

BIOLOGIA MOLECOLARE

VER 4 – 29/11/2017

REF AC004/24

24 TEST

CND W0105020309

AMPLIFICAZIONE: AA910/48, AA896/24 o AA896/48
ESTRAZIONE: AA1318 NON COMPRESA

GEN-C 2.0

Ibridazione inversa su striscia

CE

0459

IVD



NUCLEAR LASER MEDICINE S.r.l.
UFFICI OPERATIVI: Viale delle Industrie, 3 – 20090 SETTALA MI (Italy)
Tel (+39) 02/95. 24. 51 - Fax (+39) 02/95. 24. 52. 37
SITO INTERNET: www.nlm.it – E-MAIL: segreteria@nlm.it

UTILIZZO

Gen-C 2.0 è un saggio ad ibridazione inversa su striscia che permette la genotipizzazione del virus dell'epatite C. Il test consente di genotipizzare i genotipi e sottotipi virali più comuni, identificandoli sulla base delle variazioni trovate nelle regioni 5' non tradotta (5' UTR) e Core del genoma di HCV.

Il kit prevede l'utilizzo di campioni amplificati con i dispositivi cod. NLM AA910/48, AA896/24 o AA896/48.

Al fine di ottenere risultati ottimali utilizzare esclusivamente campioni con titolo compreso tra 2×10^3 e 1×10^7 (se necessario diluire il plasma dei campioni con titolo $>1 \times 10^7$ prima dell'estrazione di RNA).

⇒ Sulla base di analisi *in silico* il saggio è in grado di distinguere i genotipi 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 e i sottotipi 1a, 1b, 2a/2c, 2b, 3a, 3b, 3c, 3k, 4a, 4b, 4c/4d, 4e, 4f, 4h, 5a, 6a/6b, 6g, 6m, 6t e 7a.

I risultati ottenuti con il presente kit devono essere intesi come guida nella selezione di tipologia e durata della terapia antivirale in soggetti con infezione cronica da HCV. Il dispositivo pertanto non va utilizzato come test di screening per la presenza di HCV RNA o come test di conferma per la diagnosi di infezione da HCV.

⇒ INTRODUZIONE

Un elevato numero di pazienti affetti da HCV sviluppa un'epatite cronica che spesso progredisce in cirrosi epatica e talvolta in carcinoma epatocellulare (1). Il genoma di HCV è costituito da un singolo filamento di RNA di circa 9400 nucleotidi. I domini Core, Envelope e Non Strutturale costituiscono la regione codificante del genoma fiancheggiata, in corrispondenza delle estremità 5' e 3', da regioni non tradotte (UTR) altamente conservate.

L'attuale nomenclatura internazionale proposta da Simmonds nel 2005 (2), prevede la classificazione del virus in genotipi, differenti nella sequenza nucleotidica per il 31-33%, e sottotipi, che differiscono del 20-25%.

Ad oggi sono stati identificati 7 genotipi e 67 sottotipi : dall'1a all'1l, dal 2a al 2r, dal 3a al 3k (che in passato corrispondeva al genotipo 10a), dal 4a al 4w, 5a, 6a-v e 7a (3).

La regione 5'UTR contiene regioni variabili tra i diversi genotipi che permettono la corretta distinzione dei genotipi 2-5, 6a-b e 7a, ma non distingue in modo accurato il genotipo 1 dal 6 ed i sottotipi 1a e 1b. L'analisi della regione Core, oltre alla 5'-UTR, ha permesso la discriminazione dei genotipi 1 e 6 e di migliorare l'accuratezza della sottotipizzazione 1a-1b (4-5).

Trattamento con interferone alfa

Diversi studi clinici hanno dimostrato che i vari genotipi di HCV rispondono in modo differente alla terapia interferonica. In particolare le infezioni attribuite ai genotipi 1b mostrano una percentuale di non responder molto alta (90%), mentre i genotipi 1a, 2a, 2b e 3a hanno una percentuale di risposta a lungo termine più alta, che va dal 50 all'80% dei casi. Al genotipo 1b viene inoltre associata una più rapida evoluzione della malattia verso forme più severe di epatite cronica severa, cirrosi ed epatocarcinoma (6).

L'impiego di nuovi farmaci (DAA), congiuntamente all'Interferone alfa, ha incrementato le opzioni terapeutiche e farmacologiche disponibili per ogni genotipo (7-8).

Da queste premesse si evince come la genotipizzazione di HCV sia uno dei parametri diagnostici utili ad una corretta e più efficace impostazione dei protocolli terapeutici.




⇒ BIBLIOGRAFIA

1. Sarrazin C. *Diagnosis of hepatitis C: update 2004. Journal of Gastroenterology and Hepatology (2004) 19, S88-S93*
2. Simmonds et al. *Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. Hepatology, vol. 42, n° 4, 2005.*
3. Smith et al. *Expanded Classification of Hepatitis C Virus Into 7 Genotypes and 67 Subtypes: Updated Criteria and Genotype Assignment Web Resource HEPATOLOGY, Vol. 59, No. 1, 2014*
4. P.T. Hrabec et al. *Comparative analysis of hepatitis C virus phylogenies from coding and non-coding regions: the 5' untranslated region (UTR) fails to classify subtypes. Virology Journal 2006, 3:103*
5. M. A. Ansari et al. *HCV-Core Region: Its Significance in HCV-Genotyping and Type Dependent Genomic Expression. Macedonian Journal of Medical Sciences. 2012 Mar 15; 5(1):30-39.*
6. Nizar N. Zein. *Clinical Significance of Hepatitis C Virus Genotypes. Clinical Microbiology Reviews, Apr. 2000, p.223-235.*
7. *EASL Clinical Practice Guidelines: Recommendation on treatments of hepatitis C. Journal of Hepatology 2016.*
8. Falade-Nwulia et al. *Oral Direct-Acting Agent Therapy for Hepatitis C Virus Infection A Systematic Review Annals of Internal Medicine Vol. 166 No. 8 18 April 2017*

PRINCIPIO DEL METODO

Il test si basa sul principio dell'ibridazione inversa su striscia. Gli amplificati biotinilati, ottenuti dalla retrotrascrizione e amplificazione delle regioni 5'UTR e Core di HCV RNA, sono ibridati alle sonde specifiche legate al supporto di nitrocellulosa attraverso una coda di poliT. Gli ibridi biotinilati sono successivamente rivelati utilizzando la streptavidina coniugata con fosfatasi alcalina, mentre gli amplificati non ibridati vengono rimossi in seguito a lavaggi. In seguito il substrato (BCIP/NBT) reagisce con il complesso streptavidina-fosfatasi alcalina formando un precipitato scuro e colorando le bande specifiche sulla striscia.

COMPOSIZIONE DEL PRODOTTO

Reagenti (+2/+8° C)			Codice NLM	Quantità	N° Vial
Strisce Membrana di nitrocellulosa rivestita con oligonucleotidi		-	KC029	24	1
DNAT Soluzione denaturante contenente NaOH	 PERICOLO	H314, P280, P301+P330+P331, P303+P361+P353, P305+P351+P338	KA107	1 ml	1
Ibridazione (*) Soluzione salina contenente conservanti	 ATTENZIONE	H319, EUH208, P280, P305+P351+P338, P337+P313	KA102	60ml	1
Lavaggio Stringente Soluzione salina contenente detergenti e conservanti	-	-	KA928	175 ml	1
Coniugato Soluzione contenente streptavidina marcata con fosfatasi alcalina, stabilizzanti e conservanti	-	-	KA574	60 ml	1
Lavaggio B Soluzione salina contenente conservanti	-	EUH208	KA105-1	175 ml	1
Sviluppatore di colore Soluzione contenente 5-bromo-4-cloro3-indolil-fosfato e 4-nitro blu di tetrazolio	-	-	AA564	60 ml	1
Vaschette Supporti in plastica	-	-	DC000	3	
Mascherina interpretativa Foglio utilizzato per individuare le bande positive su una striscia	-	-	-	1	
Collector sheet Fogli da usare per l'archiviazione delle strisce; non adatto all'interpretazione dei risultati e/o alla refertazione	-	-	-	1	
Tabella interpretativa Foglio che fornisce le tipologie di bande per l'identificazione dei genotipi	-	-	-	1	

(*) L'esenzione dalle prescrizioni in materia di etichettatura e imballaggio è stabilita per quantità e gravità di pericolo del reagente. I criteri sono: **quantità <125 ml e categorie di pericolo non gravi (rif. Regolamento (CE) N° 1272/2008 - elenco 1.5.2.1.1).**

STABILITÀ E CONSERVAZIONE

- Tutti i reagenti chiusi o aperti sono stabili fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta se conservati alla temperatura indicata.
- Alla fine di ogni seduta riporre i reagenti alla corretta temperatura.
- Tenere il kit lontano da fonti di contaminazione quali RNA, cDNA o DNA amplificato.
- Le strisce sviluppate devono essere protette dall'esposizione alla luce solare e tenute a temperatura ambiente (+15/+30° C).
- La DNAT deve essere chiusa immediatamente dopo l'uso.

PRECAUZIONI

- La procedura va eseguita da personale competente utilizzando le buone pratiche di laboratorio ed i comuni dispositivi di protezione individuale.
- L'utilizzo delle seguenti soluzioni permette di ridurre al minimo il rischio di contaminazione crociata:

✓ Separare fisicamente le tre aree di lavoro:

- Zona 1: pre-PCR (manipolazione dei campioni ed estrazione)
- Zona 2: preparazione della Master Mix e aggiunta del campione estratto alle reazioni di RT-PCR
- Zona 3: post PCR (Real Time PCR)

Ogni area deve essere rifornita di attrezzatura e consumabili dedicati (camici da laboratorio, centrifughe, pipette, provette, etc).

Il flusso di lavoro deve procedere in modo unidirezionale dalla zona 1 alla zona 3. Ciò significa che tutti i consumabili e i DPI (camici, guanti, occhiali, etc.) che sono stati portati nella zona 3 (post PCR) non devono mai essere riportati nella zona pre-PCR senza essere stati decontaminati.

- ✓ Assicurarsi che al termine della procedura le superfici di lavoro e gli strumenti utilizzati vengano regolarmente decontaminati con candeggina diluita al 5-10% (la concentrazione finale di ipoclorito di sodio deve essere 0,5% w/v). Preparare la soluzione di candeggina fresca ogni giorno.
- ✓ Tutti i consumabili (puntali e provette) devono essere privi di DNAsi ed RNAsi. I puntali devono avere il filtro per evitare la contaminazione delle pipette. Sostituire i puntali dopo ogni trasferimento di liquido.
- ✓ Cambiare i guanti frequentemente
- Smaltire il materiale utilizzato secondo i regolamenti locali e nazionali vigenti
- Non mangiare, bere, fumare o applicare cosmetici nelle aree preposte all'esecuzione del test.
- Se vi è esposizione di occhi, cute o mucose alle sostanze utilizzate, lavare abbondantemente con acqua e contattare al più presto un medico.
- Non utilizzare reagenti scaduti.
- Non mischiare reagenti di lotti diversi.
- Non utilizzare il kit se la confezione è danneggiata. Contattare il fornitore.
- Le vaschette possono essere riutilizzate al massimo 2 volte, se ben lavate con candeggina e poi acqua al termine della rivelazione.
- Le strisce non utilizzate sono stabili fino alla data di scadenza se tenute a +2/+8° C e protette dall'esposizione alla luce.
- E' opportuno assicurare una temperatura il più possibile costante ed uniforme in laboratorio ed evitare di posizionare gli strumenti in prossimità di fonti di calore/raffreddamento che possano comprometterne il corretto funzionamento.
- **Usare la mascherina interpretativa specifica per ogni lotto.**

- **Indicazioni di pericolo**

- **H314:** Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari.
- **H319:** Provoca grave irritazione oculare.

- **Consigli di prudenza**

- **P280:** Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/Proteggere il viso.
- **P301+P330+P331:** IN CASO DI INGESTIONE: sciacquare la bocca. NON provocare il vomito.
- **P303+P361+P353:** IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE (o con i capelli): togliersi di dosso immediatamente tutti gli indumenti contaminati. Sciacquare la pelle/fare una doccia.
- **P305+P351+P338:** IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare
- **P337+P313:** Se l'irritazione degli occhi persiste, consultare un medico.

- **Informazioni supplementari di pericolo**

- **EUH208:** Contiene Kathon. Può provocare una reazione allergica (pelle).

CONSERVAZIONE DEGLI AMPLIFICATI

Gli amplificati ottenuti con i dispositivi AA910/48, AA896/24 o AA896/48 devono essere congelati a -25/-15° C se non utilizzati in giornata, altrimenti possono essere riposti a +2/+8° C.

MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

- Puntali e pipette dedicate
- Pinzette pulite per maneggiare le strisce

Processazione manuale:

- Bagnomaria con coperchio inclinato, agitazione (50-100 rpm) e programmabile a 46°C ± 0,5° C
- Termometro calibrato
- Acqua distillata o deionizzata
- Sistema di aspirazione
- Timer

⇒ Processazione automatica:

- Tecan ProfiBlot 48 o strumento equivalente. Per informazioni specifiche sulla procedura da applicare contattare la Nuclear Laser Medicine.

PROCEDIMENTO

RIVELAZIONE IN MANUALE

- Regolare il livello dell'acqua nel bagnomaria in modo che raggiunga circa 2/3 dell'altezza della vaschetta.
- Impostare la temperatura a **46° C** e verificare che rientri nell'intervallo indicato ($46^{\circ} \text{ C} \pm 0,5^{\circ} \text{ C}$) utilizzando un termometro calibrato.
- Preriscaldare l'Ibridazione ed il Lavaggio Stringente a **46° C**; assicurarsi che il precipitato eventualmente presente sia completamente sciolto prima dell'utilizzo.
- Lasciar equilibrare a temperatura ambiente il DNAT, il Coniugato, il Lavaggio B e lo Sviluppatore di colore.
- Prelevare una striscia per ciascun campione utilizzando le pinzette (non toccare mai le strip senza guanti) e contrassegnarla utilizzando una matita (non usare penne a sfera, etc).
Attenzione: non far seccare le strisce durante l'intera procedura.

Ibridazione (46° C)

- Dispensare in ciascuna vaschetta del vassoio **10 µl** di **DNAT**.
Attenzione: non utilizzare il DNAT se non si presenta di colore blu.
- Per ciascun campione aggiungere **10 µl** di **amplificato** e miscelare bene con la pipetta: la soluzione rimarrà blu.
- Incubare per **5 minuti** a temperatura ambiente.
- Aggiungere ad ogni campione **1 ml** di **Ibridazione** (preriscaldata a 46° C) ed agitare leggermente: il colore blu scompare.
- Immergere completamente ciascuna striscia nella lane della vaschetta contenente il rispettivo amplificato. Fare attenzione a mettere le strisce con le marker lines rivolte verso l'alto.
- Incubare per **30 minuti** a **46° C** nel bagnomaria mantenendo le strisce in agitazione (50 rpm circa). Tenere il bagnomaria chiuso con un coperchio per evitare variazioni di temperatura.

Lavaggio Stringente (46° C)

- Rimuovere la vaschetta dal bagnomaria; inclinarlo leggermente ed aspirare l'Ibridazione utilizzando una pipetta o un sistema di aspirazione a vuoto. Aspirare il liquido cercando di non danneggiare le strisce.
- Aggiungere ad ogni campione **1 ml** di **Lavaggio Stringente** (preriscaldato a 46° C) ed agitare a mano per qualche secondo.
- Aspirare ed aggiungere **1 ml** di **Lavaggio Stringente** (preriscaldato a 46° C).
- Incubare per **15 minuti a 46° C** nel bagnomaria in agitazione (50 rpm circa).
Attenzione: riporre il Lavaggio Stringente nel bagnomaria durante l'incubazione.
- Aspirare ed aggiungere **1 ml** di **Lavaggio Stringente** (preriscaldato a 46° C).
- Incubare per **15 minuti a 46° C** nel bagnomaria in agitazione (50 rpm circa).
- Aspirare la soluzione.

Sviluppo del colore (temperatura ambiente)

Tutte le successive incubazioni vengono effettuate a temperatura ambiente e con agitazione. Poiché l'acqua del bagnomaria impiega troppo tempo a scendere da 46°C alla temperatura ambiente, utilizzare la sola funzione di agitazione isolando le vaschette dall'acqua ad esempio adagiando una tavoletta di polistirolo sul coperchio del bagnomaria.

- Aggiungere **1 ml** di **Coniugato**.
- Incubare per **15 minuti** a temperatura ambiente mantenendo le strisce in agitazione (50 rpm circa).
- Aspirare il liquido, aggiungere **1 ml** di **Lavaggio B** ed agitare a mano per qualche secondo.
- Aspirare ed aggiungere **1 ml** di **Lavaggio B**.
- Incubare per **5 minuti** a temperatura ambiente in agitazione (50 rpm circa).
- Aspirare ed aggiungere **1 ml** di **Lavaggio B**.
- Incubare per **5 minuti** a temperatura ambiente in agitazione (50 rpm circa).
- Aspirare ed aggiungere **1 ml** di **Sviluppatore di colore**.
- Incubare per **15 minuti** a temperatura ambiente in agitazione (50 rpm circa) al riparo dalla luce.
- Aspirare e lavare le strisce diverse volte con acqua distillata.
- Lasciare asciugare bene le strisce su carta assorbente al riparo dalla luce prima di procedere con l'interpretazione dei risultati.

⇒ RIVELAZIONE IN AUTOMATICO

La rivelazione può essere eseguita in automatico (*Tecan ProfiBlot 48 o strumento equivalente*), richiamando il programma "**Tipizza P**": in questo caso prevedere l'utilizzo di **10 µl** di **amplificato** + **10 µl** di **DNAT** e 1,5 ml di ciascun reagente per ogni campione.

Per maggiori dettagli sulla programmazione della strumentazione in dotazione rivolgersi al servizio customercare@nlm.it

RISULTATI

Validazione

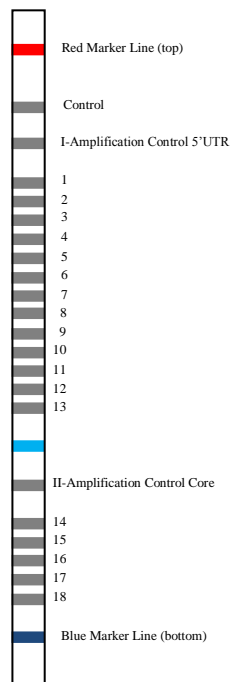
La prima linea (controllo del coniugato) verifica la corretta esecuzione di rivelazione. Questa linea deve sempre essere positiva e deve avere approssimativamente la stessa intensità su ogni striscia della seduta.

L'intensità di colorazione tra le altre linee di una striscia può variare da una linea all'altra, questo non interferisce con una corretta interpretazione di risultati.

Interpretazione dei risultati

- La prima linea sulla striscia è il controllo del coniugato (controllo di rivelazione) che deve essere allineata con la linea di controllo del coniugato sulla mascherina interpretativa.
- Le linee I e II (controlli di amplificazione, rispettivamente: I- della regione 5'UTR e II- della regione Core) accertano l'aggiunta del materiale amplificato per l'ibridazione e quando positive indicano l'avvenuta amplificazione della regione corrispondente; queste linee sono infatti positive quando è presente il prodotto di PCR biotinilato amplificato specifico per la regione corrispondente. La negatività di queste linee indica l'assenza di tale amplificato.
- Identificare tutti i numeri delle linee positive sulla striscia ed individuare il genotipo utilizzando le tabelle di interpretazione (vedere anche paragrafo sulla sensibilità diagnostica per approfondimenti sui genotipi).

Schema striscia:



La parte A della tabella di interpretazione mostra le possibili combinazioni di risultati ottenibili sulla base della regione 5'UTR; la parte B mostra invece le possibili combinazioni di risultati ottenibili sulla base della regione Core.

- Se per la regione 5'UTR il campione rientra nelle combinazioni dei genotipi **2, 3, 4, 5, 6a-b o 7a** non vi è la necessità di proseguire con l'analisi della regione Core. E' possibile che si osservi positività sulle linee Core **14-18**, ma queste **non** devono essere prese in considerazione nell'interpretazione dei risultati.
- Se invece per la regione 5'UTR il campione rientra nelle combinazioni dei genotipi **1 o 6c-t**, bisogna proseguire con l'interpretazione dei risultati sulle bande della regione Core e refertare **esclusivamente** il risultato associato alla tipologia indicata dal risultato della regione Core (es. se un campione risulta genotipo 1b nella regione 5'UTR, ma **1a nel Core, va refertato come 1a**). Se le informazioni del Core sono inconcludenti o non sono disponibili, non è possibile distinguere tra i genotipi 1a, 1b e 6.

In presenza dei genotipi 2, 3, 4, 5 e 7 è possibile non vedere nessun segnale sulle sonde della regione Core oppure vedere dei segnali che non vanno però in alcun modo interpretati:



Sonde Core	Genotipi che possono dare un segnale
14	5a
15	/
16	2c, 4a, 5a
17	3
18	2, (3), 5a

PROBLEMI

1. Segnali falsi negativi o eccessivamente deboli eccetto la linea del controllo del coniugato.

- Un segnale debole sulla striscia può essere dovuto sia a campioni troppo concentrati ($>1 \times 10^7$) (nel caso di alti titoli il DNA in eccesso inibisce la PCR: è necessario quindi diluirli), sia a campioni con titoli inferiori alla sensibilità del test.
- Segnali più deboli in tutta la seduta (tranne la linea del controllo del coniugato) e reazioni false negative con le sonde possono essere causate da temperature troppo alte durante l'ibridazione e il lavaggio stringente. **Controllare attentamente la temperatura del bagnetto.**
- Ibridazione e lavaggio stringente non sono stati scaldati o miscelati adeguatamente. Le soluzioni rimanenti nei contenitori devono essere eliminate. Ripetere il test utilizzando soluzioni nuove.

2. Segnali falsi positivi

- Si possono ottenere segnali aspecifici sulla striscia se la temperatura dell'acqua era troppo bassa durante l'ibridazione e il lavaggio stringente. **Controllare attentamente la temperatura del bagnetto**
- Ibridazione e lavaggio stringente non sono stati scaldati o miscelati adeguatamente. Le soluzioni rimanenti nei contenitori devono essere eliminate. Ripetere il test utilizzando soluzioni nuove.
- Se si vede lo stesso segnale aspecifico su tutte le strisce, corrispondente a un dato genotipo, ripetere l'intera procedura con nuovi reagenti. In caso di contaminazione infatti è importante scoprirne l'origine: estrazione, RT e PCR o contaminazioni derivanti da altri amplificati. L'utilizzo di controlli negativi e positivi di HCV possono essere utili nel trovare la causa di contaminazione.

3. Decolorazione e macchie bianche al centro della striscia o colorazione non omogenea.

La velocità di agitazione durante la rivelazione è troppo bassa. Ripetere lo sviluppo della colorazione sulle stesse strisce aumentando la velocità e assicurandosi che le strisce siano completamente sommerse nel liquido.

4. Comparsa di bande differenti dal modello presentato sulla lista di tipizzazione

- Sono positive le sonde di due diversi genotipi/sottotipi: ciò potrebbe essere dovuto a infezioni miste o contaminazioni.
- In rari casi possono generarsi combinazioni di bande non interpretabili. Ciò può essere dovuto all'eterogeneità del genoma di HCV, a contaminazioni o alla presenza di ceppi ricombinanti.

In entrambi i casi si consiglia di ripetere il test a partire dalla fase di estrazione ed eventualmente contattare il distributore.

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

⇒ Specificità diagnostica

La specificità del kit Gen-C 2.0 è stata determinata analizzando 101 campioni di plasma negativo per HCV provenienti da amplificati con i kit di riferimento. Non sono stati ottenuti risultati falsi positivi. In accordo con tali dati la specificità del kit è pari al 100%.

⇒ Sensibilità diagnostica

La sensibilità diagnostica del kit Gen-C 2.0 è stata valutata utilizzando campioni di plasma provenienti da soggetti HCV-positivi ed amplificati con i kit NLM cod. AA910/48 ver. 2.0.

Sulla base di analisi in silico il saggio è in grado di distinguere i genotipi 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 e i sottotipi 1a, 1b, 2a/2c, 2b, 3a, 3b, 3c, 3k, 4a, 4b, 4c/4d, 4e, 4f, 4h, 5a, 6a/6b, 6g, 6m, 6t e 7a.

La validazione del kit è stata effettuata con i seguenti campioni reali: 1a, 1b, 2a/2c, 3, 3a, 4, 4c/4d, 5a e 6a. I titoli virali erano compresi tra 2×10^3 e 1×10^7 UI/ml.

La capacità del test Gen-C 2.0 di genotipizzare correttamente i campioni è stata valutata comparando i risultati con quelli ottenuti mediante Gen-C (genotipi 2-5) o sequenziamento dei singoli campioni ed analisi filogenetica comparativa mediante database di sequenza (per i sottotipi 1a e 1b).

Per i campioni difficilmente reperibili (genotipi 5a e 6a) sono stati utilizzati pannelli di riferimento internazionali.

L'analisi è stata valutata sia a livello del genotipo sia a livello dei sottotipi a e b del genotipo 1.

217/217 campioni hanno dato esito positivo e corretto, dando una sensibilità complessiva del 100%.

117/117 campioni di genotipo 1 analizzati sono risultati concordanti con il metodo di riferimento.

La sensibilità a livello dei sottotipi 1a e 1b è pertanto pari al 100% (117/117).

Tabella riassuntiva dei genotipi analizzati e concordanza:

Genotipo	Numero di campioni	Concordanti con metodo di riferimento (Gen-C, sequenziamento o pannello)
1a	30	30
1b	87	87
2a/2c	37	37
3a	22	22
3	10	10
4c/4d	21	21
4	2	2
5a	6	6
6a/6b	2	2

Riproducibilità

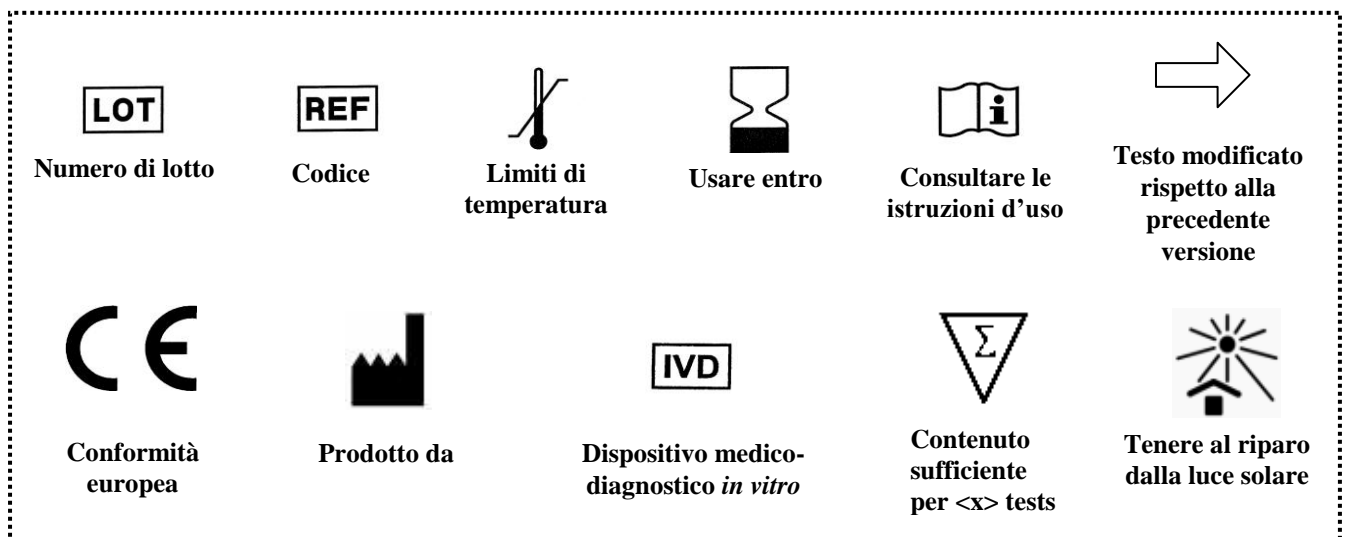
- **INTRASAGGIO:**

La riproducibilità Intrasaggio è stata testata utilizzando 3 campioni di 3 differenti genotipi in 3 replicati. Gli stessi campioni sono stati testati con due differenti lotti del kit Gen-C 2.0 da due differenti operatori.

- **INTERSAGGIO:**

La riproducibilità Intersaggio è stata testata utilizzando 3 campioni con 3 differenti genotipi da 3 differenti operatori in diverse sedute e utilizzando 3 lotti diversi del kit.

I test sono stati eseguiti secondo quanto descritto in metodica e la riproducibilità è stata del 100%.



MOLECULAR BIOLOGY

VER 4 – 29/11/2017

REF AC004/24

24 TEST

GMDN 59866

AMPLIFICATION: AA910/48, AA896/24 or AA896/48
EXTRACTION: AA1318 NOT INCLUDED

GEN-C 2.0

Reverse hybridization strip assay

CE

0459

IVD



NUCLEAR LASER MEDICINE S.r.l.
HEAD OFFICE: Viale delle Industrie, 3 – 20090 SETTALA MI (Italy)
Phone (+39) 02/95. 24. 51 - Fax (+39) 02/95. 24. 52. 37
WEB: www.nlm.it – E-MAIL: segreteria@nlm.it

INTENDED USE

Gen-C 2.0 is an *in vitro* line probe assay for the genotyping of hepatitis C virus. The assay discriminates between HCV genotypes on the basis of variations in the 5'-UTR and Core regions. The assay works with amplicons obtained with NLM code AA910/48, AA896/24 or AA896/48. For optimal results it is strictly recommended to use samples with viral load between 2×10^3 and 1×10^7 (if necessary dilute high viral load plasma before the RNA extraction).

⇒ On the basis of the *in silico* sequence analysis, the device is able to distinguish genotypes 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 and subtypes 1a, 1b, 2a/2c, 2b, 3a, 3b, 3c, 3k, 4a, 4b, 4c/4d, 4e, 4f, 4h, 5a, 6a/6b, 6g, 6m, 6t and 7a.

The result of this assay should be intended as an aid in selecting type and length of antiviral therapy for patients with chronic HCV infection. Therefore the device is not intended for use as a screening test for the presence of HCV RNA or as a diagnostic test to confirm the presence of HCV infection.

⇒ INTRODUCTION

A very high number of HCV-infected patients develop chronic hepatitis which often results in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma (1). HCV genome is a linear single strand RNA consisting of about 9400 nucleotides. The Core, Envelope and non-structural domains form the coding region of the genome, flanked in 5' and 3' by highly conserved untranslated regions (UTR).

Current international nomenclature proposed by Simmonds in 2005 (2), allows the classification in: genotypes, which have nucleotides difference of about 31-33%, and subtypes, that exhibit nucleotide differences of about 20-25%. Nowadays 7 genotypes and 67 subtypes have been identified: 1a to 1l, 2a to 2r, 3a to 3k (previously defined as 10a), 4a to 4w, 5a, 6a-v and 7a (3). The 5'UTR region is characterized by variable regions among the different HCV genotypes that are useful for distinguishing types 2-5, 6a-b and 7a, but is not able to accurately distinguish between genotype 1 and 6 and to properly subtype 1a and 1b. Analysis of the Core region allows to better identify these types and to improve genotype 1 subtyping accuracy (4-5).

IFN- α treatment

Results from many clinical studies regarding treatment of chronic HCV indicated that different genotypes respond in a dissimilar way if treated with IFN- α . In particular, genotype 1b HCV infection could not be efficiently treated with IFN- α (less than 10% of treated patients with a long-term response), while genotypes 1a, 2a, 2b, and 3a responded favorably (between 50 and 80% long-term response). It has been demonstrated that genotype 1b infections proceed much faster to severe forms of chronic hepatitis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma (6). The use of the new drugs (DAA), in association with IFN- α , increased the therapeutic and pharmacological options available for each genotype (7-8). Discrimination of HCV subtypes is of great diagnostic importance since it helps to find more correct, more effective and personalized therapeutic protocols.

⇒ REFERENCES

1. Sarrazin C. *Diagnosis of hepatitis C: update 2004. Journal of Gastroenterology and Hepatology (2004) 19, S88-S93*
2. Simmonds et al. *Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. Hepatology, vol. 42, n° 4, 2005.*
3. Smith et al. *Expanded Classification of Hepatitis C Virus Into 7 Genotypes and 67 Subtypes: Updated Criteria and Genotype Assignment Web Resource HEPATOLOGY, Vol. 59, No. 1, 2014*
4. P.T. Hrabec et al. *Comparative analysis of hepatitis C virus phylogenies from coding and non-coding regions: the 5' untranslated region (UTR) fails to classify subtypes. Virology Journal 2006, 3:103*
5. M. A. Ansari et al. *HCV-Core Region: Its Significance in HCV-Genotyping and Type Dependent Genomic Expression. Macedonian Journal of Medical Sciences. 2012 Mar 15; 5(1):30-39.*
6. Nizar N. Zein. *Clinical Significance of Hepatitis C Virus Genotypes. Clinical Microbiology Reviews, Apr. 2000, p.223-235.*
7. *EASL Clinical Practice Guidelines: Recommendation on treatments of hepatitis C. Journal of Hepatology 2016.*
8. Falade-Nwulia et al. *Oral Direct-Acting Agent Therapy for Hepatitis C Virus Infection A Systematic Review Annals of Internal Medicine Vol. 166 No. 8 18 April 2017*

PRINCIPLE OF THE PROCEDURE

The test is based on reverse-hybridization principle. Biotinylated amplicons, generated by RT-PCR of the 5'-UTR and Core regions of HCV RNA, are hybridized to specific probes that are bound to nitrocellulose strip by a poly-T tail.

Biotinylated hybrids are then detected using streptavidin bound to alkaline phosphatase; amplicons that are not complementary are washed out. Then the substrate reacts with the streptavidin-alkaline phosphatase complex forming a purple precipitate and colouring banding pattern on the strip.

PRODUCT COMPOSITION

Reagents (+2/+8° C)		Code	Quantity	N° Vial	
Strips Nitrocellulose membrane coated with oligonucleotides		-	KC029	24	1
DNAT Denaturation solution containing NaOH	 DANGER	H314, P280, P301+P330+P331, P303+P361+P353, P305+P351+P338	KA107	1 ml	1
Hybridization (*) Saline Solution containing preservatives	 WARNING	H319, EUH208, P280, P305+P351+P338, P337+P313	KA102	60ml	1
Stringent Wash Solution Saline solution containing detergent and preservatives	-	-	KA928	175 ml	1
Conjugate Solution containing streptavidin labeled with alkaline phosphatase, stabilizers and preservatives	-	-	KA574	60 ml	1
Wash Solution B Saline Solution containing preservatives	-	EUH208	KA105-1	175 ml	1
Color developer Solution containing 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate and 4-Nitroblue tetrazolium	-	-	AA564	60 ml	1
Plastic Trays	-	-	DC000	3	
Transparent interpretation card	-	-	-	1	
Collector sheet For strip storage, not suitable for results interpretation and/or as medical report	-	-	-	1	
Interpretation chart Sheet that provides banding patterns for genotypes identification	-	-	-	1	

(*) The exemption from the requirements for labeling of packages is determined by quantity and severity of hazardous reagent. The criteria are: **amounts <125 ml and not serious hazard categories (ref. Regulation (EC) N° 1272/2008 - list 1.5.2.1.1).**

STORAGE AND STABILITY

- All opened or unopened reagents are stable up to the expiry date indicated on the label when stored at the correct temperature.
- At the end of each assay store reagents at the correct temperature.
- The kit should be kept isolated from any source of contaminating DNA especially amplified products.
- Developed dry strips should be stored in the dark at room temperature (+15/30°C).
- The vial containing the DNAT Solution should be closed immediately after use.

PRECAUTIONS

- Only professional and opportunely trained personnel should use this kit. Handle this product according to established good laboratory practices and universal precautions throughout the assay procedure.
- The use of the following solutions allows to minimize the risk of cross-contamination:

- ✓ It is recommended to perform the assay in three different areas:
 - Area 1: pre-PCR (samples handling and extraction)
 - Area 2: Master Mix preparation and sample addition to the RT-PCR mix.
 - Area 3: post-PCR (Real Time PCR)

Each area should be provided with dedicated equipment and consumables (lab coats, centrifuge, tubes, pipettes, etc).

Workflow must proceed in a unidirectional manner, beginning in the RNA extraction area (Area 1), moving to the mastermix preparation and RNA addition area (area 2) and finally to amplification and detection area (Area 3). This means that consumables and PPE (lab coats, gloves, etc.) that have been introduced into the post-PCR room should never be placed back to the pre-PCR room without thorough decontamination.

- ✓ It's recommended to clean the workstation with 5-10% bleach (final concentration of sodium hypochlorite: 0,5% w/v) at the end of the procedure. Prepare bleach solution daily.
- ✓ All disposable items (tips and tubes) must be DNase, RNase free. Use aerosol-resistant pipette tips to avoid pipettes contamination. Use a new tip every time a volume is dispensed.
- ✓ Change gloves frequently
- Discard all used material in accordance with the existing local and national regulations in force
- Do not eat, drink, smoke or apply cosmetics in areas where reagents or specimens are handled.
- In case of contact with reagents rinse immediately with water and seek medical advice.
- Do not use device after its expiration date.
- Do not mix reagents from different lots.
- Do not use the device if the box is damaged; contact the supplier
- Plastic trays can be reused maximum twice, if washed with bleach and then with water at the end of detection.
- Test strips stored at +2/+8°C in the dark are stable until the expiry date.
- It is advisable to have constant and uniform laboratory temperature, avoid to place the instruments near heating/cooling sources that may compromise the right working.
- **Use the transparent interpretation card of the specific lot.**

- **Hazard statements**

- **H314:** Causes severe skin burns and eye damage.
- **H319:** Causes serious eye irritation.

- **Precautionary statements**

- **P280:** Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.
- **P301+P330+P331:** IF SWALLOWED: rinse mouth. Do NOT induce vomiting.
- **P303+P361+P353:** IF ON SKIN (or hair): Remove/Take off immediately all contaminated clothing. Rinse skin with water/shower.
- **P305+P351+P338:** IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing
- **P337+P313:** If eye irritation persists: Get medical advice/attention.

- **Supplemental hazard informations**

- **EUH208:** It Contains Kathon. May cause allergic reaction (skin).

AMPLICONS STORAGE

Store amplicons obtained with AA910/48, AA896/24 or AA896/48 at +2/+8° C or at -25/-15° C for later use.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Dedicated adjustable volume micropipettes set and tips
- Clean tweezers to handle strips

Manual strip processing:

- Water bath with inclined lid, shaking platform (50-100 rpm) and adjustable temperature (46°C ± 0,5° C)
- Thermometer
- Deionised or distilled water
- Vacuum aspiration apparatus
- Timer

Automatic strip processing:

- Tecan ProfiBlot 48 or equivalent instrument. For specific information on the procedure to be applied contact Nuclear Laser Medicine.

PROCEDURE

MANUAL DETECTION

- Adjust the water level of the shaking bath to approx. 2/3 of the height of the Plastic Tray.
 - Heat the water bath to **46° C** and check the temperature ($46 \pm 0,5^\circ \text{C}$) using a calibrated thermometer.
 - Pre-warm the Hybridization and Stringent Wash Solution to **46° C**; all crystals should be completely dissolved.
 - Allow DNAT, Conjugate, Wash Solution B and Color developer to reach room temperature.
 - Take one strip for each sample using clean tweezers (touch strips with gloves only). Label strips with a pencil (do not use ballpoint pen, markers, etc).
- Warning:** do not allow the strips to dry during the whole procedure.

Hybridization (46° C)

- Pipette **10 µl** of **DNAT** into each lane of the Plastic Tray
Warning: do not use DNAT if is not blue.
- For each sample add **10 µl** of **amplification** product to the corresponding drop of DNAT. Mix thoroughly with a pipette (solution will remain blue).
- Incubate **5 min** at room temperature.
- Add **1 ml** of **Hybridization** (pre-warmed to 46° C) to each sample and mix gently: blue color disappears.
- Place strips into the respective lanes with marker lines facing up. Submerge completely.
- Incubate for **30 min** at **46° C** in the shaking water bath (about 50 rpm). Keep the water bath closed to avoid temperature variations.

Stringent Wash solution (46° C)

- After hybridization step remove the tray from the water bath; angle the tray upwards and aspirate the solution from each lane using a pipette or a vacuum aspiration apparatus, without touching the strip surface to avoid its damage.
- Add **1 ml** of **Stringent Wash solution** (pre-warmed at 46° C) to each lane and rinse briefly.
- Remove the solution and add **1 ml** of **Stringent Wash solution** (pre-warmed at 46°C).
- Incubate **15 min** at **46° C** in the shaking water bath (about 50 rpm).
Warning: put Stringent Wash solution back in the water bath during incubation
- Remove the solution and add **1 ml** of **Stringent Wash solution** (pre-warmed at 46°C).
- Incubate **15 min** at **46° C** in the shaking water bath (about 50 rpm).
- Remove the solution from each lane.

Color development (room temperature)

All the next steps have to be performed at room temperature with shaking. Since water takes too much time to reach room temperature, place a tray (for example of polystyrene) on the lid of the water bath to isolate the Plastic Trays from the hot water and use the agitation function of the water bath only.

- Add **1 ml** of **Conjugate**.
- Incubate **15 minutes** while shaking (about 50 rpm) at room temperature.
- Remove the solution, add **1 ml** of **Wash solution B** and rinse briefly.
- Remove the solution and add **1 ml** of **Wash solution B**.
- Incubate for **5 min** while shaking (about 50 rpm) at room temperature.
- Remove the solution and add **1 ml** of **Wash solution B**.
- Incubate for **5 min** while shaking (about 50 rpm) at room temperature.
- Remove the solution and add **1 ml** of **Color developer**.
- Incubate for **15 min** in the dark, while shaking (about 50 rpm) at room temperature.
- Remove color developer and wash strips with distilled water.
- Let strips dry in the dark on absorbent paper before proceeding with the interpretation of results.

⇒ AUTOMATIC DETECTION

Detection can be performed by using automatic instrument (*Tecan ProfiBlot 48 or equivalent instrument*): select “**Tipizza P**” protocol. In this case **10 µl PCR product + 10 µl DNAT** and **1,5 ml** of each reagent have to be used for each sample.

For more information concerning the protocol load on the instrument to be used contact customercare@nlm.it

RESULTS

Validation

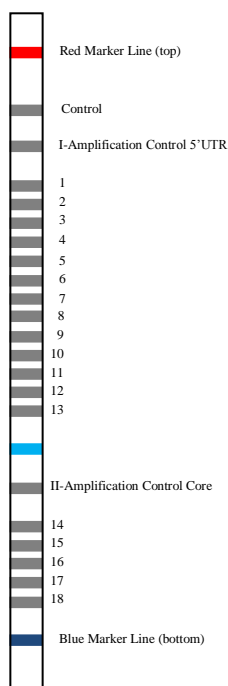
A positive reaction of the uppermost Conjugate Control (CC) line indicates the correct function of the detection step. This line has to be always present and its intensity should be the same among different strips.

The colour intensity among the other positive lines on the strips may vary. This doesn't affect results interpretation.

Interpretation of results

- Align the CC line of the strip with the CC line on the transparent interpretation card. This line should always stain positive.
- The Amplification Control (AC) lines (lines I and II) contain universal probes for conserved sequences of the 5'UTR and Core region respectively. Their positive reaction ensures the addition of the amplified material and indicates the amplification of the corresponding region.
- Read the number of all positive lines for each strip on the Transparent interpretation card: the corresponding HCV typing result can be determined by using the Interpretation Chart (read also the section on diagnostic sensitivity for additional information on genotypes).

Strip scheme:



The part A of the interpretation table shows the possible result combinations on the basis of the 5'UTR region; the part B shows the possible result combinations obtainable on the basis of the Core region.

- If the 5'UTR region of the sample falls in the combinations of genotypes **2, 3, 4, 5, 6a-b or 7a** don't continue with the analysis of the Core region. It is possible to observe positivity on lines **14-18** of the Core, but these **must not** be taken into account in the results interpretation.

- If the 5'UTR region of the sample falls in the combinations of genotypes **1 or 6c-t** the analysis has to be continued with the interpretation of the results on the bands 14-18 (Core) and report only the results associated with the type indicated by the Core region (e.g. if a sample is genotype 1b in the 5'UTR region, but **1a in the Core region, it should be classified as 1a**). If core region information are inconclusive or unavailable, it isn't possible to discriminate between genotype 1a, 1b or 6.

In the presence of genotypes 2, 3, 4, 5 and 7, signals on the probes of the Core region can be absent or present; in this case they should not be interpreted in any way:



Core probes	Genotypes that can show signals
14	5a
15	/
16	2c, 4a, 5a
17	3
18	2, (3), 5a

TROUBLESHOOTING

1. False negative or too weak signals

- Weak signals on the strip could be the consequence of:
 - Too high DNA concentration during the PCR (try to dilute it) especially for samples with a very high titer ($>1 \times 10^7$)
 - Too low DNA concentration during the PCR for samples with a very low titer
- If all the strips show weak signals it could be due to too high hybridization and/or Stringent washing steps water-bath temperature. **Check carefully the water-bath temperature.**
- Hybridization or Stringent Wash Solution were not pre-warmed or mixed carefully. In this case the remaining solution should be discarded and a new one should be used.

2. False positive signals

- Unspecific signals can occur if temperature during hybridization and/or Stringent washing steps is too low. **Check carefully the water-bath temperature.**
- Stringent Wash Solution was not pre-warmed and mixed carefully. In this case the remaining buffer should be wasted and a new one should be used.
- If the same non-specific pattern, corresponding to a given genotype, is visible on all strips, a contamination occurred. Repeat the assay with new solutions. If contamination events occur it is important to discover their origin: extraction, RT and PCR reactions or contamination derived from other amplicons. The use of HCV positive and negative controls can be useful to find out the cause of contamination.

3. Single line non homogeneous staining

Shaking rate during detection steps is too low. Check that strips are submerged totally.

4. Pattern different from regular pattern on the typing list

- Typing probes of 2 different types are present: this may be due to mixed infections or cross contaminations.
- In rare cases, combinations of bands are generated as not interpretable. This may be due to the heterogeneity of the HCV genome, contaminations or recombinant strains.

In both cases we suggest to repeat the test (starting from RNA purification) and eventually contact your distributor.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

⇒ Diagnostic specificity

The specificity of the Gen-C 2.0 assay was determined analysing 101 HCV negative plasma samples. Samples tested were negative for HCV antibody and RNA. The test was performed according to instructions for use. No false positive results were observed, therefore Gen-C 2.0 Test Specificity is 100%.

⇒ Diagnostic sensitivity

The diagnostic sensitivity of the kit Gen-C 2.0 was evaluated using plasma samples from HCV-positive subjects and amplified with kits cod NLM. AA910/48 ver. 2.0.

On the basis of the *in silico* sequence analysis, the device is able to distinguish genotypes 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 and subtypes 1a, 1b, 2a/2c, 2b, 3a, 3b, 3c, 3k, 4a, 4b, 4c/4d, 4e, 4f, 4h, 5a, 6a/6b, 6g, 6m, 6t and 7a.

The device validation has been carried out with real samples of genotype: 1a, 1b, 2a/2c, 3, 3a, 4, 4c/4d, 5a and 6a. Viral loads were in a range of 2×10^3 and 1×10^7 IU/ml.

The Gen-C 2.0 assay ability to accurately genotype HCV positive samples was evaluated by comparing the results with those based on the previous version of the kit (for genotypes 2-5) and sequencing (for genotype 1 and 6) of individual samples; sequencing results were determined comparing them to HCV database and phylogenetic analysis. For genotypes 5a and 6a, samples from reference panels were used.

Analysis has been carried both with regard to the genotype and subtype (1a and 1b).

Of the 217 samples analyzed, all gave positive and correct results. The overall sensitivity for the assay is therefore 100%.

117/117 genotype 1 samples, were correctly subtyped with AC004 2.0 and were concordant with the reference method. Therefore the accuracy for Gen-C 2.0 assay for subtype 1a and 1b is 100%.

Summary of the analyzed samples and concordance:

Genotype	Nr of samples tested	Concordant to reference method (Gen-C, sequencing or panel)
1a	30	30
1b	87	87
2a/2c	37	37
3a	22	22
3	10	10
4c/4d	21	21
4	2	2
5a	6	6
6a/6b	2	2

Reproducibility

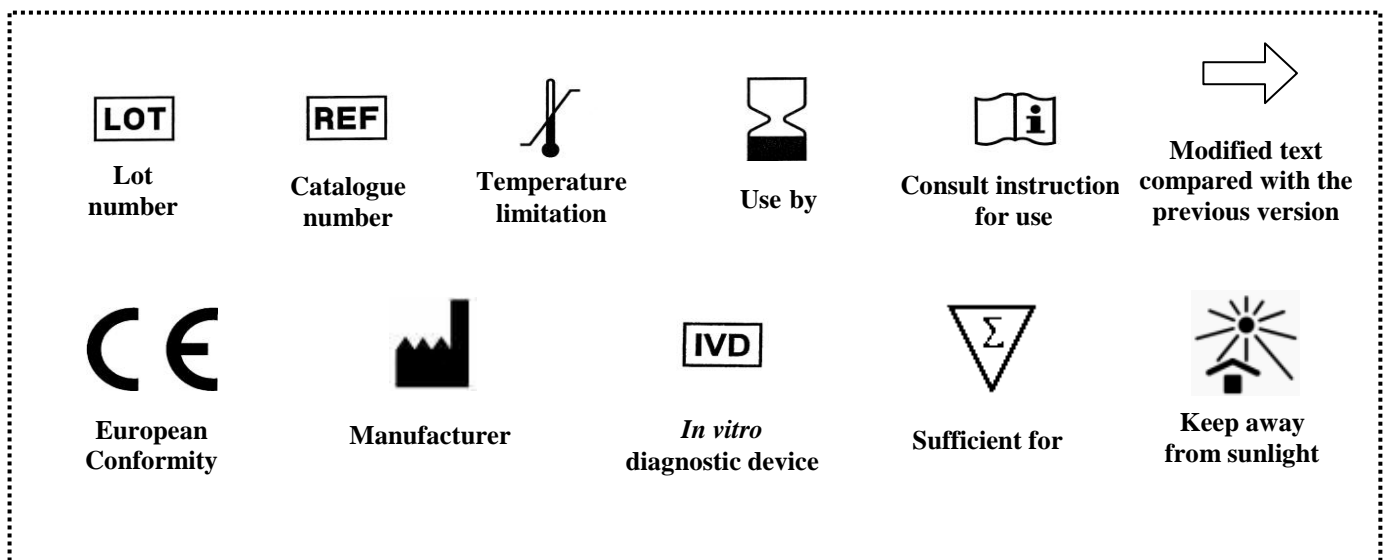
- **INTRA-ASSAY REPRODUCIBILITY:**

Intra-assay reproducibility was evaluated using 3 samples of 3 different genotype in 3 replicates. The same 3 samples were tested with two different batches by two different operators.

- **INTER-ASSAY REPRODUCIBILITY:**

Inter-assay reproducibility was evaluated using 3 samples of different genotype by three different operators in different runs and days, using three different batches.

The test was performed according to the instructions for use, the precision was evaluated for all the steps of the procedure. The reproducibility for Gen-C 2.0 assay is 100%.



MOLEKULARBIOLOGIE

VER 4 - 29/11/2017

REF AC004/24

24 TEST

GMDN 59866

AMPLIFIKATION: AA910/48, AA896/24 oder AA896/48
EXTRAKTION: AA1318 NICHT INKLUSIVE

GEN-C 2.0

Reverse hybridisierung - streifentest

CE

0459

IVD



NUCLEAR LASER MEDICINE S.r.l.
HAUPTSITZ: Viale delle Industrie, 3 – 20090 SETTALA MI (Italy)
Telefon (+39) 02/95. 24. 51 - Fax (+39) 02/95. 24. 52. 37
WEBSEITE: www.nlm.it – E-MAIL: segreteria@nlm.it

VERWENDUNGSZWECK

Gen-C 2.0 ist ein *in vitro* Line Probe Assay für die Genotypisierung des Hepatitis C Virus. Auf der Grundlage der Variationen in der 5'-UTR und Core-Regionen dient der Test der Unterscheidung zwischen HCV Genotypen. Die mit dem NLM HCV RNA QUANTITATIVE REAL TIME 2.0 (Bestell-Nr. AA910/24) oder dem HCV RNA QUALITATIVE REAL TIME 2.0 (Bestell-Nr. AA896/24 bzw. AA896/48) gewonnenen Amplicons können in den Gen-C 2.0 eingesetzt werden. Um optimale Ergebnisse zu erreichen, wird unbedingt empfohlen Proben mit einer Viruslast zwischen 2×10^3 und 1×10^7 einzusetzen (wenn notwendig, verdünnen Sie Plasma mit hoher Viruslast vor der RNA Extraktion).

⇒ Auf der Basis der in *in silico* Sequenzanalyse, ist der Kit fähig zwischen den Genotypen 1, 2, 3, 4, 5, 6 und 7, und Subtypen 1a, 1b, 2a/2c, 2b, 3a, 3b, 3c, 3k, 4a, 4b, 4c/4d, 4e, 4f, 4h, 5a, 6a/6b, 6g, 6m, 6t und 7a zu unterscheiden.

Das Ergebnis dieses Tests soll eine Hilfestellung zur Auswahl des Typs und der Dauer der antiviralen Therapie darstellen für Patienten mit einer chronischen HCV Infektion. Daher ist der Kit nicht als Screeningtest oder als diagnostischer Test zur Bestätigung der Präsenz von HCV vorgesehen.

⇒ EINLEITUNG

Eine sehr große Anzahl HCV infizierter Patienten entwickeln chronische Hepatitis, die oft zur Leberzirrhose und zu hepatozellulären Karzinoma führt (1). Das HCV Genom ist eine einzelsträngige, lineare RNA, welches aus 9400 Nukleotiden besteht. Der Kern (Core Region), Envelope und die non-structural Domänen bilden die kodierenden Regionen des Genoms, flankiert in 5' und 3' durch hochkonservierte untranslatierte Regionen (UTR).

Die gegenwärtige Nomenklatur (Simmonds-Nomenklatur) erlaubt die Klassifizierung in Genotypen, die in der Nukleotidsequenz einen Unterschied von 31-33% und bei den Subtypen etwa 20-25% aufweisen (2).

Derzeit 7 Genotypen und 67 Subtypen identifiziert wurden: 1a bis 1l, 2a bis 2r, 3a bis 3k (früher als 10a definiert), 4a bis 4w, 5a, 6a-v und 7a (3). Die 5'UTR Region ist durch variable Bereiche zwischen den verschiedenen HCV Genotypen charakterisiert, die zur Unterscheidung zwischen den Genotypen 2-5, 6a-b und 7a verwendet werden, aber nicht, um die Genotypen 6 und Subtypen 1a und 1b zu unterscheiden. Core Region Elemente werden für die akkuratere Analyse herangezogen (4-5).

IFN- α Behandlung

Viele klinische Studien zur Behandlung von chronischer HCV Erkrankung mit Interferon (IFN) wiesen auf, dass verschiedene Genotypen auf eine Behandlung mit IFN- α unterschiedlich reagierten. Insbesondere die Genotyp 1b HCV Infektion konnte nicht effizient mit IFN- α therapiert werden (weniger als 10% der behandelten Patienten mit Langzeitreaktionen), während die Genotypen 1a, 2a, 2b, und 3a auf eine Therapie gut ansprachen (zwischen 50 und 80%). Es wurde bereits gezeigt, dass Genotyp 1b Infektionen schneller voranschreiten und es zu schwerer chronischer Hepatitis, Zirrhose und zu hepatozellulären Krebsformen kommen kann (6).

Einsatz neuer Medikamente, wie z.B. DAA zusammen mit IFN- α , hat therapeutische und pharmakologische Optionen für jeden Genotyp erhöht (7-8).

Die Unterscheidung von HCV Subtypen stellt eine wichtige diagnostische Bedeutung dar, da es hilft die korrekte und effizientere personalisierte Therapie durchzuführen.

⇒ LITERATUR

1. Sarrazin C. *Diagnosis of hepatitis C: update 2004. Journal of Gastroenterology and Hepatology (2004) 19, S88-S93*
2. Simmonds et al. *Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. Hepatology, vol. 42, n° 4, 2005.*
3. Smith et al. *Expanded Classification of Hepatitis C Virus Into 7 Genotypes and 67 Subtypes: Updated Criteria and Genotype Assignment Web Resource HEPATOLOGY, Vol. 59, No. 1, 2014*
4. P.T. Hraber et al. *Comparative analysis of hepatitis C virus phylogenies from coding and non-coding regions: the 5' untranslated region (UTR) fails to classify subtypes. Virology Journal 2006, 3:103*
5. M. A. Ansari et al. *HCV-Core Region: Its Significance in HCV-Genotyping and Type Dependent Genomic Expression. Macedonian Journal of Medical Sciences. 2012 Mar 15; 5(1):30-39.*
6. Nizar N. Zein. *Clinical Significance of Hepatitis C Virus Genotypes. Clinical Microbiology Reviews, Apr. 2000, p.223-235.*
7. *EASL Clinical Practice Guidelines: Recommendation on treatments of hepatitis C. Journal of Hepatology 2016.*
8. Falade-Nwulia et al. *Oral Direct-Acting Agent Therapy for Hepatitis C Virus Infection A Systematic Review Annals of Internal Medicine Vol. 166 No. 8 18 April 2017*

TESTPRINZIP

Der Test basiert auf der reversen Hybridisierung. Biotinylierte DNA PCR Produkte, generiert durch RT-PCR der 5'-UTR und Core Region der HCV RNA, werden mit spezifischen Sonden hybridisiert, die auf Nitrozellulosestreifen durch einen Poly A Schwanz verbunden sind.

Nach der Hybridisierung werden die PCR Produkte, die nicht komplementär sind gewaschen und die biotinylierten Hybride durch die Alkalische Phosphatase, das an Streptavidin gebunden ist, detektiert. Dann reagiert das chromogene Substrat mit dem Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-Komplex, das ein lila Präzipitat bildet und das Bandenmuster des Streifens färbt.

KITINHALT

Reagenzien (+2/+8° C)		NLM Code	Quantität	Anzahl Fläschchen	
Streifen Nitrozellulosemembran mit Oligonukleotiden beschichtet		-	KC029	24	1
DNAT Denaturierungslösung enthält NaOH	 GEFAHR	H314, P280, P301+P330+P331, P303+P361+P353, P305+P351+P338	KA107	1 ml	1
Hybridisierungslösung (*) Saline Lösung enthält Konservierungsstoffe	 ACHTUNG	H319, EUH208, P280, P305+P351+P338, P337+P313	KA102	60ml	1
Stringente Waschlösung Saline Lösung enthält Detergenz und Konservierungsstoffe	-	-	KA928	175 ml	1
Konjugat Lösung enthält Streptavidin mit alkalischer Phosphatase, Stabilisatoren und Konservierungsstoffe	-	-	KA574	60 ml	1
Waschlösung B Saline Lösung enthält Konservierungsstoffe	-	EUH208	KA105-1	175 ml	1
Farbentwickler (Color developer) Lösung enthält 5-Bromo-4- chloro-3-indolyl-phosphat und 4- Nitroblutetrazolio	-	-	AA564	60 ml	1
Plastikablagen	-	-	DC000	3	
Transparente Interpretationskarte Dient zur Identifizierung positiver Bänder auf einem Streifen	-	-	-	1	
Collector sheet Blatt für die Lagerung der Bänder eingesetzt werden; nicht für die Interpretation der Ergebnisse und / oder Berichterstattung geeignet	-	-	-	1	
Interpretationskarte Tabelle, die das Bandenmuster zur Identifizierung der Genotypen liefert	-	-	-	1	

(*) Die Menge und die Höhe des Risikos des Reaktionsmittels bestimmen, ob das Produkt von den Anforderungen an die Kennzeichnung und Verpackung befreit werden kann. **Die Kriterien sind: Mengen < 125 ml und niedrige Gefahrenklassen (vgl. Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 - Liste 1.5.2.1.1).**

STABILITÄT UND LAGERUNG

- Alle geöffneten oder ungeöffneten Reagenzien sind unter Beachtung der richtigen Temperatur während der Lagerung (2-8° C) haltbar bis zum Mindesthaltbarkeitsdatum, das auf dem Etikett aufgedruckt ist.
- Nach Beendigung eines Testansatzes sollten die Reagenzien wieder bei der korrekten Temperatur gelagert werden.
- Der Kit sollte isoliert von anderen DNA-Kontaminationsquellen, insbesondere amplifizierten Produkten aufbewahrt werden.
- Die entwickelten Streifen sollten im Dunkeln bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.
- Das Fläschchen, das die DNAT Lösung enthält, sollte nach Verwendung sofort wieder verschlossen werden.

VORSICHTSMAßNAHMEN

- Nur professionel geschultes Personal sollte dieses Kit benutzen. Handhaben Sie dieses Produkt gemäß den GLP Empfehlungen (good laboratory practices).
- Bei der Beachtung der folgenden Angaben, wird das Risiko von Kreuz-Kontaminationen minimiert werden:
 - ✓ Es wird empfohlen den Assay in drei verschiedenen, voneinander getrennten Bereichen durchzuführen:
 - Bereich 1: pre-PCR (Proben Handhabung und Extraktion)
 - Bereich 2: Master Mix Zubereitung und Probenzugabe in den RT-PCR Mix.
 - Bereich 3: post-PCR (Real Time PCR)
- Jeder Bereich sollte mit der zweckbestimmten Ausstattung und Verbrauchsmaterialien (Labormäntel, Zentrifugen, Röhrchen, Pipetten, usw.) bestückt sein.
- Der Arbeitsablauf muss unidirektional sein, beginnend im RNA Extraktionbereich (Bereich 1), anschließend im Bereich für den Mastermixansatz und der RNA Zugabe (Bereich 2) und zum Schluss in den Amplifikations- und Detektionsbereich (Bereich 3). Das bedeutet, dass Verbrauchsmaterialien und persönliche Schutzausrüstung (Labormantel, Handschuhe, usw.), die im Post-PCR-Raum eingesetzt wurden, niemals ohne gründliche Dekontamination in den Pre-PCR-Raum zurückgebraucht werden dürfen.
- ✓ Es wird empfohlen, am Ende des Arbeitsvorgangs den Arbeitsplatz mit 5-10% iger Bleiche (Endkonzentration von Natriumhydrochlorit: 0,5% w/v) zu reinigen. Die Bleichlösung täglich herstellen.
- ✓ Alle Verbrauchsmaterialien (Pipettenspitzen und Röhrchen) müssen DNase- RNase-frei sein. Benutzen Sie Pipettenspitzen mit Filtern, um Aerosole zu vermeiden. Verwenden Sie immer eine neue unbenutzte Spitze für den Pipettiervorgang.
- ✓ Wechseln Sie die Handschue regelmäßig.
- Entsorgen Sie alle gebrauchten Materialien gemäß der local und national geltenden Richtlinien
- Das Essen, Trinken, Rauchen oder auftragen von Kosmetika ist in Bereichen, in denen Reagenzien und Proben verwendet werden verboten.
- Im Falle eines Hautkontaktes mit Reagenzien sofort mit Wasser waschen und medizinischen Rat aufsuchen.
- Verwenden Sie das Kit nicht mehr nach Ablauf des Haltbarkeitsdatums.
- Mischen Sie nicht die Reagenzien verschiedener Chargen.
- Verwenden Sie den Kit nicht wenn die Box stark beschädigt ist. Kontaktieren Sie den Hersteller/Lieferanten.
- Die Plastikablagen können bis zu zweimal wiederverwendet werden, wenn sie richtig mit Bleichmittel und Wasser am Ende der Offenbarung gewaschen.
- Die Teststreifen, die bei +2 bis +8° C im Dunkeln gelagert werden, sind bis zum Mindesthaltbarkeitsdatum stabil.
- Es ist ratsam konstante und einheitliche Temperaturverhältnisse im Labor zu haben, vermeiden Sie die Geräte in die Nähe von Wärme bzw. Kühlquellen zu stellen, das kann das korrekte Arbeiten gefährden.
- **Verwenden Sie die transparente Interpretationskarte der jeweiligen spezifischen Charge.**

- **Gefahrenhinweis:**

- **H314:** Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.
- **H319:** Verursacht schwere Augenreizung.

- **Sicherheitshinweise:**

- **P280:** Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.
- **P301+P330+P331:** BEI VERSCHLUCKEN: Mund ausspülen. KEIN Erbrechen herbeiführen.
- **P303+P361+P353:** BEI KONTAKT MIT DER HAUT (oder dem Haar): Alle verschmutzten, getränkten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen/duschen.
- **P305+P351+P338:** BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen
- **P337+P313:** If Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

- **Ergänzende gefahrenmerkmale:**

- **EUH208:** Enthält Kathon. Kann allergische Reaktionen hervorrufen (haut).

LAGERUNG DER PCR-PRODUKTE

Lagern Sie RT-PCR-Produkte, die mit Hilfe von AA910/48 ver. 2.0 oder AA896/48 bzw. AA896/24 ver.2.0 hergestellt werden für eine spätere Verwendung bei +2/+8° C oder bei -25 bis -15° C.

BENÖTIGTES ABER NICHT MITGELIEFERTES MATERIAL

- Volumeneinstellbares Pipettenset und Spitzen
- Saubere Pinzetten zum Anfassen die Streifen

Handvorgang:

- Schüttelwasserbad mit schrägem Deckel, variabler Schüttelgeschwindigkeit (50-100 rpm) und einstellbarer Temperatur (46° C ± 0,5° C)
- Thermometer
- Deionisiertes oder destilliertes Wasser
- Absaugvorrichtung zum Entfernen der Flüssigkeiten
- Timer

⇒ Automatischer Vorgang:

- Tecan ProfiBlot 48 oder gleichwärtiges Gerät. Für genaueren Auskünfte über den Anwendungsvorgang, bitte sich mit Nuclear Laser Medicine in Verbindung setzen.

TESTDURCHFÜHRUNG

MANUELLE METHODE

- Stellen Sie den Wasserstand des Schüttelbades auf etwa 2/3 der Höhe der Plastikablage.
- Die Temperatur des Wassers muss **46° C** betragen ($46 \pm 0,5^\circ \text{C}$), verwenden Sie einen kalibrierten Thermometer, um die korrekte Temperatur einzustellen.
- Wärmen Sie den Hybridisierungspuffer und den Stringent Waschlösungspuffer auf **46° C** vor; die Kristalle müssen komplett aufgelöst werden.
- Das DNAT, Konjugat, Waschlösung B und der Farbenwickler müssen Raumtemperatur erreichen.
- Nehmen Sie mit Hilfe einer sauberen Pinzette für jede Probe einen Streifen (die Streifen nur mit Handschuhen berühren). Beschriften Sie die Streifen mit einem Bleistift (verwenden Sie keinen Kugelschreiber oder Marker)
Achtung: Die Streifen dürfen während der gesamten Durchführung niemals austrocknen.

Hybridisierung (46° C)

- Pipettieren Sie **10 µl** der **DNAT** in jedes der Wanne der Plastikablage
Hinweis: nur DNAT verwenden, das blau gefärbt ist.
- Pipettieren Sie **10 µl** des Amplifikats jeder Probe mit dem entsprechenden Tropfen des DNAT. Durch Auf- und Abpipettieren mischen (die Lösung bleibt blau)
- **5 min** bei Raumtemperatur inkubieren.
- Geben Sie **1 ml** der **Hybridisierungslösung** (vorgewärmt auf 46° C) zu jeder Probe. Vorsichtig mischen. Die blaue Farbe verschwindet.
- Platzieren Sie die Streifen mit den Markerbanden nach oben in die jeweiligen Wannen. Die Streifen müssen komplett in Lösung eingetaucht sein.
- Inkubieren Sie **30 min** bei **46° C** im Schüttelbad (ca. 50 rpm). Den Deckel des Wasserbades geschlossen halten, um Temperaturvariationen zu verhindern.

Stringente Waschschrte (46° C)

- Nach der Hybridisierung nehmen Sie die Plastikablage aus dem Wasserbad und neigen es vorsichtig nach unten, um die Lösung aus den Wannen mit Hilfe einer Pipette oder einer Vakuumpump abzusaugen. Vermeiden Sie die Oberfläche der Streifen zu berühren.
- Pipettieren Sie **1ml** der **Stringente Waschlösung** (vorgewärmt 46° C) in jede Wanne und spülen Sie kurz.
- Saugen Sie die Lösung ab und geben Sie **1ml** der **Stringente Waschlösung** (vorgewärmt 46° C) zu.
Inkubation für **15 min** bei **46° C** im Schüttelwasserbad (ca. 50 rpm)
Hinweis: Stellen Sie die Stringente Waschlösung während der Inkubationszeit zurück in das Wasserbad, um die Lösung auf 46°C zu halten.
- Saugen Sie die Lösung ab und geben Sie **1ml** der **Stringente Waschlösung** (vorgewärmt 46° C) zu.
- Inkubation für **15 min** bei **46° C** im Schüttelwasserbad (ca. 50 rpm).
- Saugen Sie die Lösung aus jeder Wanne ab.

Farbentwicklung (Raumtemperatur)

Alle folgenden Schritte erfolgen unter Schütteln bei Raumtemperatur. Da es zu lange dauert bis das Wasserbad Raumtemperatur erreicht, stellen Sie das Plastiktray in eine Styroporbox in das Wasserbad, um vor dem erwärmten Wasser zu isolieren und nur die Schüttelfunktion zu nutzen.

- Geben Sie **1ml Konjugat** zu.
- Inkubieren Sie **15 min** bei Raumtemperatur im Schüttelwasserbad (ca. 50 rpm).
- Saugen Sie die Lösung ab, geben Sie **1 ml** der **Waschlösung B** zu und spülen Sie kurz.
- Saugen Sie die Lösung ab, geben Sie **1 ml** der **Waschlösung B** zu.
- Inkubieren Sie **5 min** bei Raumtemperatur im Schüttelwasserbad (ca. 50 rpm).
- Saugen Sie die Lösung ab, geben Sie **1 ml** der **Waschlösung B** zu.
- Inkubieren Sie **5 min** bei Raumtemperatur im Schüttelwasserbad (ca. 50 rpm).
- Saugen Sie die Lösung ab, geben Sie **1 ml** des **Farbentwicklers** zu.
- Inkubieren Sie im Dunkeln **15 min** bei Raumtemperatur im Schüttelwasserbad (ca. 50 rpm).
- Saugen Sie den Farbentwickler ab und waschen die Streifen mit destilliertem Wasser.
- Lassen Sie die Streifen im Dunklen auf saugfähigem Papier trocknen bevor Sie die Ergebnisse interpretieren.

⇒ AUTOMATISIERTE DURCHFÜHRUNG

Mit Hilfe eines *Tecan ProfiBlot 48 (oder gleichwärtiges Gerät)* kann die Durchführung automatisiert werden. Wählen Sie das Programm "**Tipizza P**". Für jede Probe wird **10 µl PCR Produkt + 10 µl DNAT** und **1,5 ml** jeder einzelnen Reagenz verwendet.

Für mehreren Einzelheiten über die Gerätsprogrammierung, bitte sich an dem customercare@nlm.it Service wenden.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Validierung

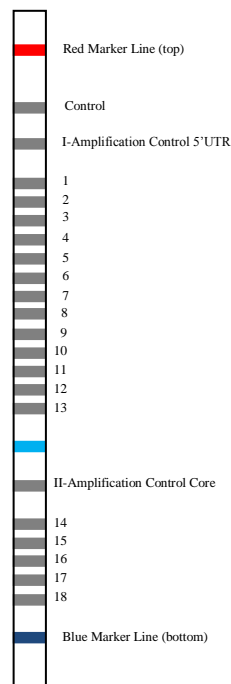
Eine positive Reaktion der obersten Konjugat-Kontroll-Bande (CC) zeigt die korrekte Durchführung an. Diese Bande muss immer erscheinen und sollte auf den Streifen eines Laufes in der gleichen Intensität erkennbar sein.

Die Farbintensität der anderen positiven Banden auf den Streifen könnte variieren. Dies beeinflusst nicht die Interpretation der Ergebnisse.

Interpretation der Ergebnisse

- Legen Sie die CC Bande des Streifens an der CC Bande der transparenten Interpretationskarte.
- Die Amplifikationskontrollbande (AC; Banden I und II) enthalten universelle Sonden konservierter Sequenzen der 5'UTR bzw. Core Region. Ihre positive Reaktion weist die Zugabe der Amplifikate und die richtige Amplifikation der entsprechenden Regionen nach.
- Notieren Sie die Nummern aller positiven Banden für jeden Streifen auf der transparenten Interpretationskarte: Das entsprechende HCV Typisierungsergebnis kann durch die Interpretationstabelle bestimmt werden (lesen Sie hierzu auch den Abschnitt diagnostische Sensitivität, um zusätzliche Informationen zu den Genotypen zu erhalten).

Streifen Schema:



Der Bereich A des Interpretationscharts zeigt die möglichen Kombinationen aus der 5'UTR Region; der Bereich B zeigt die möglichen Kombinationen aus der Core Region.

- Wenn die 5'UTR Region die Kombination der Genotypen **2, 3, 4, 5, 6a-b** oder **7a** anzeigt brauchen Sie die Core Region nicht zu analysieren. Es ist möglich die positiven Banden 14-18 der Core Region zu bestätigen, aber diese **dürfen nicht** für die Interpretation der Ergebnisse in Betracht gezogen werden.
- Wenn die 5'UTR Region die Kombination der Genotypen **1** oder **6c-t** anzeigt, muss die Interpretation mit den Banden 14-18 fortgeführt werden (Core Region) und melden Sie nur die Ergebnisse, die durch die Core Region zugeordnet werden (z.B. wenn eine Probe in der 5'UTR Region 1b anzeigt aber in der **Core Region 1a, sollte es als 1a klassifiziert werden**). Sind die Kernregion-Daten nicht verfügbar oder nicht eindeutig, ist eine Differenzierung der Genotypen 1a, 1b oder 6 nicht möglich.

Liegen die Genotypen 2, 3, 4, 5 und 7 vor, können Signale der Sonden der Core Region vorhanden sein oder nicht; diese sollten keinesfalls interpretiert werden:



Core Sonden	Genotypen, die Signale zeigen können
14	5a
15	/
16	2c, 4a, 5a
17	3
18	2, (3), 5a

FEHLERSUCHE

FALSCH NEGATIVE ODER SCHWACHE SIGNALE

- Schwache Signale können die Folge sein von:
 - einer zu hohen RNA-Konzentration während der PCR (Verdünnung notwendig) speziell für Proben mit einem sehr hohen Titer ($>1 \times 10^7$).
 - einer zu niedrigen DNA-Konzentration während der PCR für Proben mit einem niedrigen Titer ($< 2 \times 10^3$)
- Wenn alle Streifen schwache Signale zeigen, könnte dies aufgrund einer zu hohen Hybridisierungs- und/oder Stringente Waschschrütte-Temperatur bzw. **Prüfen Sie sorgfältig die Wasserbadtemperatur.**
- Hybridisierungs- oder Stringente Waschlösung wurden nicht vorgewärmt oder richtig gemischt. In diesem Falle sollte die verbliebene Lösung nicht weiter sondern eine neue verwendet werden.

FALSCH POSITIVE SIGNALE

- Wenn während des Hybridisierungs- und/oder Stringent Wasch-Schritts die Temperatur zu niedrig ist, können unspezifische Reaktionen erfolgen. **Prüfen Sie sorgfältig die Wasserbadtemperatur.**
- Stringente Waschlösung wurde nicht vorgewärmt und richtig gemischt. In diesem Falle verwerfen Sie die Lösung und verwenden eine neue.
- Wenn dasselbe unspezifische Muster eines entsprechenden Genotyps auf allen Strips sichtbar ist, ist eine Kontamination erfolgt. Wiederholen Sie den Test mit neuen Lösungen. Wenn Kontaminationen auftreten, ist es wichtig ihren Ursprung herauszufinden: Extraktion, RT und PCR Reaktionen oder Kontaminationen, die durch andere Amplikons entstanden sind. Die Verwendung von HCV positiven und negativen Kontrollen ist ratsam, den Grund der Kontamination ausfindig zu machen.

EINZELNE BANDEN NICHT HOMOGEN GEFÄRBT

Die Schüttelfrequenz ist zu niedrig. Prüfen Sie, ob alle Streifen vollständig in der Lösung eingetaucht liegen.

MUSTER ANDERS ALS DIE REGULÄREN MUSTER AUF DER TYPISIERUNGS LISTE

- Bandenmuster von zwei unterschiedlichen Typen erkennbar: die Ursache kann in Mischinfektionen oder Kreuzkontamination liegen.
- In seltenen Fällen, können Kombinationen aus Banden nicht interpretierbar sein: die Ursache kann in der Heterogenität des HCV Genoms, Mischinfektionen oder rekombinanter Stämme liegen.

In beiden Fällen empfiehlt es sich den Test zu wiederholen (beginnend mit RNA-Reinigung) und schließlich an Ihren Händler.

LEISTUNGSMERKMALE

⇒ Diagnostische Spezifität

Die Spezifität des Gen-C 2.0 Tests wurde durch die Untersuchung von 101 HCV negativen Plasma Proben analysiert. Die untersuchten Proben waren HCV-Antikörper und RNA negativ. Der Test wurde gemäß der Gebrauchsanleitung durchgeführt. Es wurden keine falschpositiven Ergebnisse gefunden, daher entspricht die Gen-C 2.0 Spezifität 100%.

⇒ Diagnostische Sensitivität

Die Sensitivität des Gen-C 2.0 Tests wurde durch die Untersuchung von Plasmaproben HCV positiver Patienten bewertet, die mit dem Kit NLM AA910/48 ver 2.0 amplifiziert wurden. Auf der Basis der in *in silico* Sequenzanalyse, ist der Kit fähig zwischen den Genotypen 1, 2, 3, 4, 5, 6 und 7, und subtypen 1a, 1b, 2a/2c, 2b, 3a, 3b, 3c, 3k, 4a, 4b, 4c/4d, 4e, 4f, 4h, 5a, 6a/6b, 6g, 6m, 6t und 7a zu unterscheiden.

Die Testvalidierung wurde mit echten Proben des Genotyps 1a, 1b, 2a/2c, 3, 3a, 4, 4c/4d, 5a und 6a durchgeführt. Die Viruslast betrug 2×10^3 und 1×10^7 IU/ml. Zur Überprüfung der Fähigkeit des Gen-C 2.0 Tests, HCV-positive Proben akkurat zu genotypisieren, wurden die Ergebnisse einzelner Proben mit den Ergebnissen alter Versionen des Tests (für Genotypen 2-5) und Sequenzierung (für Genotyp 1 und 6) verglichen; Sequenzierungsergebnisse wurden durch Vergleiche mit HCV Datenbanken und phylogenetische Analysen bestimmt.

Die Analyse wurde auf den Ebenen der Genotypen und der Subtypen 1a und 1b durchgeführt. Von den analysierten 217 Proben gaben alle Positive und damit korrekte Ergebnisse. Die gesamte Sensitivität beträgt daher 100%.

117/117 Genotype 1 Proben wurden mit dem AC004 2.0 korrekt subtypisiert und waren übereinstimmend mit der Referenzmethode. Daher beträgt die Genauigkeit des Gen-C 2.0 Tests für Subtyp 1a und 1b 100%.

Zusammenfassung der analysierten Proben und Übereinstimmung:

Genotyp	Anzahl getester Proben	Übereinstimmung zur Referenzmethode (Gen-C, sequencing or panel)
1a	30	30
1b	87	87
2a/2c	37	37
3a	22	22
3	10	10
4c/4d	21	21
4	2	2
5a	6	6
6a/6b	2	2

Reproduzierbarkeit

- INTRA-ASSAY Reproduzierbarkeit (Präzision innerhalb der Serie).

Die intra-Assay Reproduzierbarkeit wurde durch die Verwendung von 3 Proben aus 3 verschiedenen Genotypen in 3 Wiederholungen bewertet. Dieselben 3 Proben wurden mit zwei verschiedenen Chargen durch zwei unterschiedliche Anwender getestet.

- INTER-ASSAY Reproduzierbarkeit (Präzision von Serie zu Serie).

Die inter-Assay Reproduzierbarkeit wurde durch die Verwendung von 3 Proben aus verschiedenen Genotypen durch 3 unterschiedliche Anwender in verschiedenen Läufen, Tagen und verschiedenen Chargen bewertet. Der Test wurde gemäß der Gebrauchsanleitung durchgeführt. Die Präzision aller Schritte für die Verfahren wurde bewertet. Die Reproduzierbarkeit für den Gen-C 2.0 Test beträgt 100%.

