni care trebuie executate înainte de începere.....	23
Configurarea QIASymphony SP	24
Procedură de utilizare a QIASymphony SP/AS	25
Purificarea ARN-ului viral cu QIASymphony SP.....	25
Configurarea QIASymphony AS	27
Consumabile.....	27
Adaptoare și suporturi de reactivi	28
Vârfuri cu filtru	28
Încărcarea sertarelor QIASymphony AS pentru configurarea testelor.....	29
Protocol: RT-PCR pe instrumentul Rotor-Gene Q.....	32
Elemente importante înainte de începere.....	32
Procedura de utilizare a instrumentului Rotor-Gene Q.....	32
Setări ale analizei	35
Criterii de validitate a testărilor și a probelor	36
Rezultatele substanței de control de proces complet.....	37
Cuantificare	38

Interpretarea rezultatelor	39
Caracteristici de performanță	40
Limită de blanc și specificitate	40
Limita de detecție (Limit of detection, LOD)	41
Limita de detecție pentru virusul hepatitei C genotipurile de la 2 la 6.....	42
Interval liniar și limită de cuantificare.....	43
Precizie, repetabilitate și variabilitate de la un lot la altul.....	45
Reproductibilitate	47
Reactivitate încrucișată și infecții mixte	48
Substanțe de interferență	52
Contaminare încrucișată	56
Performanță clinică.....	57
Limitări.....	60
Controlul calității	60
Referințe	61
Simboluri	62
Ghid de remediere a problemelor	64
Informații pentru comandă.....	69

Domeniul de utilizare

Testul *artus* HCV QS-RGQ este un test de amplificare a acidului nucleic in vitro bazat pe tehnologia revers-transcriere-reație de polimerizare în lanț (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) pentru utilizare cu instrumentele QS-RGQ pentru detecția cantitativă a virusului Hepatitei C (Hepatitis C virus, HCV) ARN (genotipuri 1-6) în plasmă tratată cu EDTA la indivizi infectați cu HCV.

Testul *artus* HCV QS-RGQ este destinat utilizării împreună cu simptomele clinice și cu alți markeri de laborator, pentru prognosticul bolii și ca ajutor în evaluarea răspunsului viral la tratamentul antiviral, măsurat prin modificările nivelurilor de HCV ARN în plasma umană tratată cu EDTA la nivelul de referință, în timpul tratamentului și la finalul tratamentului. Testul *artus* HCV QS-RGQ nu este destinat screeningului sanguin, de plasmă sau de ser pentru infecția cu HCV. Testul nu trebuie utilizat ca testare de diagnosticare pentru a confirma prezența infecției cu HCV.

Rezumatul și explicarea produsului

artus HCV QS-RGQ Kit constituie un sistem gata de utilizare pentru detecția HCV ARN utilizând PCR pe instrumentele Rotor-Gene Q, pentru prepararea probelor și configurarea testului utilizându-se instrumentele QIA Symphony SP/AS. Virusul hepatitei C RG Master A și B conține reactivi și enzime pentru amplificarea specifică a unei regiuni de 69 de perechi de nucleotide din genomul HCV și pentru detecția directă a ampliconului specific în canalul de fluorescență Cycling Green al instrumentului Rotor-Gene Q.

În plus, *artus* HCV QS-RGQ Kit conține un al doilea sistem de amplificare heterologă pentru identificarea unei posibile inhibări PCR. Aceasta este detectată ca o substanță de control internă (internal control, IC) în canalul de fluorescență Cycling Orange al instrumentului Rotor-Gene Q. Limita de detecție a HCV PCR analitic nu este redusă. Sunt furnizate

substanțele de control externe pozitive (Virusul hepatitei C RG QS 1–4), permițând determinarea cantității de ARN viral.

Informații despre agenții patogeni

Context

HCV este un virus ARN din familia Flaviviride. Înconjurat de o structură de tip anvelopă și cu codificare pentru numai 10 proteine mature, HCV este responsabil pentru patologii grave, care variază de la inflamarea ficatului (hepatită) și ciroză la carcinomul hepatocelular (hepatocellular carcinoma, HCC), care este fatal, în mod invariabil. În toată lumea există peste 200 de milioane de purtători de HCV, patru milioane dintre aceștia aflându-se în Europa. Infecția cu HCV este una dintre cauzele principale ale afecțiunii hepatice cronice din lume, cei mai mulți indivizi neștiind că au această infecție. HCV este clasificat în șase genotipuri principale (1-6), genotipul 1 (subtipurile a și b) fiind cel mai întâlnit subtip în America de Nord și în Europa de Vest (1). Între fiecare genotip există o omologie nucleotidică de numai 55 până la 70%, fiind identificate peste 80 de subtipuri. Determinarea genotipului este recomandată pentru gestionarea clinică adecvată și pentru estimarea probabilității de răspuns la tratament (2).

Definirea afecțiunii clinice

Infecția acută cu HCV rămâne complet asimptomatică în marea majoritate a cazurilor. Perioada de incubație a HCV variază între 6 și 10 săptămâni, iar debutul bolii poate avea simptome nespecifice, incluzând anorexie, disconfort abdominal vag, greață și vărsături, febră și oboseală. În cazuri mai rare, aceste simptome inițiale pot include gălbinare (icter). Doar un procent mic (10-30%) de indivizi infectați acut va elimina virusul. În majoritatea cazurilor, HCV stabilește infecția de-a lungul vieții și pacientul devine un purtător cronic.

Infecția cronică cu HCV este definită ca o continuare a bolii fără îmbunătățire pentru o perioadă mai mare de 6 luni și se dezvoltă în aproximativ două treimi dintre indivizii infectați. În alte 10-20%, infecția cronică cu HCV duce la ciroză și, ulterior, la insuficiență hepatică, cu rate de mortalitate de până la 25%. Doar 1-5% dintre purtătorii HCV dezvoltă HCC și acesta tinde să fie rar în cazurile non-ciroțice. Foarte important, infecția cu HCV poate rămâne asimptomatică timp de până la 20 de ani înainte de apariția complicațiilor grave.

Deși mecanismele care stau la baza progresiei bolii nu sunt în întregime înțelese, s-au raportat mai mulți factori care influențează rata progresiei bolii HCV. Aceștia includ vârsta (creșterea vârstei asociată cu progresia mai rapidă), sexul (bărbații au o progresie mai rapidă a bolii), consumul de alcool (asociat cu o rată crescută de progresie a bolii) și prezența grăsimii în celulele hepatice. În plus, s-a documentat foarte bine faptul că o co-infecție cu virusul hepatitei B (hepatitis B virus, HBV) și virusul imunodeficienței umane-1 (human immunodeficiency virus-1, HIV-1) crește semnificativ rata progresiei bolii (3).

Strategii terapeutice curente

Obiectivul tratamentului este eradicarea HCV la indivizii infectați cronic, conducând la un răspuns virologic susținut (Sustained Virological Response, SVR), care este similar unui tratament. Un SVR este definit ca HCV ARN nedetectabil timp de 12 săptămâni (SVR12) sau 24 de săptămâni (SVR24) după terminarea tratamentului, măsurat printr-un test sensibil de ARN (cu o limită de detecție [limit of detection, LOD] ≤ 15 UI/ml). Dacă aceasta este atinsă, infecția cu HCV se vindecă la mai mult de 99% dintre pacienți. SVR este, în general, asociat cu rezolvarea afecțiunii hepatice la pacienții fără ciroză. Pacienții cu ciroză rămân expuși la riscul de complicații care pun în pericol viața; cu toate acestea, fibroza hepatică poate regresa și riscul de complicații, cum ar fi insuficiența hepatică și hipertensiunea portală, este redus.

Până în 2011, combinația de interferon alfa pegilat (pegylated interferon alpha, PegIFN- α) și ribavirină timp de 24 sau 48 de săptămâni a fost tratamentul aprobat pentru HCV cronic. Cu acest regim, pacienții infectați cu HCV genotip 1 au avut rate SVR de aproximativ 40%

în America de Nord și 50% în Europa de Vest. Aproximativ 75% până la 85% dintre persoanele cu genotipul 2 sau 3 au prezentat un SVR după 6 luni de la terminarea unui ciclu de tratament, în timp ce pentru celelalte genotipuri (4, 5 și 6) proporția a fost cuprinsă între 50% și 75% (2).

În 2011, inhibitorii de protează telaprevir (TEL) și boceprevir (BOC) au fost autorizați pentru tratamentul infecțiilor cu HCV genotip 1. Acestea au fost primele antivirale cu acțiune directă (direct-acting antivirals, DAA) active împotriva HCV și au vizat HCV NS3-4A serin-protează. Atât TEL, cât și BOC, au fost administrate împreună cu PegIFN-a și ribavirină. Pacienții netratați anterior cu genotipul 1, tratați cu regimuri terapeutice triple, au obținut rate de SVR mai mari decât terapia dublă cu PegIFN-a și ribavirină (4).

De atunci, în UE și SUA (printre alte regiuni) au fost autorizate mai multe DAA pan-genotipice mai eficiente, cu mai puține efecte secundare, pentru utilizare ca parte a terapiilor combinate pentru infecția cu HCV. În prezent, pentru prima dată sunt disponibile combinații fără IFN, în timp ce ribavirina este păstrată pentru anumite combinații de tratament. Profilurile efectelor secundare ale terapiilor triple combinate BOC și TEL și costurile per SVR înseamnă că, în mod ideal, acestea nu ar trebui să mai fie utilizate la pacienții infectați cu HCV genotip 1 în țările cu venituri mari. Trebuie remarcat faptul că multe țări cu venituri medii au primit doar recent aprobarea pentru utilizarea TEL și BOC, dar aceste tratamente sunt în prezent eliminate în țările cu venituri mari în favoarea DAA de a doua generație (2).

Materiale furnizate

Conținutul kitului

artus HCV QS-RGQ Kit			(72)
Număr catalog			4538366
Număr de reacții			72
Albastră	Hepatitis C Virus Master A (Virusul hepatitei C Master A)	MASTER	3 x 820 µl
Violet	Hepatitis C Virus Master B (Virusul hepatitei C Master B)	MASTER	3 x 200 µl
Roșu	Hepatitis C Virus RG QS 1 (10 ⁴ IU/µl) (Virusul hepatitei C RG QS 1 (10 ⁴ UI/µl))		200 µl
Roșu	Hepatitis C Virus RG QS 2 (10 ³ IU/µl) (Virusul hepatitei C RG QS 2 (10 ³ UI/µl))		200 µl
Roșu	Hepatitis C Virus RG QS 3 (10 ² IU/µl) (Virusul hepatitei C RG QS 3 (10 ² UI/µl))		200 µl
Roșu	Hepatitis C Virus RG QS 4 (10 ¹ IU/µl) (Virusul hepatitei C RG QS 4 (10 ¹ UI/µl))		200 µl
Verde	Hepatitis C Virus RG Internal Control (Virusul hepatitei C RG Substanță de control internă)	IC	2 x 1000 µl
Alb	Water (PCR grade) (Apă (clasa PCR))		1900 µl
	Handbook (Manual)		1

QS (quantification standard): standard de cuantificare.

Volumele reactivilor au fost optimizate pentru loturi de 24 de probe, inclusiv standardele de cuantificare (QS 1 până la 4) și o substanță de control fără șablon (no template control, NTC).

Pot fi testate mai puține sau mai multe probe, dar va exista o utilizare sub-optimală a amestecului master mix din cauza necesității de a include un volum mort, care este necesar pentru QIASymphony SP/AS.

Materiale necesare, dar nefurnizate

Înainte de utilizare, asigurați-vă că instrumentele au fost verificate și calibrate în conformitate cu recomandările producătorului. Acest kit necesită utilizarea instrumentelor QIASymphony SP/AS și Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM* cu software adecvat (pentru mai multe detalii, a se vedea mai jos).

Prepararea probelor

- QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit (nr. cat. 937055)

Adaptoare pentru QIASymphony SP

- Elution Microtube Rack QS (Stativ pentru microeprubete de eluție QS) (Cooling Adapter, EMT, v2, Qsym (Adaptor de răcire, EMT, v2, Qsym), nr. cat. 9020730)
- Tube Insert 3B (Element de inserție 3B al eprubetei) (Insert, 2.0ml v2, samplecarr. (Element de inserție, 2,0 ml v2, samplecarr.) (24), Qsym, nr. cat. 9242083)

Reactivi și consumabile pentru QIASymphony SP

- Sample Prep Cartridges, 8-well (Cartușe pentru prepararea probelor, cu 8 godeuri) (nr. cat. 997002)
- 8-Rod Covers (Învelișuri pentru 8 tije) (nr. cat. 997004)
- Filter-Tips, 1500 µl (Vârfuri cu filtru, 1500 µl) (nr. cat. 997024)
- Filter-Tips, 200 µl (Vârfuri cu filtru, 200 µl) (nr. cat. 990332)

* Dacă este cazul, instrumentele Rotor-Gene Q 5plex HRM cu o dată de producție în ianuarie 2010 sau mai târziu pot fi utilizate ca o alternativă la instrumentele Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Data de producție poate fi obținută din numărul de serie de pe spatele instrumentului. Numărul de serie este în formatul „Jlaannn”, unde „Jl” indică luna de producție în cifre, „aa” indică ultimele două cifre ale anului de producție și „nnn” indică identificatorul unic al instrumentului.

- Elution Microtubes CL (Microeprubete de eluție CL) (nr. cat. 19588)
- Tip disposal bags (Pungi pentru aruncarea vârfurilor) (nr. cat. 9013395)
- Microtubes 2.0 ml Type H or microtubes 2.0 ml Type I (Microeprubete 2,0 ml Tip H sau microeprubete 2,0 ml Tip I) (Sarstedt®, nr. cat. 72.693 și 72.694, www.sarstedt.com) pentru utilizare cu probe și substanțe de control interne
- BD tubes 14 ml, 17 x 100 mm polystyrene round-bottom (Eprubete BD 14 ml, 17 x 100 mm din polistiren, cu fund rotund) (Becton Dickinson, nr. cat. 352051) pentru pregătirea substanței de control interne

Adaptoare pentru QIASymphony AS

- Reagent holder 1 QS (Suport pentru reactivi 1 QS) (Cooling Adapter, Reagent Holder 1, Qsym (Adaptor de răcire, Suport pentru reactivi 1, Qsym), nr. cat. 9018090)
- RG Strip Tubes 72 QS (Eprubete-bandă RG 72 QS) (Cooling Adapter, RG Strip Tubes 72, Qsym (Adaptor de răcire, Eprubete-bandă RG 72, Qsym), nr. cat. 9018092)

Reactivi și consumabile pentru QIASymphony AS

- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (Eprubete-bandă și capace, 0,1 ml (nr. cat. 981103)
- Tubes, conical, 2 ml, Qsym AS (Eprubete, conice, 2 ml, Qsym AS) (nr. cat. 997102) sau Microtubes 2.0 ml Type I (Microeprubete 2,0 ml Tip I) (Sarstedt, nr. cat. 72.694.005)
- Tube, conical, 5 ml, Qsym AS (Eprubetă, conică, 5 ml, Qsym AS) (nr. cat. 997104) sau Tubes with flat base from PP (Eprubete cu bază plată din PP) (Sarstedt, nr. cat. 60.558.001)
- Reagent Bottles, 30 ml, Qsym AS (Flacoane de reactiv, 30 ml, Qsym AS) (nr. cat. 997108)
- Elution Microtubes CL (Microeprubete de eluție CL) (nr. cat. 19588)

- Filter-Tips, 1500 µl (Vârfuri cu filtru, 1500 µl) (nr. cat. 997024)
- Filter-Tips, 200 µl (Vârfuri cu filtru, 200 µl) (nr. cat. 990332)
- Filter-Tips, 50 µl (Vârfuri cu filtru, 1500 µl) (nr. cat. 997120)
- Tip disposal bags (Pungi pentru aruncarea vârfurilor) (nr. cat. 9013395)

Echipamente

- Pipete (reglabile)* și vârfuri de pipete sterile cu filtre
- Agitator vortex*
- Centrifugă de banc* cu rotor pentru eprubete de reacție de 2 ml, capabile să fie centrifugate la 6800 x g
- Rotor-gene Q MDx 5plex HRM * † (nr. cat. 9002032) și software Rotor-Gene Q versiunea 2.3 sau mai recentă
- QIASymphony SP instrument (Instrumentul QIASymphony SP) (nr. cat. 9001297)* și QIASymphony AS instrument (instrumentul QIASymphony AS) (nr. cat. 9001301)* și software QIASymphony versiunea 4.0.3 sau mai recentă]

Substanțe de control externe de proces complet

Substanțele de control externe de proces complet (full process controls, FPC) nu sunt necesare pentru efectuarea testului *artus* HCV QS-RGQ; cu toate acestea, substanțele de control pozitive și negative trebuie să fie testate în mod obișnuit în fiecare laborator, în conformitate cu instrucțiunile sau cerințele regulamentelor locale, statale și/sau federale sau ale organizațiilor de acreditare.

* Asigurați-vă că instrumentele au fost verificate și calibrate în conformitate cu recomandările producătorului.

† Dacă este cazul, instrumentul Rotor-Gene Q 5plex HRM cu o dată de producție din ianuarie 2010 sau mai târziu. Data de producție poate fi obținută din numărul de serie de pe spatele instrumentului. Numărul de serie este în formatul „llaan”, unde „ll” indică luna de producție în cifre, „aa” indică ultimele două cifre ale anului de producție și „nnn” indică identificatorul unic al instrumentului. ‡ Asociația Internațională de Transport Aerian. Regulamentele privind transportul mărfurilor periculoase.

O substanță de control de proces complet puternic pozitivă (high positive full process control, H-FPC) și o substanță de control de proces complet slab pozitivă (low positive full process control, L-FPC) sunt destinate monitorizării întregului proces. O substanță de control de proces complet negativă (negative full process control, N-FPC) detectează reactivul sau contaminarea mediului cu HCV.

Se recomandă să se testeze substanțele de control de proces negative și pozitive pentru HCV în fiecare testare PCR. Substanțele de control de proces trebuie tratate ca probe și supuse aceleiași proceduri de izolare a ARN-ului. Probele caracterizate anterior pot fi utilizate în acest scop.

Avertizări și precauții

A se utiliza pentru diagnosticarea in vitro.

Citiți cu atenție toate instrucțiunile înainte de a utiliza testul.

Pentru informații suplimentare, vă rugăm să consultați fișele cu date de securitate (safety data sheets, SDS) corespunzătoare. Acestea sunt disponibile online într-un format PDF ușor de utilizat și compact, la adresa www.qiagen.com/safety, unde puteți găsi, vizualiza și tipări fișa cu date de securitate a fiecărui kit și componente a kitului QIAGEN.

Pentru informații de siguranță pentru kitul de purificare utilizat, consultați manualul relevant al kitului. Pentru informații de siguranță referitoare la instrumente, consultați manualul de utilizare al instrumentului relevant.

Avertizări

- Atunci când lucrați cu substanțe chimice, purtați întotdeauna un halat de laborator, mănuși de unică folosință și ochelari de protecție adecvate.
- Utilizarea acestui produs este limitată la personalul special instruit și calificat în tehnicile RT-PCR și în procedurile de diagnosticare in vitro.
- Specimenele trebuie tratate întotdeauna ca fiind infecțioase și/sau periculoase din punct de vedere biologic, în conformitate cu procedurile de laborator sigure.
- Purtați mănuși de protecție de unică folosință fără pulbere, un halat de laborator și ochelari de protecție atunci când manipulați specimene sau componente ale kitului.
- Se recomandă utilizarea unor zone de lucru separate și izolate pentru prepararea specimenelor, configurarea reacțiilor și activitățile de amplificare/detecție, pe baza unui concept de 2 camere care separă prepararea probelor și configurarea testului de amplificare. Fluxul de lucru în laborator trebuie să se desfășoare într-o manieră unidirecțională. Purtați întotdeauna mănuși de unică folosință în fiecare zonă și schimbați-le înainte de a intra în diferite zone.
- Folosiți consumabile și echipamente dedicate pentru fiecare zonă de lucru în parte și nu le mutați dintr-o zonă în alta.
- Evitați contaminarea microbiană și nucleazică (DNază/RNază) a specimenului și a componentelor kitului.
- Utilizați întotdeauna vârfuri de pipete de unică folosință care nu conțin DNază/RNază, cu bariere de aerosoli.
- Depozitați materialele pozitive și/sau potențial pozitive separat de toate celelalte componente ale kitului.
- Nu deschideți eprubetele de reacție după amplificare pentru a evita contaminarea cu ampliconi.
- Nu amestecați componente din kituri cu numere de lot diferite.
- Nu utilizați componentele kitului care au depășit data de expirare.

- Aruncați deșeurile de probe și de test în conformitate cu reglementările locale de siguranță.

Precauții generale

Acordați întotdeauna atenție următoarelor aspecte:

- În timpul etapelor manuale, țineți eprubetele închise când este posibil și evitați contaminarea.
- Decongețați cu atenție toate componentele la temperatura camerei (15-25 °C) înainte de a începe un test.
- După decongelare, amestecați componentele prin pipetare verticală în mod repetat sau prin vortexare prin impuls, apoi centrifugați pentru scurt timp.

Rețineți: Asigurați-vă că nu există spumă sau bule în eprubetele de reactiv.

- Asigurați-vă că adaptoarele necesare sunt răcite în prealabil la 2-8 °C.
- Lucrați repede și păstrați reactivii PCR pe gheață sau în blocul de răcire înainte de încărcare.
- Procedați în mod continuu, de la o parte a fluxului de lucru la următoarea. Nu depășiți durata de transfer de 30 de minute între module (QIASymphony SP/AS la instrumentul Rotor-Gene Q).

Depozitarea și manipularea reactivilor

Componentele *artus* HCV QS-RGQ Kit trebuie depozitate la -15 până la -30 °C. Master A și Master B pot fi reutilizate, dar nu trebuie să depășească maximum două cicluri de congelare-decongelare. Volumele eprubetelor au fost optimizate pentru loturi de 24 de reacții.

QS 1-4 și IC au fost verificate pentru a rămâne stabile pentru până la șase cicluri de congelare/decongelare.

Reactivii au fost verificați pentru a fi stabili pe instrumentul QIASymphony SP/AS pe durata preparării probelor la testarea numărului maxim de probe într-o singură testare (testare pe 3 purtători).

Procedură

Colectarea specimenelor

1. Sângele trebuie tras în eprubete standard de colectare a specimenului, care conțin EDTA.
2. Eprubeta trebuie amestecată inversând-o de 8 ori fără agitarea probei înainte de centrifugare, pentru a separa plasma.

Important: Probele umane heparinizate nu trebuie utilizate deoarece heparina poate fi un agent de interferență în acest test. Aici sunt incluse probele care au fost colectate în eprubete care conțin heparină, precum și probe provenite de la pacienți care sunt tratați cu heparină.

Transportul și depozitarea specimenelor

Transportați speciunile în termen de 24 de ore de la colectare, într-un recipient de transport rezistent la rupere, la o temperatură de 2-8 °C, conform instrucțiunilor legale privind transportul materialului patogen.*

Stabilitatea probelor de sânge integral (înainte de centrifugare) a fost verificată pentru următoarele condiții de depozitare:

- Temperatura camerei (15-25 °C) timp de până la 24 de ore

Stabilitatea probelor de plasmă EDTA (după centrifugare) a fost verificată pentru următoarele condiții de depozitare (inclusiv timpul necesar pentru transport):

- Temperatura camerei (15-25 °C) timp de până la 24 de ore
- 2-8 °C timp de până la 3 zile
- De la -15 până la -30 °C (sau mai rece) timp de până la 6 săptămâni, inclusiv până la 3 cicluri de congelare/decongelare

Prepararea specimenelor

1. Introduceți 1200 µl de plasmă EDTA într-o Sarstedt 2.0 ml Microtube Type H, without skirted base (microeprubetă Sarstedt de 2,0 ml Tip H, fără bază cu guler) (nr. cat. 72.693) sau Sarstedt Microtube 2.0 ml Type I, with skirted base (microeprubetă Sarstedt de 2,0 ml Tip I, cu bază cu guler) (nr. cat. 72.694)
2. Încărcați pe QIASymphony SP/AS, având grijă să evitați generarea spumei.

* Asociația Internațională de Transport Aerian. Regulamentele privind transportul mărfurilor periculoase.

Detecția ARN-ului specific HCV

Tabel 1. Informații generale despre *artus* HCV QS-RGQ Kit

Kit	<i>artus</i> HCV QS-RGQ Kit (nr. cat. 4538366)
Material de probă	Plasmă EDTA
Purificare inițială	QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit (nr. cat. 937055)
Volumul probei (inclusiv volum în exces)	1200 µl
Set de parametri ai testului	170221_APS_HCV_v2_plasma1000_V2
Set implicit de control al dozării	ACS_Cellfree1000_V7_DSP_artus_HCV_v2
Volum de eluție	90 µl
Volumul substanței de control interne (Internal Control, IC) pe probă	9 µl
Versiune software QIASymphony	Versiunea 4.0.3 sau mai recentă
Volum amestec master mix	25 µl
Volumul șablon	25 µl
Număr de reacții	24-72' (inclusiv toate substanțele de control care trebuie încărcate pe QIASymphony SP și QIASymphony AS, ceea ce corespunde la 19-67 de probe clinice)
Timp de testare pe QIASymphony SP/AS	Pentru 48 de reacții: aproximativ 205 minute
Timp de testare a instrumentului Rotor-Gene Q	Aproximativ 105 minute

* Asigurați-vă că nu este depășită limita de 72 de reacții și 1 adaptor de stative pentru teste. Evitați prelungirea timpului de incubare (> 30 de minute) între finalizarea configurării testului și transferul la instrumentul Rotor-Gene Q.

Procedură

Prepararea ARN-ului de transport și adăugarea substanței de control interne în probe

Utilizarea QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit împreună cu *artus* HCV QS-RGQ Kit necesită introducerea substanței de control interne (Virusul hep. C RG IC) în procedura de purificare pentru a monitoriza eficiența preparării probelor și a testului în aval.

Substanța de control internă (Virusul hep. C RG IC), furnizată împreună cu *artus* HCV QS-RGQ Kit, trebuie adăugată în amestecul ARN de transport (CARRIER) – Soluție tampon AVE (AVE). Volumul total al amestecului substanță de control internă-ARN de transport (CARRIER)-Soluție tampon AVE (AVE) rămâne de 120 μ l pe probă.

Din Tabel 2 rezultă amestecul de reacție pentru substanța de control internă pentru probă la un raport de 0,1 μ l la 1 μ l de eluție în volum. Se recomandă să preparați amestecuri proaspete pentru fiecare ciclu de funcționare, chiar înainte de utilizare.

Tabel 2. Pregătirea ARN-ului de transport și a substanței de control interne (Virusul hep. C RG Substanță de control internă)

Componentă	Reacții	
	Volum (μl) pentru n ≤ 13 în eprubetele Sarstedt*	Volum (μl) pentru n > 13 în eprubetele Corning®†
ARN de transport (CARRIER) standard	5	5
Substanța de control internă (Virusul hep. C RG Substanță de control internă)	9	9
Soluție tampon AVE	106	106
Volum final pe probă (fără volumul mort)	120	120
Volum total pentru n probe	(n × 120) + 360	(n × 120) + 600

* Microtubes 2.0 ml Type H (Microeprubete 2,0 ml Tip H) și Microtubes 2.0 ml Type I (Microeprubete 2,0 ml Tip I) (Sarstedt, nr. cat. 72.693 și 72.694). Este necesar un amestec de substanță de control internă, corespunzător a 3 probe suplimentare (adică 360 μl). Nu umpleți un volum total mai mare de 1,92 ml (corespunzând unui număr maxim de 13 probe). Opțional, dacă se utilizează mai mult de 13 reacții, introduceți amestecul de substanță de control internă într-o eprubetă mai mare și încărcăți-l în mai multe microeprubete de 2,0 ml. Asigurați-vă că pentru fiecare eprubetă este adăugat volumul în exces necesar pentru 3 reacții suplimentare.

† Dacă se configurează mai mult de 13 reacții, preparați amestecul de IC într-o eprubetă mai mare (17 x 100 mm polystyrene round-bottom, Corning (Corning 14 ml, 17 x 100 mm polistiren cu fund rotund), nr. cat. 352051). Este necesar un amestec IC corespunzător a 5 probe suplimentare (adică 600 μl). Nu umpleți un volum total mai mare de 13,92 ml (corespunzând unui număr maxim de 111 probe).

Introducere în instrumentele QIASymphony SP/AS

1. Închideți toate sertarele și capacele.
2. Porniți instrumentele QIASymphony SP/AS și așteptați până când este afișat ecranul „Sample Preparation“ (Prepararea probelor) și se încheie procedura de inițializare.
3. Autentificați-vă pe instrument (sertarele se vor debloca).

Purificarea ARN-ului viral

artus HCV QS-RGQ Kit a fost validat cu o etapă de purificare a ARN-ului viral efectuată pe QIASymphony SP, utilizând QIASymphony DSP Virus/Pathogen Kit. Consultați *Manualul QIASymphony DSP Virus/Pathogen (QIASymphony DSP Virus/Pathogen Handbook)* pentru informații despre modul de pregătire a cartușului cu reactivi pentru etapa de purificare a probelor pe QIASymphony SP.

Seturi de control al dozării și seturi de parametri ai testului

Seturile de control al dozării reprezintă combinația dintre un protocol și parametri suplimentari, cum ar fi IC, pentru purificarea probelor pe QIASymphony SP. Pentru fiecare protocol este preinstalat un set implicit de control al dozării.

Seturile de parametri ai testului reprezintă combinația dintre o definiție a testului și parametrii suplimentari definiți, cum ar fi numărul de duplicate și numărul soluțiilor standard ale testului, pentru configurarea testului pe QIASymphony AS.

Pentru testările integrate pe QIASymphony SP/AS, setul de parametri ai testului este direct legat de un set inițial de control al dozării, care specifică procesul asociat de purificare a probelor.

Protocol: Izolarea ARN-ului și configurarea testului pe QIASymphony SP/AS

Elemente importante înainte de începere

- Asigurați-vă că sunteți familiarizat cu operarea instrumentelor QIASymphony SP/AS. Consultați manualele de utilizare furnizate împreună cu instrumentul și asigurați-vă că versiunile sunt cele specificate în protocolul de studiu.
- Înainte de a utiliza un cartuș cu reactivi (reagent cartridge, RC) pentru prima dată, verificați dacă soluțiile tampon QSL2 și QSB1 din RC conțin precipitate. Dacă este necesar, scoateți compartimentele care conțin soluțiile tampon QSL2 și QSB1 din RC și introduceți-le în incubator timp de 30 de minute la 37 °C, agitându-le ocazional pentru dizolvarea precipitatului. Asigurați-vă că reasezați compartimentele în pozițiile corecte. În cazul în care RC este deja perforat, verificați compartimentele să fie sigilate cu benzi de sigilare pentru reutilizare și introduceți în incubator întregul RC timp de 30 de minute la 37 °C, agitându-l ocazional la bain-marie.*
- Încercați să evitați agitarea puternică a RC; în caz contrar, se poate forma o spumă care poate cauza probleme de detectare a nivelului de lichid.
- Lucrați repede și păstrați reactivii PCR pe gheață sau în blocul de răcire înainte de încărcare.
- Volumele reactivilor sunt optimizate pentru 3 x 24 reacții pe kit. Pot fi testate mai puține sau mai multe probe, dar utilizarea sub-optimală a volumului de amestec master mix disponibil va apărea din cauza volumului mort calculat necesar pentru QIASymphony.
- Înainte de fiecare utilizare, toți reactivii trebuie decongelați complet, amestecați (prin pipetare verticală repetată, prin întoarcere sau prin vortexare rapidă) și centrifugați timp de cel puțin 3 secunde la 6800 x g. Evitați formarea de spumă în reactivi.

* Asigurați-vă să instrumentele au fost verificate, întreținute și calibrate cu regularitate, conform cu instrucțiunile producătorului.

- S-a demonstrat că eluatele din prepararea probelor și toate componentele *artus* HCV QS-RGQ Kit sunt stabile în instrument cel puțin pentru timpul normal necesar pentru purificarea probelor pentru 67 de probe și pentru configurarea testului la 72 de reacții, inclusiv până la 30 de minute timp de transfer de la QIASymphony SP/AS la instrumentul Rotor-Gene Q.

Operațiuni care trebuie executate înainte de începere

- Preparați toate amestecurile necesare. Dacă este necesar, preparați amestecurile care conțin ARN de transport (CARRIER) și substanțe de control interne chiar înainte de a începe.
- Înainte de începerea procedurii, asigurați-vă că particulele magnetice sunt complet resuspendate. Vortexați compartimentul care conține particule magnetice în agitatorul vortex timp de cel puțin 3 minute înainte de prima utilizare.
- Înainte de încărcarea RC, scoateți capacul compartimentului care conține particule magnetice și deschideți eprubetele pentru enzime. Asigurați-vă că stativul pentru enzime a fost echilibrat la temperatura camerei (15-25°C).
- Capacul de perforare (piercing lid, PL) trebuie să fie poziționat pe RC, iar capacul compartimentului cu particule magnetice trebuie scos sau, dacă utilizați un RC parțial folosit, asigurați-vă că benzile de sigilare pentru reutilizare au fost îndepărtate.
- Dacă probele sunt prevăzute cu coduri de bare, așezați probele în suportul pentru eprubete astfel încât codurile de bare să fie orientate către cititorul de coduri de bare din sertarul „Sample” (Probă) de pe partea stângă a QIASymphony SP.

Configurarea QIASymphony SP

Sertarul „Waste” (Deșeuri)

Suport al cutiilor individuale 1 – 4	Cutii individuale goale
Suport al pungilor pentru deșeuri	Pungă pentru deșeuri
Suport al flaconului de deșeuri lichide	Goliți și montați flaconul de deșeuri lichide

Sertarul „Eluate” (Eluat)

Stativ de eluție	Utilizați fanta 1, poziția de răcire
Volum de eluție*	Volum de eluție preselectat: 60 µl Volum de eluție inițial: 90 µl

* Volumul de eluție este preselectat pentru protocol. Acesta este volumul minim accesibil de eluat din eprubeta de eluție finală. Volumul inițial de soluție de eluție necesară pentru a se asigura că volumul de eluat propriu-zis este același cu volumul preselectat.

Sertarul „Reagents and consumables” (Reactivi și consumabile)

Cartușul cu reactivi (Reagent cartridge, RC) pozițiile 1 și 2	Încărcați 1 cartuș cu reactivi (reagent cartridge, RC) pentru până la 48 de probe sau 2 cartușe cu reactivi noi (reagent cartridge, RC) pentru până la 67 de probe
Suport al stativului pentru vârfuri poziția 1-4	Încărcați stative suficiente pentru vârfuri cu filtru de unică folosință, 200 µl (consultați componentele din plastic din tabelul de pe pagina următoare)
Suport al stativului pentru vârfuri poziția 5-18	Încărcați stative suficiente pentru vârfuri cu filtru de unică folosință, 1500 µl (consultați componentele din plastic din tabelul de pe pagina următoare)
Suport al cutiilor individuale poziția 1-3	Încărcați 3 cutii individuale care conțin cartușe pentru prepararea probelor
Suport al cutiilor individuale poziția 4	Încărcați 1 cutie individuală care conține învelișuri pentru 8 tije

Sertarul „Sample” (Probă)

Tip probă	Plasmă EDTA
Volumul probei (inclusiv volum în exces)	1200 µl
Eprubete pentru probe	Microtubes 2.0 ml Type H (Microeprubete 2,0 ml Tip H) sau Microtubes 2.0 ml Type I (Microeprubete 2,0 ml Tip I) (Sarstedt, nr. cat. 72.693 și 72.694)
Element de inserție	Tube Insert 3B (Element de inserție 3B pentru eprubete) (nr. cat. 9242083)

Componente din plastic necesare pentru 1-3 loturi de probe

	Un lot, 24 de probe*	Două loturi, 48 de probe*	Trei loturi, 67 de probe*
Vârfuri cu filtru de unică folosință, 200 µl [†]	28	52	76
Vârfuri cu filtru de unică folosință, 1500 µl ^{††}	113	206	309
Cartușe de preparare a probei [§]	21	42	54
Învelișuri pentru 8 tije [¶]	3	6	9

* Utilizarea mai multor eprubete cu substanță de control internă pe lot și efectuarea mai multor scanări ale inventarului necesită vârfuri cu filtru de unică folosință suplimentare.

† Există 32 de vârfuri cu filtru/stativ pentru vârfuri.

‡ Numărul de vârfuri cu filtru necesare include vârfuri cu filtru pentru 1 scanare a inventarului pe cartuș cu reactivi.

§ Există 28 de cartușe de preparare a probei/cutie individuală.

¶ Există douăsprezece învelișuri pentru 8 tije/cutie individuală.

Procedură de utilizare a QIASymphony SP/AS

Purificarea ARN-ului viral cu QIASymphony SP

1. Închideți toate sertarele și capacele instrumentului QIASymphony SP/AS.
2. Porniți instrumentul și așteptați până când este afișat ecranul „Sample Preparation” (Prepararea probelor) și se încheie procedura de inițializare.
Comutatorul de alimentare este localizat în colțul din stânga jos al QIASymphony SP.
3. Autentificați-vă în instrument.

4. Pregătiți următoarele sertare în conformitate cu secțiunea „Configurarea QIASymphony SP” de la pagina 24.
 - Sertarul „Waste” (Deșeuri) și, după ce acesta a fost pregătit, efectuați o scanare a inventarului.
 - Sertarul „Eluate” (Eluat) și, după ce acesta a fost pregătit, efectuați o scanare a inventarului.
 - Sertarul „Reagents and Consumables” (Reactivi și consumabile) și, după ce acesta a fost pregătit, efectuați o scanare a inventarului.
 - Sertarul „Sample” (Probă)
5. Utilizând configurarea „Integrated run” (Testare integrată) pe ecranul tactil al QIASymphony, introduceți informațiile solicitate pentru fiecare lot de probe care urmează a fi procesate. Selectați un set de parametri ai testului pentru testare și alocați-l lotului corespunzător din configurarea testului (assay set, AS) pentru probe.
6. Informații despre setul de parametri ai testului și volumul de eluție preselecat sunt furnizate în Tabel 2.

Pentru mai multe informații despre executarea testărilor integrate utilizând QIASymphony SP, consultați manualul de utilizare al instrumentului.
7. Atunci când configurați o testare integrată, verificați alocarea corectă a instrumentarului de laborator pentru probe, a tipului probei și a volumelor.

Informații despre consumabilele și componentele care trebuie încărcate în fiecare sertar sunt furnizate în secțiunea de mai sus.
8. După ce au fost introduse informațiile despre toate loturile testării integrate, faceți clic pe butonul „Ok” pentru a ieși din configurarea „Integrated run” (Testare integrată). Starea tuturor loturilor în cadrul prezentării de ansamblu a testării integrate se va schimba de la „LOADED” (ÎNCĂRCATĂ) la „QUEUED” (ÎN AȘTEPTARE). De îndată ce un lot este în așteptare, apare butonul „Run” (Testare). Apăsăți butonul „Run” (Testare) pentru a începe procedura.

Toate etapele de procesare sunt complet automate.

Configurarea QIASymphony AS

Consumabile

În timpul configurării, pozițiile corespunzătoare pentru fiecare consumabil pe modulul QIASymphony AS sunt indicate pe ecranul tactil al instrumentului.

Consumabile	Nume pe ecranul tactil	Pentru utilizare cu adaptor/suport pentru reactivi
Eprubete-bandă și capace, 0,1 ml (250)	QIA#981103 Strip Tubes 0.1 [†]	RG Strip Tubes 72 QS
Tuburi, conice, 2 ml, Qsym AS (500) ^{†‡}	QIA#997102 T2.0 Screw Skirt [§]	Reagent holder 1 QS
Tub, conic, 5 ml, Qsym AS (500) ^{†‡}	QIA#997104 T5.0 Screw Skirt [§]	Reagent holder 1 QS
Microeprubete de eluție CL (24 x 96)	QIA#19588 EMTR [*]	Elution Microtube Rack QS

* Indică instrumentarul de laborator care poate fi răcit utilizând un adaptor de răcire cu cod de bare.

† Pentru componentele amestecului master mix, amestecul master mix preparat de sistem, soluțiile standard ale testelor și substanțele de control ale testelor.

‡ Alternativ, pot fi utilizate eprubetele Sarstedt descrise în „Materiale necesare, dar nefurnizate”, pagina 10.

§ Sufixul „(m)” pe ecranul tactil indică faptul că toate calculele nivelului de lichid pentru tubul respectiv au fost optimizate pentru reactivi care formează un menisc concav.

Adaptoare și suporturi de reactivi

Stativ/suport de reactivi	Nume	Număr necesar
Stativ pentru probe	Elution Microtube Rack QS	1
Suporturi de reactivi	Reagent holder 1 QS	1
Stative pentru teste	RG Strip Tubes 72 QS	1

* Utilizarea mai multor eprubete cu substanță de control internă pe lot și efectuarea mai multor scanări ale inventarului necesită vârfuri cu filtru de unică folosință suplimentare.

Vârfuri cu filtru

Încărcați stativele pentru vârfuri cu fantele pentru vârfuri 1, 2 și 3 în sertarul „Eluate and Reagents” (Eluat și reactivi), apoi încărcați stativele pentru vârfuri în fantele pentru vârfuri 7, 8 și 9 în sertarul „Assays” (Teste).

Consumabil	Nume pe ecranul tactil	Număr minim pentru 24 de reacții	Număr minim pentru 72 de reacții
Vârfuri cu filtru, 1500 μ l (1024)	1500 μ l	5	6
Vârfuri cu filtru, 200 μ l (1024)	200 μ l	10	10
Vârfuri cu filtru, 50 μ l (1024)	50 μ l	25	73
Pungi pentru aruncarea vârfurilor	–	1	1

Încărcarea sertarelor QIASymphony AS pentru configurarea testelor

1. După ce ați trecut în așteptare o testare integrată, deschideți sertarele QIASymphony AS. Componentele necesare care trebuie încărcate sunt afișate pe ecranul tactil.
2. Întotdeauna asigurați-vă că parcurgeți următoarele etape înainte de testarea integrată.
 - Introduceți colectorul pentru vârfuri
 - Eliminați punga pentru aruncarea vârfurilor
 - Instalați o pungă pentru aruncarea vârfurilor goală
3. Definiți și încărcăți stativele pentru teste. Stativele pentru teste, în adaptoare răcite în prealabil, sunt încărcate în fantele „Assay” (Test). În secțiunea anterioară sunt oferite informații despre stativele pentru teste.
4. Verificați temperatura pozițiilor de răcire.

Când se ating temperaturile de răcire țintă, asteriscul mic din dreptul fiecărei fante va apărea în culoarea verde.

5. Umpleți fiecare eprubetă de reactiv cu volumul necesar de reactiv corespunzător, în conformitate cu informațiile de încărcare date de software-ul instrumentului.

Rețineți: Înainte de fiecare utilizare, toți reactivii, cu excepția amestecului Master Mix B, trebuie decongelați complet, amestecați (prin pipetare verticală repetată, prin întoarcere sau prin vortexare rapidă) și centrifugați timp de cel puțin 3 secunde la 6800 x g. Evitați formarea de bule sau de spumă, deoarece acestea pot genera erori în detecție. Lucrați repede și păstrați componentele PCR pe gheață sau în blocul de răcire înainte de încărcare.

Rețineți: Reactivii vâscoși pot fi dificil de manevrat cu pipetele manuale. Asigurați-vă că ați transferat volumul dorit de amestec Master Mix în eprubetă.

6. Se recomandă scanarea informațiilor despre kitul de teste pentru a permite trasabilitatea optimă a reactivilor. În acest scop, parcurgeți acești pași:
 - o Apăsați butonul „Scan Kit Barcode” (Scanare cod de bare al kitului) pe ecranul tactil și apăsați linia de culoare albastru deschis a codului de bare al kitului.
 - o Apăsați câmpul text și, utilizând scannerul de coduri de bare portabil, scanați codul de bare al kitului de pe partea superioară a *artus* HCV QS-RGQ Kit.
7. Încărcați suportul de reactivi și introduceți eprubetele de reactiv, fără capace, în pozițiile corespunzătoare ale adaptorului răcit în prealabil pentru reactivi.
8. Încărcați vârfurile cu filtru de unică folosință în sertarele „Eluate and Reagents” (Eluat și reactivi) și „Assays” (Teste), în funcție de numărul necesar al fiecărui tip de vârf.
9. Închideți sertarele „Eluate and Reagents” (Eluat și reactivi) și „Assays” (Assays).
10. La închiderea fiecărui sertar, apăsați „Scan” (Scanare) pentru a începe scanarea inventarului pentru fiecare sertar.

Scanarea inventarului verifică fantele, adaptoarele, vârfurile cu filtru și colectorul pentru vârfuri, precum și încărcarea corectă a volumelor specifice de reactivi. Dacă este necesar, corectați posibilele erori.

Configurarea testului va începe automat după ce etapa de purificare pe QIASymphony SP este finalizată și stativele de eluat sunt transferate la QIASymphony AS.

11. După finalizarea testării, apăsați „Remove” (Eliminare) din ecranul de configurare a testului „Overview” (Prezentare de ansamblu). Deschideți sertarul „Assays” (Teste) și descărcați stativele pentru teste.

Scoateți reactivii reziduali *artus* HCV QS-RGQ din QIASymphony AS și eliminați-i în conformitate cu cerințele locale.
12. Descărcați fișierele cu rezultate și fișierele ciclatorului (opțional).

-
13. Transferați fișierul ciclatorului de testare pe instrumentul Rotor-Gene Q utilizând al consolei de gestionare QIASymphony (QIASymphony Management Console, QMC) sau prin descărcarea pe un stick USB.
- În interfața cu utilizatorul pentru prepararea probelor, selectați fila „In-/Output Files” (Fișiere de intrare/ieșire).
 - Introduceți stickul USB, selectați „Cycler files” (Fișiere ciclator) și efectuați transferul.
 - Mesajul de pe ecran trebuie să confirme transferul, selectați ok și scoateți stickul USB, care conține acum fișierele descărcate.
14. Continuați cu „Protocol: RT-PCR pe instrumentul Rotor-Gene Q”, pagina următoare.
15. Efectuați întreținerea obișnuită a instrumentului QIASymphony AS în timpul testării PCR pe instrumentul Rotor Gene Q sau mai târziu.

Deoarece fluxul de lucru este o operație integrată, curățați toate instrumentele la sfârșitul fluxului de lucru finalizat.

Urmați instrucțiunile de întreținere din „*Manual de utilizare QIASymphony SP/AS – Descriere generală*” (*QIASymphony SP/AS User Manual – General Description*).

Efectuați cu regularitate întreținerea, pentru a reduce la minimum riscul de contaminare încrucișată.

Protocol: RT-PCR pe instrumentul Rotor-Gene Q

Elemente importante înainte de începere

- Acordați-vă timp pentru a vă familiariza cu instrumentul Rotor-Gene Q înainte de a începe protocolul. Consultați manualul de utilizare al instrumentului.
- Configurarea testului necesită includerea tuturor celor patru standarde de cuantificare, precum și a unei substanțe de control negative (apă de calitate PCR) cel puțin, în fiecare testare PCR.

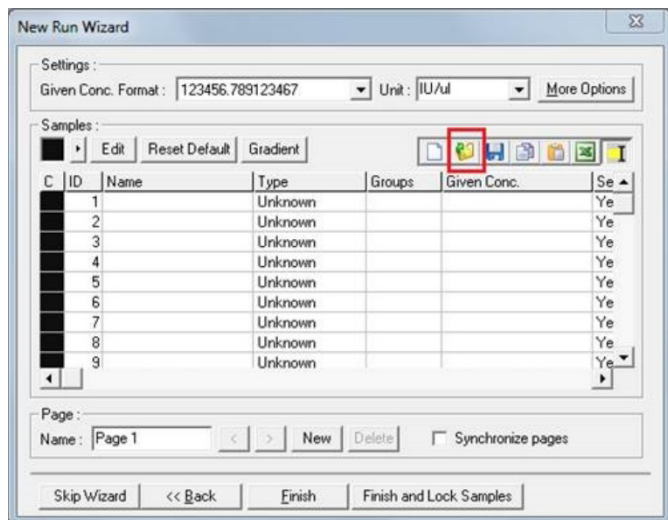
Procedura de utilizare a instrumentului Rotor-Gene Q

1. Selectați rotorul cu 72 de godeuri în fereastra „New Run Wizard” (Expert testare nouă).
2. Faceți clic pe caseta de selectare „Locking ring attached” (Inel de blocare atașat) din pagina de configurare.
3. Faceți clic pe butonul „Next” (Următorul) și confirmați parametrii de testare.
4. Asigurați-vă că optimizarea amplificării este setată la QS1
5. Introduceți detaliile de identificare ale operatorului și volumul de reacție (50 µl)
6. Faceți clic pe butonul „Start” pentru a începe testarea PCR.
7. Denumiți probele

Rețineți: Se recomandă ca lista de identificare a probelor să fie transferată electronic din instrumentul QIASymphony SP/AS către instrumentul Rotor-Gene Q pentru a preveni erorile de introducere a datelor.

8. Transferați fișierul relevante ale ciclatorului într-o zonă locală de pe computer

9. Selectați pictograma „Open file” (Deschidere fișier) (consultați captura de ecran de pe pagina următoare) pe mesajul de denumire a probelor, apoi localizați și deschideți fișierul relevant al ciclatorului.



10. După denumirea probelor, faceți clic pe „Finish” (Finalizare).
11. Închideți eprubetele PCR și introduceți-le în rotorul cu 72 de godeuri al Rotor-Gene Q. Asigurați-vă că cele 4 eprubete-bandă Rotor-Gene Q sunt transferate în orientarea corectă, astfel încât poziția adaptorului de răcire și a rotorului să coincidă.
- Rețineți:** Asigurați-vă că inelul de blocare, care este un accesoriu al instrumentului Rotor-Gene Q, este amplasat pe partea superioară a rotorului pentru a preveni deschiderea accidentală a eprubetelor în timpul testării.
12. Pentru detecția ARN HCV, creați un profil de temperatură așa cum este descris în Tabel 3.
13. Asigurați-vă că setările de optimizare a amplificării coincid cu cele specificate în Tabel 4 și sunt aplicate la poziția eprubetei care conține QS1 (aceasta este eprubeta după ultima probă de testare din QIASymphony SP).
14. Porniți testarea.

Tabel 3. Parametrii de testare pentru instrumentul Rotor-Gene Q

Etapă	Temperatură (°C)	Durață	Canale de achiziție	Număr de cicluri
Etapa de revers-transcriere (Reverse transcription, RT)	50	10 min	nu se aplică	1
Denaturare inițială/ activarea enzimei	95	2 min	nu se aplică	1
Denaturare	95	10 sec	nu se aplică	
Temperare	55	20 sec	nu se aplică	
Alungire	72	20 sec	Țintă: Verde Substanță de control internă: Portocaliu	45

Tabel 4. Setări de optimizare a amplificării

Setați temperatura la: 72 °C					
Efectuați optimizarea înainte de prima achiziție (asigurați-vă că ați bifat)					
Setări ale canalului de optimizare a amplificării automate					
Canal	Poziția eprubetei	Valoare citită min.	Valoare citită max.	Amplificare min.	Amplificare max.
Verde	QS1	5 FI	10 FI	-10	10
Portocaliu	QS1	5 FI	10 FI	-10	10

Setări ale analizei

Această secțiune descrie setările analizei din software-ul Rotor-Gene Q (2.3 sau mai recent) după terminarea testării. Utilizând aceleași setări ale analizei, se asigură o performanță continuă a testului și este permisă compararea rezultatelor între diferite testări.

Tabel 5. Parametrii analizei de testare pentru *artus* HCV QS-RGQ Kit

Canal	Scară liniară	Tub dinamic	Prag	Se ignoră primul	Pantă corectă	Eliminare deviație extremă (prag de eficiență a reacției)
Verde (FAM)	Selectat	Selectat	0.02	10	oprit	nu se aplică
Portocaliu (Texas roșu)	Selectat	Selectat	0.02	15	oprit	nu se aplică

N/A: nu se aplică

Criteria de validitate a testărilor și a probelor

Interpretarea rezultatelor va fi efectuată pentru toate testările PCR folosind software-ul Rotor-Gene Q. Validitatea testărilor și a probelor va fi evaluată conform descrierii din Tabel 6, Tabel 7 și Tabel 8 prin examinarea ieșirii de la instrumentul Rotor-Gene Q. Pentru analiza ulterioară trebuie să se utilizeze doar rezultate valide ale probelor din testări valide.

Tabel 6. Criterii de validitate a testărilor

Parametru de control	Criterii ale canalului verde (FAM)	Criterii ale canalului portocaliu (Texas roșu)
Substanță de control fără șablon (NTC)	Fără amplificare	C _t 26.30–33.60
QS1	Amplificare	Amplificare*
QS2	Amplificare	Amplificare
QS3	Amplificare	Amplificare
QS4	Amplificare	Amplificare

* În cazuri rare, o încărcare virală HCV foarte ridicată ar putea duce la eșecul substanței de control interne (IC). Dacă IC al QS1 nu reușește să se amplifice, dar sunt îndeplinite alte criterii de validitate în test, testarea trebuie tratată ca validă.

Tabel 7. Criterii de validitate a testărilor pentru curba standard

Parametru de control	Criterii
R^2	≥0.990
Intersecție ('B') C _t	30.75-34.43

Validitatea pentru proba individuală este prezentată în Tabel 8 și este aplicabilă după ce testarea a fost determinată ca fiind validă conform criteriilor din Tabel 6 și Tabel 7.

Tabel 8. Criterii de validitate a probelor

Probă	Criterii ale canalului verde (FAM)	Criterii ale canalului portocaliu (Texas roșu)
HCV nu a fost detectat	Fără amplificare	$\geq 25,00 C_t^*$
HCV detectat ≤ 2000 UI/ml	Amplificare	$\geq 25,00 C_t^*$
HCV detectat > 2000 UI/ml	Amplificare	$\geq 25,00 C_t^\dagger$

* Diferența dintre substanța de control internă (IC) a substanței de control fără șablon (NTC) și substanța de control internă (IC) a probei trebuie să fie $< 3,50 C_t$ ($\Delta C_t IC = C_t IC_{\text{Probă}} - C_t IC_{\text{NTC}}$).

† În cazuri rare, o încărcare virală HCV foarte ridicată poate determina eșecul IC dar, în cazul în care concentrația HCV determinată se încadrează în intervalul liniar ($\leq 1 \times 10^8$ UI/ml) pentru test, atunci proba trebuie tratată ca validă.

Rezultatele substanței de control de proces complet

Substanțele de control externe de proces complet (full process controls, FPC) sunt opționale, dar recomandate. Testul *artus* HCV QS-RGQ nu oferă reguli fixe pentru analiza FPC, deoarece FPC-urile sunt clasificate ca probe și urmează să fie furnizate și incluse conform reglementărilor locale, statale și federale.

Dacă acestea sunt incluse, asigurați-vă de următoarele:

- FPC-ul ridicat (H-FPC) raportează un rezultat pozitiv al probei HCV în cadrul specificațiilor predefinite
- FPC-ul scăzut (L-FPC) raportează un rezultat pozitiv al probei HCV în cadrul specificațiilor predefinite
- FPC-ul negativ (N-FPC) raportează un rezultat negativ al probei HCV

Dacă rezultatele pentru H-FPC, L-FPC sau N-FPC nu se încadrează în specificațiile predefinite de laborator, urmați procedurile standard stabilite pentru o analiză a cauzei principale și evaluarea adecvată a stării validității probelor și a testărilor.

Cuantificare

Standardele de cuantificare (Virusul hep. C RG QS 1-4) din *artus* HCV QS-RGQ Kit sunt tratate ca probe purificate anterior și se utilizează un volum al probei de 25 μl. Pentru a genera o curbă standard pe instrumentele Rotor-Gene Q, toate cele patru standarde de cuantificare trebuie utilizate și definite în caseta de dialog „Edit Samples” (Editare probe) pe instrumentul Rotor-Gene Q ca standarde cu concentrațiile specificate (consultați manualul de utilizare al instrumentului pentru mai multe detalii).

Rețineți: Standardele de cuantificare au fost calibrate în conformitate cu Standardul internațional pentru HCV, determinat de Organizația Mondială a Sănătății (OMS). Valorile menționate sunt exprimate în UI/μl și trebuie să se utilizeze următoarea ecuație pentru a transforma în UI/ml valorile obținute din curba standard în UI/μl pentru a raporta concentrația HCV în probă.

$$\text{Rezultat (UI/ml)} = \frac{\text{Rezultat (UI/}\mu\text{l)} \times \text{Volum de eluție inițial (90 }\mu\text{l)}}{\text{Volumul probei (1 ml)}}$$

Interpretarea rezultatelor

Testul *artus* HCV QS-RGQ Kit este destinat utilizării împreună cu simptomele clinice ale pacientului și determinării altor markeri de laborator. Acest kit poate fi utilizat pentru a stabili prognosticul bolii și, de asemenea, ca un ajutor pentru evaluarea răspunsului viral la tratamentul antiviral, măsurat prin modificările nivelurilor de HCV ARN în plasma umană tratată cu EDTA la nivelul de referință, în timpul tratamentului și la finalul tratamentului.

Tabel 9. Interpretarea rezultatelor testului cu *artus* HCV QS-RGQ Kit

Semnal detectat pe canalul verde	Semnal detectat pe canalul portocaliu	Rezultat cantitativ (UI/ml)	Interpretare
Da	≥25,00*	< 15	Rezultat valid: HCV ARN detectat, < 15 UI/ml, Cuantificarea nu este posibilă, deoarece rezultatul cantitativ este sub intervalul liniar al testului.
Da	≥25,00*	≥15 și ≤2000	Rezultat valid: HCV ARN detectat la concentrația calculată. Rezultatul cantitativ se încadrează în intervalul liniar al testului.
Da	≥25,00†	>2000 și ≤1 x 10 ⁸	Rezultat valid: HCV ARN detectat la concentrația calculată. Rezultatul cantitativ se încadrează în intervalul liniar al testului.
Da	Da/Nu†	>1 x 10 ⁸	Rezultat valid: HCV ARN detectat. Nu este posibilă cuantificarea, deoarece aceasta depășește intervalul liniar al testului.
Nu	≥25,00*	0	Rezultat valid: HCV ARN nedetectat.
Nu	Nu	-	Rezultat nevalid: Nu se poate obține o concluzie cu privire la rezultate.

* Diferența dintre substanța de control internă (IC) a substanței de control fără șablon (NTC) și IC a probei trebuie să fie < 3,50 C_t ($\Delta C_{tIC} = C_{tIC_{Proba}} - C_{tIC_{NTC}}$).

† În cazuri rare, o încărcare virală HCV foarte ridicată ar putea duce la eșecul IC. În cazul în care concentrația determinată a HCV se încadrează în intervalul liniar al testului, proba trebuie tratată ca validă.

Caracteristici de performanță

Limită de blanc și specificitate

Limita de blanc (limit of blank, LOB) este definită ca fiind cel mai mare rezultat al măsurătorii probabil să fie observat pentru o probă blanc. În cazul *artus* HCV QS-RGQ Kit, un parametru adecvat pentru analiza LOB este intensitatea fluorescenței cu punct final în canalul de testare. Nivelurile de fluorescență ale probelor negative trebuie să rămână sub o anumită valoare de prag (de exemplu, 0.02) pentru a genera concluzia „HCV RNA Not Detected” (HCV ARN nedetectat).

Performanța testului utilizând probe negative determină probabilitatea unor posibile rezultate fals pozitive.

A fost analizat un total de 120 de probe de plasmă EDTA seronegative de la donatori individuali, utilizând fluxul de lucru *artus* HCV QS-RGQ. Nici una dintre cele 120 de probe nu a generat o valoare C_t înainte de ciclul 45 și toate au fost determinate ca „HCV RNA Not Detected” (HCV ARN nedetectat). Specificitatea *artus* HCV QS-RGQ Kit pentru probele HCV seronegative a fost, prin urmare, 100% cu o LOB la ciclul 45 utilizând un prag stabilit la 0,02.

Limita de detecție (Limit of detection, LOD)

LOD pentru *artus* HCV QS-RGQ Kit a fost determinată utilizând cel de-al 5-lea standard internațional al OMS pentru HCV (cod NIBSC 14/150), cu respectarea Ghidului EP17-A2 (5) al Institutului pentru Standarde Clinice și de Laborator (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI). LOD a fost definită ca cea mai mică cantitate de analit dintr-o probă detectată cu o probabilitate de 95%. Cel de-al 5-lea standard internațional pentru HCV al OMS a fost utilizat pentru a pregăti un set de șase diluții în serie, variind de la 69,5 UI/ml în plasma EDTA. LOB a fost confirmată a fi de 0 UI/ml, determinată printr-o analiză a probelor HCV seronegative.

Un total de 102 duplicate pe nivel de concentrație (101 duplicate fiecare pentru 9 UI/ml și 15 UI/ml) a fost testat pe șapte instrumente QIASymphony și pe șapte instrumente Rotor-Gene Q pe parcursul a trei zile de studiu. Toate duplicatele fiecărei diluții au fost testate într-o singură testare PCR. Testarea a fost efectuată folosind trei loturi diferite din *artus* HCV QS-RGQ Kit, fiecare lot fiind utilizat în trei zile diferite de trei operatori diferiți.

A fost efectuată o regresie de tip probit cu software-ul SAS® și a fost determinată valoarea LOD 95%, precum și ratele de succes la 15 UI/ml. Rezultatele sunt prezentate în Tabel 10 și Tabel 11.

Tabel 10. Estimarea limitei de detecție prin analiză de tip probit, cu limită de încredere bilaterală 95%

Estimarea limitei de detecție (LOD)	Limită de încredere 95% bilaterală inferioară	Limită de încredere 95% bilaterală superioară
10,66	8,90	14,21

Tabel 11. Rezumatul ratei de succes cu limită de încredere 95% unilaterală superioară

Valoare nominală UI/ml	Succese frecv./nr. total de dupl.	Rată de succes (%)	Rată de succes limită de încredere 95% unilaterală superioară (%)	Calc. mediu UI/ml	Calc. mediu. log ₁₀ UI/ml	SD log ₁₀ UI/ml calc.	Abatere	FDD	TAE
5,40	84/102	82,35	88,27	7,87	0,90	0,243	0,16	4,86	0,65
9,00	91/101	90,10	94,53	12,30	1,09	0,312	0,14	7,64	0,76
15,00	99/101	98,02	99,65	19,31	1,29	0,295	0,11	6,85	0,70
25,00	102/102	100,00	100,00	36,67	1,56	0,191	0,17	3,48	0,55
41,70	102/102	100,00	100,00	56,55	1,75	0,187	0,13	3,39	0,51
69,50	102/102	100,00	100,00	103,64	2,02	0,178	0,17	3,18	0,53

Calc.: calculat; FDD (fold detectable difference): diferență detectabilă replicabilă; Frecv.: frecvență; nr.: număr; dupl.: duplicate; SD (standard deviation): abatere standard; TAE (total analytical error): eroare analitică totală.

Limita de detecție pentru virusul hepatitei C genotipurile de la 2 la 6

Strategia de verificare s-a bazat pe orientările furnizate în ghidul CLSI EP17-A2 (5). Pentru a verifica LOD și limita inferioară de cuantificare (lower limit of quantification, LLOQ) la 15 UI/ml, fiecare genotip HCV de la 2 la 6 a fost testat cu 60 de duplicate, la o concentrație de 15 UI/ml. Probele clinice care reprezintă fiecare genotip au fost diluate pentru a se obține concentrația dorită înainte de a fi testate cu *artus* HCV QS-RGQ Kit. Această testare a fost efectuată cu trei loturi diferite ale *artus* HCV QS-RGQ Kit utilizând trei sisteme diferite de instrumente QIASymphony și Rotor-Gene Q. Ratele de succes și limita de încredere 95% unilaterală superioară pentru HCV genotipurile de la 2 la 6 la o concentrație nominală de 15 UI/ml sunt prezentate în Tabel 12.

Tabel 12. Rezumatul ratei de succes pentru hepatita C genotipurile de la 2 la 6 la 15 UI/ml, incluzând limita de încredere 95% unilaterală superioară.

Genotipul virusului hepatitei C	Valoare nominală UI/ml	Succese frecvente/ nr. total de dupl.	Ponderea succeselor (%)	Limită de încredere 95% unilaterală superioară
2	15	58/60	96,67	99,40
3	15	60/60	100,00	100,00
4	15	58/60	96,67	99,40
5	15	55/59	93,22	97,65
6	15	56/58	96,55	99,38

HCV: virusul hepatitei C.

Interval liniar și limită de cuantificare

Intervalul liniar al *artus* HCV QS-RGQ Kit a fost determinat în conformitate cu recomandările din Ghidul CLSI EP06-A (6). Aceasta a implicat prepararea a 10 diluții în serie ale construcțiilor ARN încapsulate de transcriere in vitro (in vitro transcription, IVT), care au fost reprezentative pentru HCV genotipurile de la 1 la 6. Fiecare construcție a fost diluată în serie în plasmă EDTA negativă pentru a testa intervalul de lucru liniar al testului. Concentrațiile testate au variat de la 15 UI/ml la 1×10^8 UI/ml. Probele au fost analizate utilizând *artus* HCV QS-RGQ Kit și fiecare nivel de diluție a fost testat în șase duplicate. Figura 1 prezintă exemplificativ reprezentarea grafică de ieșire și de regresie pentru HCV genotipul 1, deoarece acesta este cel mai răspândit genotip în rândul populației din Europa.

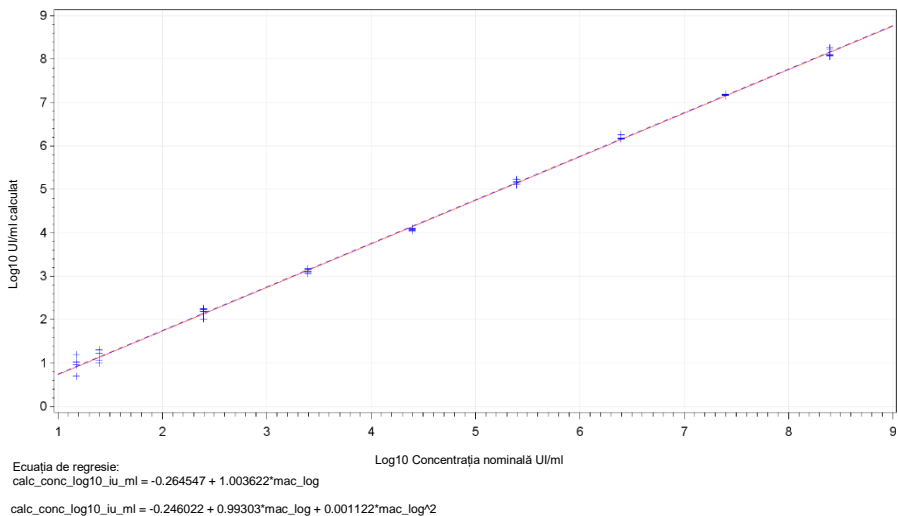


Figura 1. Log10 UI/ ml calculat în raport cu log10 UI/ml concentrație nominală pentru HCV genotip 1. Linia continuă roșie reprezintă linia de regresie liniară, iar linia punctată albastră reprezintă linia de regresie pătratică.

Intervalul liniar al *artus* HCV QS-RGQ V2 Kit a fost determinat pentru a acoperi concentrațiile de la 15 UI/ml până la 1×10^8 UI/ml HCV în plasmă EDTA pentru genotipurile 1-6. LLOQ a fost definită ca fiind cea mai mică concentrație din intervalul liniar care are o eroare analitică totală (TAE; $2 \times$ abatere standard [SD] + [Abatere]) de $\leq 1,0 \log_{10}$ UI/ml. Datele generate pentru verificarea LOD în test au fost utilizate pentru a calcula diferența detectabilă replicabilă [(fold detectable difference, FDD): $10^{((SD \text{ total}) \cdot \sqrt{2})^2)}$], precum și TAE la 15 UI/ml. Așa cum se arată în Tabel 13, HCV genotipurile de la 1 la 6 au demonstrat o TAE de $\leq 1,0 \log_{10}$ UI/ml la 15 UI/ml.

Tabel 13. Rata de succes, concentrația calculată a virusului hepatitei C (UI/ml), diferența detectabilă replicabilă (FDD) și eroarea analitică totală (total analytical error, TAE) la 15 UI/ml

Genotip HCV	Valoare nominală UI/ml	Succese frecv./nr. total de dupl.	Calc. mediu UI/ml (medie geometrică)	Calc. mediu log ₁₀ UI/ml	SD log ₁₀ UI/ml calc.	Abatere	FDD	TAE
1 (OMS*)	15,00	99/101	19,31	1,29	0,295	0,11	6,85	0,70
2	15,00	58/60	21,00	1,32	0,258	0,15	5,37	0,66
3	15,00	60/60	10,77	1,03	0,403	-0,14	13,77	0,95
4	15,00	58/60	15,94	1,20	0,250	0,03	5,09	0,53
5	15,00	55/59	9,59	0,98	0,290	-0,19	6,61	0,77
6	15,00	56/58	17,10	1,23	0,273	0,06	5,94	0,60

* Al 5-lea standard internațional al Organizației Mondiale a Sănătății (OMS) pentru HCV (cod NIBSC 14/150). FDD (fold detectable difference): diferență detectabilă replicabilă; Frecv.: frecvență; HCV (hepatitis C virus): virusul hepatitei C; SD (standard deviation): abatere standard; nr.: număr; dupl.: duplicate; TAE (total analytical error): eroare analitică totală.

Precizie, repetabilitate și variabilitate de la un lot la altul

Precizia *artus* HCV QS-RGQ Kit a fost evaluată cu respectarea recomandărilor din Ghidul CLSI EP05-A3 (7). Aceasta a implicat testarea unui panel de cinci membri, care a inclus o probă negativă, o probă cu o concentrație la 3 x LOD, o probă clinică diluată 1:100 în plasmă EDTA și două probe artificiale din intervalul liniar pentru test. Probele artificiale au conținut o construcție ARN IVT încapsulat, reprezentativă pentru HCV genotipul 3. Toate probele au fost în plasmă EDTA. Câte o testare integrată QS-RGQ a fost efectuată de către fiecare operator în opt zile (ne)consecutive, cu patru duplicate per membru de panel per testare. Aceasta a însemnat că pentru acest studiu au fost efectuate 24 de testări (8 zile x 3 operatori x 1 testare per operator per zi), care au generat 96 de puncte de date per membru al panelului de testare în trei loturi diferite ale *artus* HCV QS-RGQ Kit. În plus, au fost utilizate trei platforme diferite QS-RGQ pentru testare, precum și trei loturi diferite din DSP Virus/Pathogen Midi Kit și trei operatori diferiți care efectuează testarea.

Componentele de variație din acest studiu sunt prezentate în Tabel 14. SD totală a fost raportată pentru Log₁₀(UI/ml) și această estimare reprezintă variabilitatea din laborator (adică precizia intermediară). Tabel 14 demonstrează că SD a variat de la 0,131 la cea mai mare concentrație testată (5 x 10⁶ UI/ml) până la 0,222 la cea mai mică concentrație testată (45 UI/ml).

Tabel 14. Abatere standard (standard deviation, SD) a componentelor variației Log₁₀ calculat UI/ml și coeficientul de variație log-normal procentual (percentage coefficient of variance, %CV)

Conc. nominală UI/ml	Nr. de observații	SD între testări (%CV)	SD între zile (%CV)	SD între operatori (%CV)	SD între loturile kitului (%CV)	SD între loturile de extracție (%CV)	SD în testare (%CV)	SD totală (%CV total)
5 x 10 ⁶	96	0,112 (26,30)	0,017 (3,82)	0,014 (3,34)	0,051 (11,86)	0,000 (0,00)	0,054 (12,38)	0,131 (30,96)
100	96	0,136 (32,04)	0,044 (10,21)	0,000 (0,00)	0,022 (5,05)	0,000 (0,00)	0,145 (34,22)	0,202 (49,14)
45	96	0,115 (26,86)	0,072 (16,60)	0,000 (0,00)	0,016 (3,68)	0,000 (0,00)	0,178 (42,86)	0,222 (54,62)
18,9 x 10 ³ (probă clinică)	96	0,094 (21,97)	0,049 (11,24)	0,045 (10,46)	0,035 (7,96)	0,000 (0,00)	0,063 (14,69)	0,131 (30,74)

Conc. : concentrație; CV: coeficient de variație; SD: abatere standard.

Un model a fost adaptat la datele cu log₁₀ UI/ml ca variabilă de răspuns și lotul kitului ca un efect fix categoric. Diferența de log₁₀ UI/ml mediu între fiecare pereche de loturi ale kitului (adică trei diferențe în total) a fost raportată împreună cu eroarea standard corespunzătoare (standard error, SE) și cu intervalul de încredere 95% (confidence interval, CI). Rezultatele sunt prezentate în Tabel 15.

Tabel 15. Diferența în log₁₀ UI/ml mediu calculat între loturile kitului pentru fiecare testare a probelor

Conc. nominală UI/ml	Nr. total de observații	Dif. între loturile kitului	Dif. log ₁₀ UI/ml mediu	Eroare standard (SE)	Limită de încredere 95% inferioară	Limită de încredere 95% superioară	Valoare p
5 x 10 ⁶	96	1-2	-0,046	0,030	-0,106	0,014	0,134
		1-3	-0,130	0,030	-0,190	-0,070	< 0,001
		2-3	-0,085	0,030	-0,145	-0,025	0,006
100	96	1-2	-0,048	0,050	-0,146	0,050	0,336
		1-3	-0,117	0,050	-0,215	-0,018	0,021
		2-3	-0,069	0,050	-0,167	0,030	0,169
45	96	1-2	0,049	0,055	-0,060	0,159	0,371
		1-3	-0,058	0,055	-0,167	0,051	0,294
		2-3	-0,107	0,055	-0,217	0,002	0,054
18,9 x 10 ³ (probă clinică)	96	1-2	-0,070	0,031	-0,132	-0,008	0,026
		1-3	-0,104	0,031	-0,166	-0,042	0,001
		2-3	-0,034	0,031	-0,096	0,028	0,278

Conc. : concentrație.

Diferența maximă absolută dintre diferitele loturi ale kitului utilizate a fost de 0,130 în log₁₀ UI/ml mediu.

Reproductibilitate

Modelul acestui studiu se bazează pe Ghidul CLSI EP05-A3 (7). Precizia este definită ca „apropierea acordului dintre valorile măsurate obținute prin măsurători repetate pe obiecte identice sau similare în condiții specificate”. Reproducibilitatea, conform EP05-A3, este precizia în mai multe unități. În cadrul acestui studiu, condițiile de laborator au variat în funcție de zile, testări („zi” și „testare” se confundă) și de utilizarea a trei unități de testare diferite (o locație internă și două locații de testare externe).

În fiecare unitate de testare externă s-a realizat o testare integrată a *artus* HCV QS-RGQ Kit pe zi într-o perioadă de opt zile (ne)consecutive, cu patru duplicate per probă per testare. În fiecare dintre cele două unități de testare externe a fost utilizat un singur instrument pentru un total de 16 testări (8 zile x 1 testare pe zi x 2 unități de testare) în acest studiu, în plus față de datele generate intern. Subsetul datelor generate pentru studiul de precizie și de repetabilitate (consultați pagina 45), unde loturile kitului se potrivesc cu cele utilizate în acest studiu, a reprezentat cea de-a treia unitate de testare în acest studiu de reproductibilitate.

Tabel 16. Statistici sumare pentru \log_{10} UI/ml calculat după concentrația nominală a probei pentru toate cele trei unități de testare

Conc. nominală UI/ml	\log_{10} UI/ml nominal	Nr. duplicate	Medie	Median	Abatere standard (SD)	Minim	Maxim
5×10^6	6,699	96	6,93	6,93	0,083	6,68	7,17
100	2,000	96	2,15	2,15	0,138	1,73	2,42
45	1,653	96	1,82	1,85	0,214	1,27	2,70
$18,9 \times 10^3$ (probă clinică)	4,276	96	4,33	4,33	0,063	4,17	4,53

Conc.: concentrație; Nr.: număr.

Așa cum se arată în Tabel 16, valoarea SD maximă în toate cele trei unități de testare a fost de 0,214 \log_{10} UI/ml cu cea mai mică concentrație testată în acest studiu, respectiv, la 45 UI/ml (3 x LOD).

Reactivitate încrucișată și infecții mixte

Acest studiu a fost conceput pentru a testa existența unei posibile interferențe în detecția HCV din cauza reactivității încrucișate cu agenți patogeni care sunt asociați sau similari cu HCV utilizând *artus* HCV QS-RGQ Kit. Pentru probele pozitive pentru HCV, absența interferenței a fost definită ca o diferență nesemnificativă în \log_{10} UI/ml între rezultatele obținute din substanțele de control și din probele îmbogățite cu agenți patogeni. Dacă s-a observat o diferență semnificativă între probe, aceasta trebuia să fie mai mică

decât dublul preciziei intermediare a testului. În plus, probele care au fost negative pentru HCV trebuiau să fie negative la testarea pentru HCV, atunci când au fost testate în prezența agenților patogeni.

Probele pozitive la HCV au fost fabricate la o concentrație de 45 UI/ml, utilizând material IVT încapsulat, reprezentativ pentru HCV genotipul 1a. Un număr total de 34 de agenți patogeni diferiți au fost îmbogății individual în probele pozitive la HCV fabricate, precum și în probele negative pentru VHC. Ulterior, ARN-ul a fost extras și testat în șase duplicate, utilizând instrumentul QIASymphony SP/AS și instrumentele Rotor-Gene Q 5Plex HRM. Substanțele de control utilizate pentru acest studiu au fost plasmă negativă la HCV fără agenți patogeni (substanță de control negativă) și plasmă pozitivă la HCV fără agenți patogeni, la o concentrație de 45 UI/ml (substanță de control HCV 45).

Agenții patogeni au fost îmbogății în probe pentru a crea o concentrație finală de 1×10^5 în unitatea de măsură respectivă indicată pe certificatul de analiză (de exemplu, UI, copii, particule, cultură tisulară doză infecțioasă, care va infecta 50% (TCID₅₀), unități formatoare de colonii [colony forming units, UFC], particule virale [virus particles, VP]). Agenții patogeni care nu au fost suficient de concentrați pentru a crea această concentrație finală în probă au fost preparați la cea mai mare concentrație posibilă.

Tabel 17. Agenții patogeni testați pentru reactivitate încrucișată la probele de substanță de control negative pentru virusul hepatitei C și la probele pozitive pentru virusul hepatitei C la 45 UI/ml

Conc. de testare finală	Specie	HCV negativ		HCV 45 UI/ml			Valoare p
		Frecv. Încercărilor negative/nr. total de probe negative	Diferența în log ₁₀ UI/ml mediu	Eroare standard (SE)	Limită de încredere 95% inferioară	Limită de încredere 95% superioară	
1 x 10 ⁵ (UI/ml)	Adenovirus tip 5	6/6	0,251	0,182	-0,123	0,626	0,179
Nediluat (nu este dată conc. standard)	Polyomavirus uman BK	6/6	0,022	0,182	-0,353	0,397	0,905
1 x 10 ⁵ CFU/ml)	<i>Candida albicans</i>	6/6	0,148	0,182	-0,227	0,522	0,425
1 x 10 ⁵ UFI/ml	<i>Chlamydia trachomatis</i>	6/6	0,348	0,182	-0,026	0,723	0,067
1 x 10 ⁵ copii/ml	Citomegalovirus	6/6	-0,079	0,161	-0,410	0,253	0,630
1 x 10 ⁵ copii/ml	Virus Dengue 1	6/6	-0,170	0,160	-0,499	0,159	0,297
1 x 10 ⁵ copii/ml	Virus Dengue 2	6/6	0,149	0,160	-0,180	0,478	0,361
1 x 10 ⁵ copii/ml	Virus Dengue 3	6/6	-0,044	0,160	-0,373	0,285	0,786
1 x 10 ⁵ copii/ml	Virus Dengue 4	6/6	0,126	0,160	-0,203	0,455	0,438
5 x 10 ³ TCID ₅₀ /ml	Virusul Epstein-Barr	6/6	-0,209	0,161	-0,540	0,122	0,205
1 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /ml	Virusul hepatitei A	6/6	-0,275	0,161	-0,606	0,057	0,100
1 x 10 ⁵ UI/ml	Virusul Herpes Simplex tip 1	6/6	0,036	0,161	-0,295	0,367	0,823
1 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /ml	Virusul Herpes Simplex tip 2	6/6	0,332	0,146	0,027	0,637	0,034
5 x 10 ³ TCID ₅₀ /ml	Virusul herpetic uman tip 8	6/6	0,265	0,146	-0,040	0,570	0,085
1 x 10 ⁵ UFP/ml -	Gripă de tip A	6/6	0,152	0,139	-0,136	0,440	0,286
1 x 10 ⁵ UFC/flacon (/ml)	<i>Mycobacterium gordonae</i>	6/6	-0,143	0,139	-0,431	0,145	0,315
1 x 10 ⁴ UFC/flacon (/ml)	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	6/6	0,150	0,119	-0,095	0,395	0,220

		HCV negativ		HCV 45 UI/ml			
1 x 10 ⁴ UFC/flacon (/ml)	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	6/6	-0,173	0,119	-0,418	0,072	0,158
1 x 10 ⁵ UFC/flacon (/ml)	<i>Propionibacterium acnes</i>	6/6	0,042	0,119	-0,203	0,287	0,728
1 x 10 ⁵ UFC/flacon (/ml)	<i>Staphylococcus aureus</i>	6/6	0,133	0,119	-0,112	0,378	0,275
1 x 10 ⁵ UFC/flacon (/ml)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	6/6	-0,156	0,186	-0,539	0,227	0,409
5 x 10 ³ TCID ₅₀ /ml	Virusul varicelo-zosterian (Varicella-zoster virus, VZV)	6/6	-0,188	0,186	-0,571	0,195	0,321
1 x 10 ⁵ UI/ml	Virusul hepatitei B	6/6	-0,138	0,186	-0,521	0,245	0,464
1 x 10 ⁵ U/ml	HIV-1 IIB	6/6	0,042	0,186	-0,341	0,424	0,825
1 x 10 ⁵ UI/ml	HIV-2 NIH-Z	6/6	0,097	0,158	-0,241	0,434	0,551
1 x 10 ⁵ celule/ml	HPV16 CaSki	6/6	0,270	0,146	-0,035	0,575	0,080
1 x 10 ⁵ celule/ml	HPV18 HeLa	6/6	0,385	0,230	-0,093	0,864	0,109
1 x 10 ⁵ cp/ml	Virusul herpetic uman tip 6A GS	6/6	-0,436	0,170	-0,787	-0,085	0,017
1 x 10 ⁵ pv/ml	Virusul t-limfotrop ic uman tip 1	6/6	-0,154	0,170	-0,504	0,197	0,376
1 x 10 ⁵ pv/ml	Virusul t-limfotrop ic uman tip 2	6/6	0,209	0,230	-0,269	0,688	0,373
1 x 10 ⁵ U/ml-	Virusul encefalitei St. Louis	6/6	0,148	0,164	-0,190	0,486	0,376
1 x 10 ⁵ U/ml	Virusul West Nile NY 2001-6263	6/6	-0,018	0,164	-0,356	0,320	0,913
1 x 10 ⁵ U/ml	Virusul febrei galbene 17-D	6/6	0,208	0,230	-0,270	0,687	0,375
8,13 x 10 ⁴ U/ml	Virusul Zika MR 766	6/6	0,164	0,164	-0,174	0,501	0,328

Așa cum se arată în Tabel 17, nici unul dintre agenții patogeni testați nu a demonstrat reactivitate încrucișată cu *artus* HCV QS-RGQ Kit. Aceasta a fost definită ca o diferență ne semnificativă în log₁₀ UI/ml între rezultatele obținute din substanțele de control și din

probele HCV 45 îmbogățite cu agenți patogeni. În cazurile în care s-au observat diferențe semnificative, acestea au fost mai mici de 2 x SD totală a testului ($< 0,444 \text{ Log}_{10} \text{ UI/ml}$, Tabel 17). În plus, 100% din probele HCV-negative testate în prezența agenților patogeni au generat rezultate negative.

Substanțe de interferență

Testarea interferenței a demonstrat impactul substanțelor potențial interferente, care pot fi prezente în plasma umană EDTA, asupra performanței testului *artus* HCV QS-RGQ Kit. Ghidul Institutului pentru Standarde Clinice și de Laborator (Clinical & Laboratory Standards Institute, CSLI) EP7-A2 (8) a fost utilizat la elaborarea acestui studiu de testare a interferenței. În acest studiu, substanțele potențial interferente au fost medicamentele utilizate pentru tratamentul infecțiilor cu HCV (de exemplu, substanțe exogene, Tabel 18 și Tabel 19), precum și componente sanguine și hormoni (de exemplu, substanțe endogene, Tabel 20). Substanțele exogene au fost îmbogățite în probă la un nivel de trei ori mai mare decât nivelul maxim din plasmă (C_{max}) pentru medicamentul respectiv. Substanțele endogene au fost îmbogățite la concentrațiile date în Ghidul CSLI EP7-A2 (8). Interferența între substanțe a fost testată în plasma umană EDTA negativă pentru HCV și într-o matrice de probă negativă îmbogățită cu HCV la 45 UI/ml ($3 \times \text{LOD}$), utilizând ARN IVT încapsulat, reprezentativ pentru HCV genotipul 1a.

Zece probe diferite de substanțe exogene au fost îmbogățite în cele două concentrații experimentale diferite (HCV negativ și HCV îmbogățit la 45 UI/ml). Grupările de substanțe exogene s-au bazat pe tipul de solvent utilizat pentru resuspensie (Tabel 18).

Tabel 18. Substanțele exogene și grupările acestora, generate pentru testare

Probă/solvent de substanță exogenă utilizată pentru resuspensie		Substanțe exogene testate
DMSO	1	Boceprevir, efavirenz, emtricitabină, raltegravir, zidovudină
	2	Aciclovir, atazanavir, darunavir, fosamprenavir, indinavir
	3	Azitromicină, elbasvir, paritaprevir, saquinavir, tenofovir
	4	Claritromicină, ganciclovir, lopinavir, telaprevir
Apă fără nuclează	5	Abacavir, ciprofloxacină, enfurvitid, telbivudină, valganciclovir
	6	Adefovir, fluoxetină, interferon alfa 2a, interferon alfa 2b, stavudină
	7	Daclatasvir, didanozină, lamivudină, ribavirină, sofosbuvir
Etanol	8	Entecavir, grazoprevir, ombitasvir, paroxetină, zalcitabină (DMSO)
	9	Amprenavir, nelfinavir, simeprevir, tipranavir
	10	Ledipasvir, ritonavir, sertralină, valaciclovir
DMSO	nu se aplică	Nevirapină

DMSO: dimetilsulfoxid; N/A: nu se aplică.

Tabel 19. Statistici sumare pentru substanțele exogene testate

Diferența dintre substanța de control și substanța de interferență	Diferența în \log_{10} UI/ml mediu calculat	Eroare standard (SE)	Limită de încredere 95% inferioară	Limită de încredere 95% superioară	Valoare p
Grupul 1 - SUBSTANȚĂ DE CONTROL	0,148	0,203	-0,272	0,567	0,474
Grupul 2 - SUBSTANȚĂ DE CONTROL	0,286	0,213	-0,154	0,726	0,193
Grupul 3 - SUBSTANȚĂ DE CONTROL	0,068	0,213	-0,372	0,509	0,751
Grupul 4 - SUBSTANȚĂ DE CONTROL	0,302	0,203	-0,118	0,722	0,150
Grupul 5 - SUBSTANȚĂ DE CONTROL	0,029	0,195	-0,375	0,432	0,884
Grupul 6 - SUBSTANȚĂ DE CONTROL	0,250	0,195	-0,153	0,654	0,212
Grupul 7 - SUBSTANȚĂ DE CONTROL	0,170	0,195	-0,234	0,573	0,393
Grupul 8 - SUBSTANȚĂ DE CONTROL	0,307	0,204	-0,114	0,728	0,145
Grupul 9 - SUBSTANȚĂ DE CONTROL	0,006	0,183	-0,380	0,391	0,976
Grupul 10 - SUBSTANȚĂ DE CONTROL	0,174	0,192	-0,228	0,577	0,375
Nevirapină - SUBSTANȚĂ DE CONTROL	0,014	0,183	-0,371	0,399	0,940

SE: eroare standard.

Așa cum se arată în Tabel 19, nici una dintre substanțele exogene testate în acest studiu nu a demonstrat o diferență semnificativă în \log_{10} UI/ml în comparație cu probele de substanță de control (valoare $p > 0,05$). În plus, nu a existat nici o amplificare în probele negative pentru HCV atunci când aceste probe negative au fost îmbogățite cu o substanță exogenă sau cu un grup de substanțe (datele nu sunt prezentate).

Tabel 20. Statistici sumare pentru substanțele endogene

Diferența dintre substanța de control și substanța de interferență	Diferența în \log_{10} UI/ml mediu calculat	Eroare standard (SE)	Limită de încredere 95% inferioară	Limită de încredere 95% superioară	Valoare p
Trigliceride - SUBSTANȚĂ DE CONTROL	0,373	0,125	0,115	0,631	0,006
Bilirubină conjugată - SUBSTANȚĂ DE CONTROL	0,277	0,119	0,033	0,521	0,028
Hemoglobină - SUBSTANȚĂ DE CONTROL	0,297	0,119	0,053	0,541	0,019
Bilirubină neconjugată - SUBSTANȚĂ DE CONTROL	0,300	0,061	0,163	0,4370	< 0,001
EDTA - SUBSTANȚĂ DE CONTROL	0,005	0,144	-0,321	0,331	0,973
Globulină - SUBSTANȚĂ DE CONTROL	0,256	0,058	0,124	0,387	0,002
hDNA - SUBSTANȚĂ DE CONTROL	0,066	0,079	-0,112	0,244	0,425
hRNA - SUBSTANȚĂ DE CONTROL	0,019	0,171	-0,368	0,405	0,915
Albumină - SUBSTANȚĂ DE CONTROL	-0,080	0,162	-0,442	0,281	0,631

Tabel 20 arată că bilirubina conjugată și neconjugată, hemoglobina și globulina au fost statistic semnificativ diferite de probele de substanță de control ($p = 0,028$, $p < 0,001$, $p = 0,019$ și, respectiv, $p = 0,002$), dar diferența în \log_{10} UI/ml mediu calculat a fost de 0,277, 0,300, 0,297 și, respectiv, 0,256. Aceasta a însemnat că aceste substanțe au corespuns criteriilor de acceptare a studiului, $< 0,5 \log_{10}$ UI/ml. În plus, nu a existat nici o amplificare în probele negative pentru HCV atunci când aceste probe negative au fost îmbogățite cu substanțe endogene (datele nu sunt prezentate).

Contaminare încrucișată

Studiul de contaminare încrucișată a fost conceput pentru a testa contaminarea încrucișată între testările integrate QIASymphony SP/AS utilizând fluxul de lucru *artus* HCV QS-RGQ. Contaminarea încrucișată a fost definită drept cantitatea de analit transportată între godeuri adiacente în timpul testărilor automate. Transferul instrumentului, exprimat în procente, a fost calculat ca:

$$\left(\frac{\text{Numărul de probe negative unde ținta este detectată}}{\text{Numărul total de probe negative}} \right) \times 100$$

Acest studiu a fost efectuat folosind probe pozitive pentru HCV la concentrații relevante clinic (1×10^5 , 1×10^6 și 1×10^7 UI/ml). În diluții separate, un ARN IVT încapsulat, reprezentativ pentru HCV genotipul 1a, a fost diluat în plasmă EDTA pentru a furniza diferitele concentrații. Fiecare dintre aceste concentrații ale probelor a fost testată cu probe negative pentru HCV într-o ordine alternativă pentru cinci testări consecutive („testări tablă de șah”). Pentru fiecare concentrație s-a efectuat o testare finală (a șasea) pentru a determina contaminarea între testări. Proportia de contaminare încrucișată (transferul instrumentului definit mai sus) a fost calculată și rezultatul pentru fiecare concentrație este prezentat în Tabel 21 (de mai jos).

Tabel 21. Rata contaminării încrucișate la concentrații relevante din punct de vedere clinic

Concentrația probei în format „tablă de șah”	Frecvența contaminării încrucișate	Proportia contaminării încrucișate (%)
1×10^7 UI/ml	4/170	2,35
1×10^6 UI/ml	3/170	1,76
1×10^5 UI/ml	0/170	0,00

Performanță clinică

Performanța clinică a *artus* HCV QS-RGQ Kit a fost evaluată în timpul unui studiu comparativ efectuat la două laboratoare clinice din Regatul Unit, care au testat 452 de probe de la pacienți individuali, care au fost și negative pentru HCV. Probele au fost testate utilizând *artus* HCV QS-RGQ Kit într-un laborator clinic obișnuit și probele au reflectat tendințele epidemiologice actuale ale HCV la populația europeană testată. Probele clinice ale anumitor genotipuri (4, 5 și 6) au fost obținute comercial pentru a atinge acoperirea completă a genotipurilor 1-6 HCV curențe.

În acest studiu, probele de la pacienți au fost testate cu *artus* HCV QS-RGQ Kit și au fost comparate cu rezultatele generate anterior sau în paralel ale unui test comparativ cu marcaj CE. A fost efectuată o analiză de regresie Deming și Passing-Bablok cu rezultatele testării din *artus* HCV QS-RGQ Kit pe axa y și rezultatul testării pentru testul comparativ pe axa x. Au fost raportate estimările parametrilor, împreună cu SE-urile și cu CI-urile 95% corespunzătoare. Analiza de regresie a fost efectuată incluzând toate probele între LLOQ și limita superioară de cuantificare (upper limit of quantification, ULOQ) pentru ambele teste (n = 165, Figura 2).

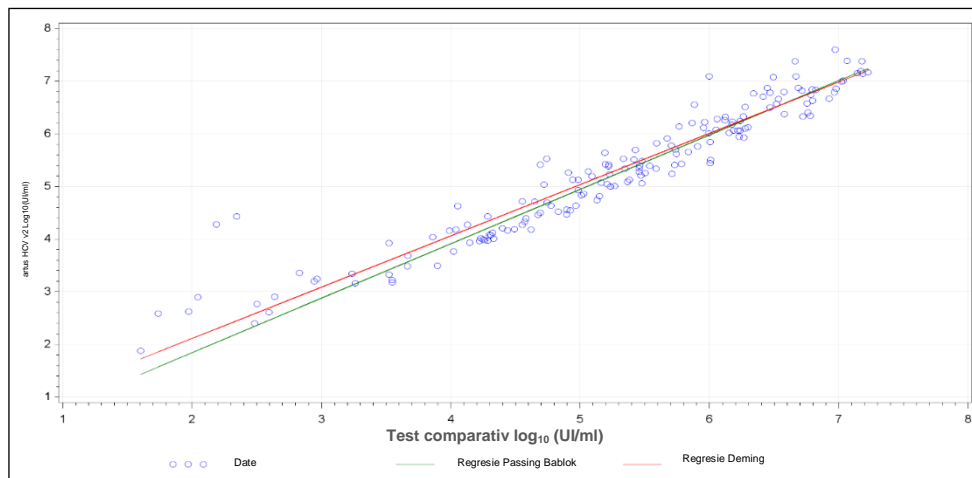


Figura 2: Reprezentare grafică de regresie cu linii Passing-Bablok și Deming (n = 165).

Tabel 22. Analiza de regresie pentru *artus HCV QS-RGQ Kit* și un test comparativ

Testare	Log ₁₀ (UI/ml) variabil de răspuns	Log ₁₀ (UI/ml) variabil explicativ	Nr. de obser- vații	Inter- secție	Inter- secție limită de încre- dere 95% bilate- rală infe- rioră	Inter- secție limită de încre- dere 95% bilate- rală supe- rioră	Pantă	Pantă limită de încre- dere 95% bilaterală infe- rioră	Pantă limită de încre- dere 95% bilaterală supe- rioră
Deming	<i>artus HCV QS-RGQ Kit</i>	Test comparativ	165	0,164	-0,190	0,519	0,974	0,912	1,036
Passing-Bablok	<i>artus HCV QS-RGQ Kit</i>	Test comparativ	165	-0,222	-0,448	0,028	1,033	0,990	1,072

Nr.: număr.

Tabel 22 arată că atât pentru Deming, cât și pentru Passing-Bablok, intersecția este aproape de zero (0,164 și, respectiv, -0,222), iar panta este aproape de 1 (0,974 și, respectiv, 1,033). Aceasta demonstrează o corelare generală strânsă între *artus* HCV QS-RGQ Kit și testul comparativ.

Limitări

- Respectarea strictă a manualului de utilizare este obligatorie pentru rezultatele optime ale PCR.
- Trebuie acordată atenție datelor de expirare tipărite pe cutia și pe etichetele de pe toate componentele. Nu utilizați componente expirate.
- Probele fibrinoase sau probele care prezintă alte semne de acumulare a cheagurilor pot înfunda vârful pipetelor și pot genera rezultate false, din cauza transferului insuficient de volum în timpul procesului de preparare a probelor.
- Deși rare, mutațiile din regiunile extrem de conservate ale genomului HCV acoperite cu soluțiile de amorsare și/sau cu sonda kitului pot duce la cuantificarea insuficientă a încărcării virale sau la nereușită în detecția prezenței HCV în probele afectate.
- Produsul este destinat utilizării de către utilizatori profesioniști, cum ar fi tehnicieni și medici care sunt instruiți în procedurile de diagnosticare in vitro.

Controlul calității








În conformitate cu sistemul de management al calității certificat ISO al QIAGEN, fiecare lot de *artus* HCV QS-RGQ Kit este testat pentru specificațiile prestabilite, pentru a asigura calitatea consecventă a produsului.








Referințe

1. Polaris Observatory HCV Collaborators (2017) Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study; *Lancet Gastroenterol. Hepatol.*, **2**, 161.
2. European Association for Study of the Liver (2018). EASL recommendations on treatment of Hepatitis C 2018. *J. Hepatol.*, [Epub ahead of print].
3. European Association for Study of the Liver and Asociacion Latinoamericana para el Estudio del Hígado (2015). EASL-ALEH Clinical Practice Guidelines: Non-invasive tests for evaluation of liver disease severity and prognosis. *J. Hepatol.*, **63**, 237.
4. Harrington, P.R., Zeng, W., and Naeger, L.K. (2012) Clinical relevance of detectable but not quantifiable hepatitis C virus RNA during boceprevir or telaprevir treatment. *Hepatology* **55**, 1048.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Guideline EP17-A2, Vol. 32 No. 8, Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures, Approved Guideline – Second Edition 2012.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Guideline EP06-A, Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline 2003.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Guideline EP05-A3, Evaluation of Precision of Quantitative Measurement Procedures; Approved Guideline – Third Edition 2014.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Guideline EP7-A2, Vol. 25 No. 27, Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Edition – Second Edition 2005.

Simboluri

Simbolurile din tabelul următor sunt utilizate în aceste instrucțiuni de utilizare.

Simbol	Definiția simbolului
 72	Conținut suficient pentru 72 de teste
	Diagnosticare in vitro
	Marcaj CE
	Număr catalog
	Număr de lot
	Număr material
	Componente

Simbol	Definiția simbolului
	Conține
	Substanță de control internă
	Număr de comercializare global articol
Rn	R reprezintă revizuirea Instrucțiunilor de utilizare (manual), iar n este numărul revizuirii
	Limitări de temperatură
	Producător
	Data de expirare
	Consultați instrucțiunile de utilizare

Ghid de remediere a problemelor

Consultați această secțiune pentru gestionarea erorilor și remedierea oricăror probleme care ar putea apărea în legătură cu *artus* HCV QS-RGQ Kit. Dacă etapele recomandate nu rezolvă problema, contactați Serviciile Tehnice QIAGEN pentru asistență, fie prin intermediul Centrului nostru pentru Asistență Tehnică, la www.qiagen.com/support, apelând numărul de telefon 00800-22-44-6000, sau contactând unul dintre Departamentele noastre de Servicii Tehnice QIAGEN sau distribuitorii locali.

Posibilă problemă sau cauză	Acțiune corectivă
Gestionare generală	
Mesaj de eroare afișat pe ecranul tactil	Dacă în timpul executării protocolului este afișat un mesaj de eroare, consultați manualele de utilizare furnizate împreună cu instrumentele dumneavoastră.
Precipitat în compartimentul cu reactivi al cartușului deschis al QIASymphony DSP Virus/Pathogen Kit	
a) Evaporarea soluției tampon	Evaporarea excesivă poate duce la creșterea concentrației sărurilor sau la scăderea concentrațiilor de alcool din soluțiile tampon. Eliminați cartușul cu reactivi (RC). Atunci când nu se utilizează pentru purificare, asigurați-vă că sigilați compartimentele cu soluții tampon ale unui cartuș cu reactivi (RC) parțial folosit cu benzile de sigilare pentru reutilizare.

Posibilă problemă sau cauză	Acțiune corectivă
b) Depozitarea cartușului cu reactivi (RC)	Depozitarea cartușului cu reactivi (RC) la temperaturi mai mici de 15 °C poate determina formarea de precipitate. Dacă este necesar, scoateți compartimentele care conțin soluțiile tampon QSL2 și QSB1 din cartușul cu reactivi (RC) și introduceți-le în incubator la bain-marie* la 37 °C timp de 30 de minute, agitându-le ocazional pentru dizolvarea precipitatului. Asigurați-vă că reșezați compartimentele în pozițiile corecte. În cazul în care cartușul cu reactivi (RC) este deja perforat, asigurați-vă că ați închis din nou compartimentele cu benzi de sigilare pentru reutilizare și introduceți în incubator întregul cartuș cu reactivi (RC) la bain-marie* la 37 °C timp de 30 de minute, agitându-l ocazional.
Cantitatea de acizi nucleici obținută este redusă	
a) Particulele magnetice nu au fost resuspendate complet	Înainte de începerea procedurii, asigurați-vă că particulele magnetice sunt complet resuspendate. Vortexați timp de cel puțin 3 minute înainte de utilizare.
b) Probele congelate nu au fost amestecate corect după decongelare	Decongețați probele congelate agitându-le ușor, pentru a vă asigura că sunt amestecate complet
c) Nu fost adăugat ARN de transport (CARRIER)	Reconstituiți ARN-ul de transport (CARRIER) în soluție tampon AVE (AVE) și amestecați-l cu volumul corespunzător de soluție tampon AVE (AVE) conform indicațiilor din secțiunea relevantă de mai sus Repetați procedura de purificare cu probe noi.
d) Acizi nucleici degradați	Probele au fost depozitate incorect sau au trecut prin mai multe cicluri de congelare-decongelare. Repetați procedura de purificare cu probe noi.

* Asigurați-vă să instrumentele au fost verificate, întreținute și calibrate cu regularitate, conform cu instrucțiunile producătorului.

Posibilă problemă sau cauză	Acțiune corectivă
e) Liza incompletă a probelor	Înainte de utilizare, verificați dacă soluțiile tampon QSL2 și QSB1 conțin precipitate. Dacă este necesar, scoateți compartimentele care conțin soluțiile tampon QSL1 și QSB1 din cartușul cu reactivi (RC) și introduceți-le în incubator timp de 30 de minute la 37 °C, agitându-le ocazional pentru dizolvarea precipitatului. În cazul în care cartușul cu reactivi (RC) este deja perforat, verificați compartimentele să fie închise din nou cu benzi de sigilare pentru reutilizare și introduceți în incubator întregul cartuș cu reactivi (RC) timp de 30 de minute la 37 °C, agitându-l ocazional la bain-marie.*
f) Înfundarea vârfului pipetei din cauza materialelor insolubile	Materialele insolubile nu au fost extrase din probă înainte de a începe procedura de purificare QIASymphony. Pentru a extrage materialele insolubile pentru aplicații virale, centrifugați proba la 3000 x g timp de 1 minut și transferați lichidul supernatant într-o eprubetă nouă pentru probe.

QIASymphony AS detectează Master insuficient

În eprubetă nu a fost transferat volumul de Master necesar

Combinați volumul necesar al fiecărui reactiv într-o singură eprubetă și introduceți-o în QIASymphony. Reactivii vâscoși pot fi dificil de manevrat cu pipetele manuale. Asigurați-vă că ați transferat întregul volum de Master în eprubetă.

Pentru reactivii vâscoși, recomandăm aspirarea unui volum suplimentar de 5% atunci când utilizați pipetele manuale (de exemplu, ajustați pipeta la 840 µl pentru un volum de 800 µl).

Alternativ, după distribuirea lentă a lichidului și suflare în peretele eprubetei țintă, scoateți vârful din lichid, eliberați pistonul pipetei și așteptați încă 10 secunde. Lichidul rezidual va curge pe vârful și poate fi suflat prin apăsarea pistonului pipetei pentru a doua oară. Utilizarea vârfulor cu filtru clasa PCR etichetate ca „reținere redusă” poate îmbunătăți recuperarea lichidului.

Posibilă problemă sau cauză**Acțiune corectivă****Nu există semnal cu substanțe de control pozitive (Virusul hep. C RG QS 1–4) în canalul de fluorescență Cycling Green**

- | | |
|--|---|
| a) Canalul de fluorescență selectat pentru analiza datelor PCR nu respectă protocolul | Pentru analiza datelor selectați canalul de fluorescență Cycling Green pentru PCR HCV analitică și canalul de fluorescență Cycling Orange pentru PCR cu substanță de control internă. |
| b) Programarea incorectă a profilului de temperatură al instrumentului Rotor-Gene Q | Comparați profilul de temperatură cu protocolul. Consultați secțiunile relevante din acest manual referitoare la parametrii ciclurilor Rotor-Gene Q (consultați Tabel 3 și secțiunea „Setări ale analizei” de la pagina 35) |
| c) Configurarea incorectă a PCR | Asigurați-vă că a fost efectuată corect configurarea testului și că au fost folosiți parametri corecți ai testului (consultați Tabel 2). Repetați PCR, dacă este necesar |
| d) Condițiile de depozitare pentru una sau mai multe componente ale kitului nu au respectat instrucțiunile din „Depozitarea și manipularea reactivilor” de la pagina 16) | Verificați condițiile de depozitare și data de expirare (consultați eticheta kitului) ale reactivilor și utilizați un kit nou, dacă este necesar. |
| e) <i>artus</i> HCV QS-RGQ Kit a expirat | Verificați condițiile de depozitare și data de expirare (consultați eticheta kitului) ale reactivilor și utilizați un kit nou, dacă este necesar. |

Semnal slab sau lipsă al substanței de control interne a unei probe de plasmă slab pozitivă la HCV, supusă purificării utilizând QIASymphony DSP Virus/Pathogen Kit în canalul de fluorescență Cycling Orange

- | | |
|--|---|
| a) Condițiile PCR nu respectă protocolul | Verificați condițiile PCR (a se vedea mai sus) și repetați PCR cu setările corectate, dacă este necesar. |
| b) PCR a fost inhibată | Asigurați-vă că utilizați metoda de izolare validată (consultați „Protocol: Izolarea ARN-ului și configurarea testului pe QIASymphony SP/AS” de la pagina 22) și urmați îndeaproape instrucțiunile. |

Posibilă problemă sau cauză	Acțiune corectivă
c) ARN-ul s-a pierdut în timpul extracției	Un semnal absent al substanței de control interne poate indica pierderea ARN-ului în timpul extracției. Asigurați-vă că utilizați metoda de izolare validată (consultați „Protocol: Izolarea ARN-ului și configurarea testului pe QIASymphony SP/AS” de la pagina 22) și urmați îndeaproape instrucțiunile. De asemenea, consultați „Cantitatea de acizi nucleici obținută este redusă” de mai sus.
d) Condițiile de depozitare pentru una sau mai multe componente ale kitului nu au respectat instrucțiunile din „Depozitarea și manipularea reactivilor” de la pagina 16)	Verificați condițiile de depozitare (consultați eticheta kitului) ale reactivilor și utilizați un kit nou, dacă este necesar.
e) <i>artus</i> HCV QS-RGQ Kit a expirat	Verificați condițiile de depozitare și data de expirare (consultați eticheta kitului) ale reactivilor și utilizați un kit nou, dacă este necesar.

Semnale cu substanțe de control negative în canalul de fluorescență Cycling Green al PCR analitic

a) A avut loc contaminarea în timpul pregătirii PCR	Evaporarea excesivă poate duce la creșterea concentrației sărurilor sau la scăderea concentrațiilor de alcool din soluțiile tampon. Eliminați cartușul cu reactivi (RC). Atunci când nu se utilizează pentru purificare, asigurați-vă că sigilați compartimentele cu soluții tampon ale unui cartuș cu reactivi (RC) parțial folosit cu benzile de sigilare pentru reutilizare.
b) A avut loc contaminarea în timpul extracției	Repețiți extracția și PCR ale probei care urmează să fie testată folosind reactivi noi. Asigurați-vă că spațiul de lucru și instrumentele sunt decontaminate la intervale regulate.

Informații pentru comandă

Produs	Cuprins	Nr. cat.
<i>artus</i> HCV QS-RGQ Kit	Pentru 72 de reacții: Master A și B, substanță de control internă, standardele de cuantificare a virusului hepatitei C 1-4, (virusul hepatitei C RG QS 1-4) și apă clasa PCR	4538366
Produse asociate		
QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit (96)	Include 2 cartușe cu reactivi și stativă pentru enzime și accesorii	937055
QIASymphony SP	Modul de preparare a probelor QIASymphony; 1 an garanție pentru componente și manoperă	9001297
QIASymphony AS	Modul de configurare a testelor QIASymphony; 1 an garanție pentru componente și manoperă	9001301
Rotor-Gene Q Software versiunea 2.3 sau mai recentă	Software pentru testare de rutină împreună cu instrumentele Rotor-Gene Q și QIASymphony RGQ	9023241
Rotor-Gene Q MDx Cycler	Ciclator pentru PCR în timp real și analizor topire la înaltă rezoluție cu (high resolution melt, HRM) 5 canale (verde, galben, portocaliu, roșu, roșu aprins) plus canal HRM, laptop, software, accesorii: include garanție de 1 an pentru componente și manoperă, instalarea și instruirea nu sunt incluse	9002032

Istoricul reviziilor documentului	
R2 01/2019	Valoarea R ² actualizată în tabelul 7 de la ≥ 0.980 la ≥ 0.990 . Date de performanță lipsă adăugate în tabelul 15 Figura 2 și Tabelul 22 actualizate cu date noi

Acord de licență limitată pentru *artus* HCV QS-RGQ Kit

Utilizarea acestui produs înseamnă acceptarea următorilor termeni de către orice cumpărător sau utilizator al produsului:

1. Produsul poate fi utilizat doar în conformitate cu protocoalele furnizate împreună cu produsul și prezentul manual și doar împreună cu componentele incluse în kit. QIAGEN nu acordă nicio licență pentru niciuna dintre proprietățile sale intelectuale în vederea utilizării sau încorporării componentelor incluse în acest kit cu orice componentă care nu este inclusă în acest kit, dacă nu este precizat astfel în protocoalele furnizate împreună cu produsul, în prezentul manual și în protocoalele suplimentare disponibile la adresa www.qiagen.com. Unele dintre aceste protocoale suplimentare au fost furnizate de utilizatorii QIAGEN pentru utilizatorii QIAGEN. Aceste protocoale nu au fost testate riguros sau optimizate de QIAGEN. QIAGEN nu le garantează și nici nu asigură faptul că acestea nu încalcă drepturile terților.
2. În afară de licențele acordate în mod explicit, QIAGEN nu garantează sub nicio formă că acest kit și/sau utilizarea (utilizările) acestuia nu încalcă drepturile terților.
3. Acest kit și componentele sale sunt licențiate pentru o singură utilizare și nu pot fi reutilizate, recondiționate sau revândute.
4. QIAGEN declină în mod specific orice licențe, explicite sau implicite, altele decât cele declarate în mod explicit.
5. Cumpărătorul și utilizatorul kitului acceptă să nu ia măsuri și să nu permită niciunei persoane să ia măsuri care ar putea conduce la sau facilita oricare dintre acțiunile interzise prezentate mai sus. QIAGEN poate pune în aplicare interdicțiile din acest Acord de licență limitată în orice instanță și va recupera toate costurile anchetelor și cheltuielile de judecată, inclusiv onorariile avocaților, în orice acțiune pentru aplicarea acestui Acord de licență limitată sau a oricăruia dintre drepturile sale de proprietate intelectuală legate de kit și/sau componentele acestuia.

Pentru termenii actualizați ai licenței, consultați www.qiagen.com.

Achiziționarea acestui produs îi permite cumpărătorului să îl utilizeze pentru a efectua servicii de diagnosticare pentru diagnosticare in vitro la om. Nu se acordă niciun brevet general sau nicio altă licență, de altă natură, decât acest drept specific de utilizare de la cumpărare.

HB-2556-002 1115368 01/2019

© 2019 QIAGEN, toate drepturile rezervate.

Pentru comenzi www.qiagen.com/contact | Suport tehnic support.qiagen.com | Site web www.qiagen.com