

COBAS® AMPLICOR® HBV MONITOR Test

HBM

PRO *IN VITRO* DIAGNOSTICKÉ POUŽITÍ.

| | | | | |
|------------------|--------------------------------------|-----|---------------------------------|--|
| Objednáací údaje | COBAS® AMPLICOR® HBV MONITOR Test | HBM | 48 kvantitativních stanovení | P/N: 03610110 190 |
| | COBAS® AMPLICOR® Promývací pufr | WB | 500 testů | P/N: 20759899 123 ART: 07 5989 9 US: 83314 |

Účel použití

COBAS® AMPLICOR® HBV MONITOR Test je amplifikační test nukleové kyseliny *in vitro* ke stanovení DNA viru hepatitidy B (HBV) v lidské plazmě nebo séru analyzátozem COBAS® AMPLICOR®. Test je schopen stanovit množství DNA HBV v rozmezí od 60 do 38 000 mezinárodních jednotek (IU)/ml (300 až 200 000 DNA HBV kopií/ml).

Test COBAS® AMPLICOR® HBV MONITOR není určen k plošnému vyšetřování krve či krevních derivátů na přítomnost HBV, ani jako diagnostický test k potvrzení infekce virem HBV.

Souhrn a princip testu

Virus hepatitidy B (HBV) je jedním z mnoha virů, o nichž je známo, že způsobují virovou hepatitidu. Více než dvě miliardy lidí na celém světě je infikováno HBV a přes 350 miliónů jsou chronicky infikovaní nosiči¹. Genotypy viru hepatitidy B jsou určovány na základě divergence uvnitř genomu větší než 8 %^{2,3}. Na základě tohoto kritéria bylo zaznamenáno 8 genotypů viru hepatitidy B (označeny velkými písmeny abecedy od A po H), které se vyznačovaly rozdílnými zeměpisnými charakteristikami^{4,5}. Genotyp A je pandemický, ale predominantní v Evropě, Severní Americe a Střední Africe⁴. Genotypy B a C se nacházejí zejména na Dálném Východě a v Jihovýchodní Asii⁴. Genotyp D je také pandemický, ale vyskytuje se nejvíce v oblasti Středozemního moře, na Středním Východě a v Indii⁴. Genotyp E se predominantně vyskytuje v Africe, zatímco genotyp F se nachází u amerických domorodců a v Polynésii⁴. Genotyp G viru hepatitidy B byl popsán u pacientů z USA, Francie, Německa a Mexika^{4,5,6}. Nedávno byl zaznamenán nový, osmý genotyp HBV (genotyp H). Tento genotyp vyskytující se u chronických nosičů HBsAg ve Střední Americe je pravděpodobně odštěpený od blízkce příbuzného genotypu F Amerických Indiánů⁷. Současné studie zaznamenaly až 10,9% ko-infekci genotypy HBV, když nejvyšší míra ko-infekce je hlášena u genotypů A a G⁷.

Chroničtí nosiči jsou vystaveni vysokému riziku dlouhodobých komplikací infekce zahrnujících chronickou hepatitidu, cirhózu a hepatocelulární karcinom^{8,9,10}. Sérologické markery jsou běžně používány jako diagnostické a/nebo prognostické indikátory akutní nebo chronické HBV infekce. Nejběžnější marker HBV infekce je přítomnost povrchového antigenu HBV (HBsAg). I když mohou nosiči odstranit HBsAg a vytvořit si protilátky proti HBsAg, tak se zdá, že dále existuje riziko závažných jaterních komplikací později v průběhu života^{11,12}. HBV e antigen (HBeAg) je obecně používán jako sekundární marker ukazující aktivní replikaci HBV spojenou s progresivním jaterním onemocněním. Zdá se, že pokud nedojde k odstranění HBeAg, zvyšuje se riziko konečného stádia jaterního onemocnění^{13,14}. Různé kmeny HBV mohou produkovat buď HBeAg, který není detekovatelný v séru nebo může kmen ztratit schopnost vytvářet HBeAg, i když je přítomna aktivní infekce¹⁵. Proto může mít tento marker omezené využití při sledování progresu onemocnění¹⁶. Bylo zjištěno, že schopnost detekce HBV DNA v séru má prognostickou hodnotu s ohledem na výsledek akutní a chronické HBV infekce^{17,18,19,20}. Metodologie umožňuje detekci HBV DNA po vymizení HBsAg²¹ nebo detekci HBV při nedostatku sérologických markerů²². Nicméně vztah mezi sérologickými markery a hladinami HBV DNA nebyl ještě dosud stanoven. Účinnost antivirové terapie použité pro léčbu pacientů s HBV může být také hodnocena pomocí sérologických markerů nebo měření jaterních enzymů. Nicméně se soudí, že nejpřímějším a nejspolehlivějším měřením replikace viru je kvantifikace virové HBV DNA v séru nebo plazmě^{19,23,24,25}. Rychlý a trvalý pokles hladin HBV DNA u pacientů léčených alfa-interferonem, Lamivudinem nebo Gancyklovirem byl prokázán jako prediktivní faktor úspěšného výsledku léčby^{16,26,27,28,29,30}. Monitorování hladin HBV DNA může předpovědět rozvoj rezistence na Lamivudin³¹. Proto je cenným nástrojem kvantitativní test pro měření HBV DNA, který je možné použít spolu s dalšími sérologickými markery v léčbě HBV infekce.

Principy metody

Test COBAS® AMPLICOR® HBV MONITOR je založen na čtyřech základních postupech: přípravě vzorků, PCR amplifikaci^{32,33} cílové DNA za použití HBV- specifických komplementárních primerů, hybridizaci amplifikovaných produktů na oligonukleotidové sondy specifické pro daný cíl (cíle) a detekci amplifikovaných produktů navázaných na sondu kolorimetrickým měřením.

Test COBAS® AMPLICOR® HBV MONITOR dovoluje simultánní PCR amplifikaci HBV a kvantifikačního standardu HBV DNA. Činidlo Master Mix obsahuje pár primerů specifických jak pro HBV DNA, tak i pro kvantifikačního standardu HBV DNA.

Stanovení množství virové HBV DNA se provádí pomocí kvantifikačního standardu HBV. Kvantifikační standard HBV je neinfekční lineární plazmid, který obsahuje identická místa pro vazbu primeru jako cílová HBV DNA a unikátní oblast pro navázání sondy, díky které se dá amplikon kvantifikačního standardu HBV odlišit od cílového amplikonu HBV. Kvantifikační standard HBV je inkorporován do každého jednotlivého vzorku ve známém počtu kopií a společně s cílovým HBV prochází procesem přípravy vzorku, PCR amplifikací, hybridizací a detekčními kroky. Analyzátor COBAS® AMPLICOR® vypočítává hladiny HBV DNA v testovaných vzorcích tak, že u každého vzorku porovnává signál cílového HBV se signálem HBV kvantifikačního standardu.

HBV kvantifikačním standardem se kompenzují inhibiční efekty a kontroluje se amplifikační proces tak, aby bylo možno v každém vzorku přesně stanovit HBV DNA.

Příprava vzorku

HBV DNA je izolována přímo ze séra nebo plazmy pomocí precipitace polyethylenglykolu (PEG) s následným odstředěním. HBV DNA je získána lýzou peletizovaných virových částic s alkalickým roztokem. K získání příslušných pufovacích podmínek je přidáno neutralizační činidlo. Do každého vzorku se společně s činidlem pro lýzu zavádí známý počet molekul kvantifikačního standardu HBV DNA. Kvantifikační standard HBV prochází stádií přípravy vzorku, amplifikace, hybridizace a detekce a slouží ke stanovení množství HBV DNA ve zkušební vzorku.

PCR Amplifikace

Volba cíle

Výběr cílové sekvence DNA pro HBV závisí na identifikaci oblastí v genomu HBV, které vykazují maximální zachování sekvencí na úrovni DNA mezi všemi genotypy. V této souvislosti má pro schopnost testu detekovat klinicky relevantní genotypy HBV zásadní význam vhodná volba primerů a sondy. Bylo zjištěno, že oblast částečně jednořetězcové cirkulární DNA v genomu HBV má maximální zachované DNA sekvence mezi jednotlivými HBV genotypy. Test COBAS® AMPLICOR® HBV MONITOR používá primery HBV-104UB a HBV-104D pro určení sekvence 104 nukleotidů ve vysoce konzervované oblasti pre-Core/Core genomu HBV. DNA je amplifikována s použitím jednoho biotinylovaného a jednoho nebiotinylovaného oligonukleotidového primeru. Bylo ukázáno, že nukleotidová sekvence primerů poskytuje ekvivalentní amplifikaci genotypů A a E. Sekvenční variace nesmí vyústit ve sníženou amplifikaci HBV genotypu F a sníženou detekci genotypu G. Údaje o výkonnosti primerů a sond testu COBAS® AMPLICOR® HBV MONITOR u nově popsanych HBV genotypů H nejsou doposud dostupné.

Cílová amplifikace

Zpracované vzorky se přidávají do amplifikační směsi v amplifikačních zkumavkách (A-zkumavkách), ve kterých dochází k PCR amplifikaci. Tepelný cyklizátor analyzátoru COBAS® AMPLICOR® reakční směs zahřívá, aby se dvouřetězcová DNA denaturovala a exponovala specifické primerové cílové sekvence na HBV cirkulárním DNA genomu. Jak směs vychládá, biotinylovaný HBV-104UB primer a HBV-104D primer se váží na cílovou DNA. Tepelně stabilní rekombinantní enzym *Thermus aquaticus* DNA polymeráza (*Taq* pol), za přítomnosti hořčíku (Mg^{2+}) a nadbytku deoxynukleozid-trifosfátů (dNTPs), tj. deoxyadenozin-, deoxyguanozin-, deoxycytidin- a deoxyuridin- (místo deoxythymidin-) trifosfátů, prodlužuje primery annealingu podél terčového templátu a vytváří molekulu dvouřetězcové DNA s 104 párem bází, nazývanou amplikon. Analyzátor COBAS® AMPLICOR® tento postup automaticky opakuje ve stanoveném počtu cyklů, přičemž v každém cyklu se množství amplikonové DNA efektivně zdvojnásobuje. Požadovaný počet cyklů se na analyzátoru COBAS® AMPLICOR® předem naprogramuje. Amplifikace probíhá pouze v oblasti genomu HBV mezi primery, celý genom HBV amplifikován není.

Selektivní amplifikace

Selektivní amplifikace cílové nukleové kyseliny z klinického vzorku se dosahuje v testu COBAS® AMPLICOR® HBV MONITOR použitím enzymu AmpErase (uracil-N-glykosylázy) a deoxyuridin-trifosfátu (dUTP). Enzym AmpErase rozpozná a katalyzuje rozklad řetězců DNA obsahujících deoxyuridin³², ale nikoli DNA obsahující deoxytymidin. Deoxyuridin se v přirozené DNA nevyskytuje, je však vždy přítomen v amplikonu díky použití deoxyuridin-trifosfátu jako jednoho z dNTPs v činidle Master Mix, takže deoxyuridin obsahuje pouze amplikon.

V důsledku přítomnosti deoxyuridinu je kontaminující amplikon citlivý vůči destrukci enzymem AmpErase před amplifikací cílové DNA. Enzym AmpErase, který je obsažen v činidle Master Mix, katalyzuje štěpení DNA obsahující deoxyuridin v místě deoxyuridinového zbytku rozevřením deoxyribozového řetězce v pozici C1. Během zahřívání v prvním tepelném cyklu při alkalickém pH činidla Master Mix se DNA řetězec amplikonu štěpí v poloze deoxyuridinu, čímž se tato DNA stává neamplifikovatelnou. Při teplotách nad 55°C, tedy během tepelného cyklování, je AmpErase inaktivní, a proto cílový amplikon nerozkládá.

Po amplifikaci se případný zbytkový enzym denaturuje přidávkem denaturačního roztoku, čímž se předchází degradaci cílového amplikonu. Je prokázáno, že enzym AmpErase v testu COBAS® AMPLICOR® HBV MONITOR inaktivuje minimálně 10³ kopií deoxyuridin-obsahujícího HBV amplikonu na jednu PCR.

Hybridizační reakce

Po PCR amplifikaci přidává analyzátor COBAS® AMPLICOR® automaticky do A-zkumavek denaturační roztok k chemické denaturaci ampliconu HBV a kvantifikačního standardu HBV a vytváří jednořetězcovou DNA. K dosažení kvantitativních výsledků v širokém dynamickém rozmezí ředí analyzátor COBAS® AMPLICOR® denaturovaný amplicon sériově v detekčních kelímcích (D-kelímcích). Ke každému ze čtyř zředěných roztoků ampliconu HBV (HBV DET) resp. ze dvou zředěných roztoků kvantifikačního standardu HBV (SK535) se přidá suspenze magnetických částic potažených oligonukleotidovou sondou specifickou pro daný amplicon, tj. pro amplicon HBV nebo pro kvantifikační standard HBV. Biotinem značený amplicon je hybridizován k terčově specifické oligonukleotidové sondě vázané na magnetické částice. Pro každé kvantitativní stanovení je zapotřebí čtyř nezávislých měření absorbance činidla za použití suspenze sondy HBV a dvou měření absorbance za použití suspenze sondy pro kvantifikační standard HBV.

Detekční reakce

Po hybridizační reakci opláchne analyzátor COBAS® AMPLICOR® v D-kelímku magnetické částice, aby se odstranil nenavázaný materiál, a následně přidá konjugát avidinu s křenovou peroxidázou. Tento konjugát se váže na biotinem značený amplicon hybridizovaný na terčově specifické oligonukleotidové sondy navázané na magnetické částice. Nenavázaný konjugát pak analyzátor COBAS® AMPLICOR® propláchnutím magnetických částic odstraní a do každého D-kelímku přidá roztok substrátu obsahující peroxid vodíku a 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB). Za přítomnosti peroxidu vodíku katalyzuje navázaná křenová peroxidáza oxidaci TMB na barevný komplex, jehož absorbance u 660 nm se analyzátořem COBAS® AMPLICOR® proměřuje.

Kvantifikace HBV DNA

Test COBAS® AMPLICOR® HBV MONITOR stanovuje množství DNA HBV viru pomocí druhé cílové sekvence (kvantifikační standard HBV), který je do testovaného vzorku přidán o známé koncentraci. Kvantifikační standard HBV je neinfekční molekula linearizované plazmidové DNA s 2 766 nukleotidy s vazebnými oblastmi primeru stejnými jako v cílové sekvenci HBV. Kvantifikační standard HBV obsahuje vazebná místa pro primer HBV-104UB a HBV-104D a vytváří amplicon téže délky (104 bází) a složení bází jako v cílové HBV DNA. Vazebná oblast detekční sondy v ampliconu kvantifikačním standardu HBV je modifikována tak, aby se amplicon kvantifikačního standardu HBV odlišil od cílového ampliconu HBV.

V lineárním rozsahu testu je absorbance při 660 nm (A_{660}) pro každý D-kelímk úměrná množství ampliconu HBV resp. ampliconu kvantifikačního standardu HBV v něm. Analyzátor COBAS® AMPLICOR® nejprve vypočítá celkovou absorbanci HBV a kvantifikačního standardu HBV vynásobením absorbance D-kelímku faktorem zředění ampliconu v daném D-kelímku a poté vybere D-kelímk o nejvyšší celkové absorbanci. Vypočtená celková absorbance je úměrná množství HBV DNA nebo kvantifikačního standardu HBV DNA přítomné v každé PCR amplifikační reakci. Množství HBV DNA v každém vzorku se pak vypočte z poměru celkové absorbance HBV k celkové absorbanci kvantifikačního standardu HBV a vstupního počtu molekul kvantifikačního standardu HBV DNA podle následující rovnice:

$$\left[\frac{\text{Total HBV } A_{660}}{\text{Total QS } A_{660}} \right]^{AF} \times \text{Input HBV QS IU/PCR} \times 45 = \text{HBV DNA IU/ml}$$

- kde: Total HBV A_{660} = vypočtená celková absorbance ampliconu HBV
- Total QS A_{660} = vypočtená celková absorbance ampliconu kvantifikačního standardu
- Input HBV QS IU/PCR = počet mezinárodních jednotek (IU) v kvantifikačnímu standardu v každé reakci; toto číslo je specifické pro danou šarži
- 45 = přepočítávací faktor pro převod z IU/PCR na IU/ml
- AF = Upravovací faktor (AF= 1,11)

Činidla


COBAS® AMPLICOR® 48 kvantitativních P/N: 03610110 190
HBV MONITOR Test HBM stanovení

Činidla pro přípravu vzorku

HBM PREP

HBM LYS 1 4 x 0,6 ml
 (Činidlo pro lýzu HBV MONITOR 1)
 22,5% PEG 8000
 0,09% azid sodný

HBM LYS 2 4 x 1,4 ml
 (Činidlo pro lýzu HBV MONITOR 2)
 0,4% hydroxid sodný

Xi  0,4% hm. hydroxid sodný

Dráždivý

HBM LYS 3 4 x 1,2 ml
 (Činidlo pro lýzu HBV MONITOR 3)
 Pufr Tris-HCl
 0,09% azid sodný

HBV QS 4 x 0,05 ml
 (HBV MONITOR kvantifikační standard)
 Tris pufr
 < 0,001% neinfekční linearizovaná plazmidová DNA
 (mikrobiální) obsahující sekvence vážící HBV primer
 a jedinečnou oblast vážící sondu
 < 0,005% Poly rA RNA (syntetická)
 EDTA
 0,09% azid sodný

Kontrolní činidla

HBM CTL

NHP 4 x 0,6 ml
 [Negativní plazma (lidská)]
 Nereaktivní lidská plazma používaná při testech licencovaných
 US FDA na protilátky proti HCV, protilátky proti HIV-1/2,
 antigen HIV p24 a HBsAg; HIV-1 RNA, HCV RNA
 a HBV DNA nedetekovatelnými metodami PCR
 0,1% konzervační činidlo ProClin® 300

HBV (-) C 4 x 0,25 ml
 [HBV MONITOR (-) kontrola]
 Tris pufr
 < 0,005% Poly rA RNA (syntetická)
 EDTA
 0,09% azid sodný

HBV L(+)C 4 x 0,025 ml
 [HBV MONITOR Low (+) kontrola]
 Tris pufr
 < 0,001% neinfekční linearizovaná plazmidová DNA
 (mikrobiální) obsahující HBV sekvence
 < 0,005% Poly rA RNA (syntetická)
 EDTA
 0,09% azid sodný

HBV H(+) 4 x 0,025 ml
 [HBV MONITOR High (+) kontrola]
 Tris pufr
 < 0,001% neinfekční linearizovaná plasmidová DNA
 (mikrobiální) obsahující HBV sekvence
 < 0,005% Poly rA RNA (syntetická)
 EDTA
 0,09% azid sodný

Amplifikační činidla

HBM AMP


HBM MMX 4 x 0,7 ml
 (HBV MONITOR Master Mix)
 Tris pufr
 Glycerol
 < 0,001% *Taq* DNA polymeráza (*Taq* pol, mikrobiální)
 Sulfát amonný
 < 0,5% dATP, dCTP, dGTP, dUTP
 HBV-104UB a HBV-104D primery (HBV-104UB
 je biotinylovaný)
 < 0,001% enzym AmpErase (uracil-N-glykosyláza)
 (mikrobiální)
 < 0,5% Detergent
 0,09% azid sodný

HBM Mg²⁺ 4 x 0,1 ml
 (Hořčikové činidlo HBV MONITOR)
 < 2,0% chlorid hořečnatý
 Amarantové barvivo
 0,09% azid sodný

Specifická detekční činidla

HBM DK

AD3 2 x 75 testů
 (Ředící činidlo na amplikon)
 EDTA
 0,8% hydroxid sodný

Xi  0,8% hm. hydroxid sodný

Dráždivý

BM PS1 2 x 100 testů
 (Suspenze sondy HBV MONITOR č. 1)
 MES pufr
 < 0,4% suspenze paramagnetických
 částic Dynabeads® potažených HBV-specifickou
 oligonukleotidovou záchytnou sondou (HBV DET)
 0,09% azid sodný


BM4 2 x 100 testů
 (Suspenze sondy HBV MONITOR č. 2)
 Pufr s fosforečnanem sodným
 < 0,2% Detergent
 24,9% thiokyanát sodný

BQ PS1 2 x 100 testů
 (Suspenze sondy kvantifikačního standardu HBV MONITOR 1)
 MES pufr
 < 0,2% suspenze Dynabeads (paramagnetické částice) potažených oligonukleotidovou záchytnou sondou (SK535) specifickou pro kvantifikační standard HBV
 0,09% azid sodný

BQ4 2 x 100 testů
 (Suspenze sondy kvantifikačního standardu HBV MONITOR 2)
 Pufr s fosforečnanem sodným
 < 0,2% Detergent
 15,9% thiokyanát sodný

Generická detekční činidla


DK

DN4 2 x 100 testů
 (Denaturační roztok)
 1,6% hydroxid sodný
 EDTA
 Thymolová modř
 Xi  1,6% hm. hydroxid sodný
 Dráždivý

CN4 3 x 100 testů
 (Konjugát avidinu s křenovou peroxidázou)
 Pufr Tris-HCl
 < 0,001% konjugát avidinu s křenovou peroxidázou
 Albumin bovinního séra (savčí)
 Emulsit 25 (Dai-ichi Kogyo Seiyaku Co., Ltd.)
 0,1% fenol
 1% konzervační činidlo ProClin® 150

SB3 5 x 75 testů
 (Substrát A)
 Citrátový pufr
 0,01% peroxid vodíku
 0,1% konzervační činidlo ProClin® 150

SB 5 x 5 ml
 (Substrát B)
 0,1% 3,3',5,5'-tetrametylbenzidin (TMB)
 40% dimethylformamid (DMF)

T  40% hm. dimethylformamid (DMF)
 Toxický

R: 61-20/21-36 Může poškodit plod v těle matky. Zdraví škodlivý při vdechování a při styku s kůží. Dráždí oči.

S: 53-45 Zamezte expozici – před použitím si obstarajte speciální instrukce. V případě nehody, nebo necítíte-li se dobře, okamžitě vyhledejte lékařskou pomoc (je-li možno, ukažte tento štítek).

COBAS® AMPLICOR®
Wash Buffer
COBAS® AMPLICOR® Promývací pufr

WB

500 testů P/N: 20759899 123
ART: 07 5989 9
US: 83314

WB
(Promývací koncentrát 10X)
< 2% fosfátový pufr
< 9% chlorid sodný
EDTA
< 2% Detergent
0,5% konzervační činidlo ProClin® 300

2 x 250 testů

Upozornění a bezpečnostní pokyny

Pro účely diagnostiky *in vitro*.

Test se používá pouze s lidským sérem nebo plazmou odebranou v antikoagulantech EDTA nebo ACD. **Heparin inhibuje PCR a při tomto postupu je jeho použití zakázáno.**

Nepipetovat ústy.

V pracovních laboratorních prostorách nejíst, nepít a nekouřit. Při manipulaci se vzorky a činidly ze soupravy noste ochranné rukavice na jedno použití, laboratorní plášť a prostředek ochrany očí. Po práci se vzorky a zkušebními činidly si důkladně umyjte ruce.

Při odebírání alikvotních podílů z lahvíček s činidly dbejte na to, aby nedošlo k mikrobiální kontaminaci. Doporučuje se používat sterilní pipety na jedno použití a špičky na pipety prosté DNázy.

Nesměšujte dohromady činidla z různých šarží, ani z různých lahvíček téže šarže.

Nespotřebovaná činidla a odpad likvidujte v souladu s celostátními a místními předpisy.

Po uplynutí data expirace již soupravu nepoužívejte.

Bezpečnostní listy pro materiály (MSDS) zašle na vyžádání Vaše místní pobočka společnosti Roche.

Pracovní tok v laboratoři musí probíhat jednosměrným způsobem, začínaje v preamplifikační oblasti s přesunem do poamplifikační oblasti (amplifikace/detekce). Preamplifikační činnosti musí začínat přípravou činidel a pokračují přípravou vzorků. Materiály a vybavení se musejí přiřadit jednotlivým preamplifikačním činnostem a nesmějí se používat k žádným jiným činnostem, ani se nesmějí přenášet mezi jednotlivými vyhrazenými prostory. Ve všech prostorách je nutné nosit rukavice, které se před opuštěním prostoru vymění. Vybavení a materiály pro přípravu činidla se nesmějí používat k přípravě vzorků, ani pro pipetování nebo zpracování amplifikovaných produktů či jiných zdrojů cílové DNA. Poamplifikační materiály a vybavení musí vždy zůstat v poamplifikačním prostoru.

Se vzorky je třeba zacházet jako s infekčními za použití bezpečných laboratorních postupů, například těch, jež jsou popsány v publikaci *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*³⁵ nebo v dokumentu CLSI č. M29-A³⁶. Všechny plochy důkladně očistěte a vydezinfikujte čerstvě připraveným 0,5% roztokem chlornanu sodného v destilované nebo deionizované vodě.

Poznámka

Běžné bělicí prostředky pro domácnost obvykle obsahují chlornan sodný v koncentraci 5,25%. Roztok chlornanu sodného o koncentraci 0,5% tak dostanete zředěním bělidla pro domácnost v poměru 1:10.

POZOR: Souprava obsahuje složku (**NHP**) odvozenou z lidské krve. Zdrojový materiál byl analyzován pomocí testů schválených US FDA a byl shledán nereaktivním vůči protilátkám proti HCV, protilátkám proti HIV-1/2, antigenu HIV p24 a povrchovému antigenu hepatitidy B (HBsAg). Testování negativní lidské plazmy metodami PCR neprokázalo žádné detekovatelné HIV-1 RNA, HCV RNA ani HBV DNA. Nicméně žádná známá testovací metoda nepředstavuje dokonalou záruku, že se s deriváty z lidské krve nepřenesou nějaká infekční agens. Proto je třeba považovat všechny materiál lidského původu za potenciálně infekční. S **NHP** je třeba zacházet jako s infekčním a při práci s ním je nutno uplatňovat bezpečné laboratorní postupy, například ty, které jsou uvedeny v publikaci *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*³⁵ nebo v dokumentu CLSI M29-A³⁶. Všechny pracovní plochy důkladně očistěte a vydezinfikujte čerstvě připraveným 0,5% roztokem chlornanu sodného v destilované nebo deionizované vodě.

HBM LYS 1, HBM LYS 3, HBM QS, HBV (-) C, HBV L(+)C, HBV H(+)C, HBM MMX, HBM Mg²⁺, BM PS1 a BQ PS1 obsahují azid sodný. Ten může reagovat s olověnými nebo měděnými armaturami a vytvářet vysoce explozivní kovové azidy. Při likvidaci roztoků obsahujících azid sodný nakloňte laboratorní umyvadla a propláchněte odtok velkým množstvím vody, abyste tak zabránili nárůstu množství azidu.

Při práci s **HBM LYS 1, HBM LYS 2, HBM LYS 3, HBM MMX, DN4, AD3, BM4, BQ4, CN4, SB3, SB** a pracovním substrátem (směs činidel **SB3** a **SB**) noste prostředek ochrany očí, pracovní plášť a rukavice na jedno použití. Dbejte na to, aby se tyto materiály nedostaly do styku s pokožkou, očima nebo sliznicemi. Pokud ke styku dojde, okamžitě postiženou oblast omyjte velkým množstvím vody. Pokud by byla tato opatření zanedbána, může dojít k popáleninám. Jestliže se některá činidla rozlijí nebo rozsypou, rozředte je vodou a dosucha vytřete.

Dbejte, aby se **SB** nebo pracovní substrát nedostal do styku s pokožkou nebo sliznicemi. Pokud se některá z těchto látek do styku s pokožkou dostane, okamžitě ji omyjte velkým množstvím vody.

SB a pracovní substrát obsahují dimethylformamid, který je ve vysokých orálních dávkách toxický a může poškodit plod. Je třeba dbát, aby nedošlo k jejich styku s pokožkou, vdechování výparů ani požití. Pokud ke styku s pokožkou dojde, omyjte ji důkladně vodou a mýdlem a vyhledejte okamžitě lékařskou pomoc.

BM4 a **BQ4**, které obsahují thiokyanát sodný, se nesmí dostat do styku s roztokem chlornanu sodného (bělicím prostředkem). Ze směsi by se mohl uvolňovat vysoce toxický plyn.

Vzorek i kontrolní preparát se musí uchovávat ve zkumavkách se šroubovacím uzávěrem, aby nemohl vystříknout a nemohlo dojít ke vzájemné (křížové) kontaminaci vzorků. **Zkumavky s nasazovacím uzávěrem nepoužívejte.**

Požadavky na skladování a manipulaci

Činidla nezmrazujte.

Skladujte **HBM LYS 1**, **HBM LYS 2**, **HBM LYS 3** a **HBM QS** při 2-8°C. Pokud jsou neotevřeny, jsou tyto činidla stabilní do uvedeného data expirace. Po otevření je třeba nespoteřovanou část zlikvidovat.

Pracovní činidlo pro lýzu č. 2 (připravené tak, že se k **HBM QS** přidá **HBM LYS 2**) se uchovává za pokojové teploty a musí se spotřebovat do 2 hodin od přípravy.

HBM MMX a **HBM Mg²⁺** uchovávejte při teplotě 2-8°C. Činidla jsou stálá do vyznačeného data expirace. Po otevření je třeba nespoteřovanou část zlikvidovat. Working Master Mix (připravené tak, že se **HBM Mg²⁺** přidá k **HBM MMX**) musí být uchováno při teplotě 2-8°C a je při teplotě 2-8°C stabilní po dobu 4 hodin.

NHP, **HBV (-) C**, **HBV L(+)**C a **HBV H(+)**C uchovávejte při teplotě 2-8°C. Činidla jsou stabilní až do vyznačeného data expirace. Po otevření je třeba nespoteřovanou část zlikvidovat.

AD3 skladujte při teplotě 2-8°C. Jakmile otevřeno, **AD3** je stabilní po dobu 30 dnů při teplotě 2-8°C nebo do vyznačeného data expirace, cokoli je dříve. **AD3** se dá použít maximálně na čtyři 24-hodinové přístrojové cykly a mezi cykly se musí uchovávat při teplotě 2-8°C.

BM PS1 a **BM4** uchovávejte při teplotě 2-8°C. Činidla jsou stabilní do vyznačeného data expirace. Pracovní činidlo připravené smísením **BM PS1** s **BM4** se uchovává při teplotě 2-8°C, při které je stabilní 30 dní. Dá se použít nanejvýš na čtyři 24-hodinových přístrojových cyklů a mezi cykly se musí uchovávat při teplotě 2-8°C.

BQ PS1 a **BQ4** uchovávejte při teplotě 2-8°C. Činidla jsou stabilní do vyznačeného data expirace. Pracovní činidlo připravené smísením **BQ PS1** s **BQ4** se uchovává při teplotě 2-8°C, při které je stabilní 30 dní. Dá se použít nanejvýš na čtyři 24-hodinové přístrojové cykly a mezi cykly se musí uchovávat při teplotě 2-8°C.

DN4 uchovávejte za teplot 2-25°C. **DN4** je stále do vyznačeného data expirace. Po otevření je **DN4** při teplotě 2-8°C stále 30 dní (resp. do data expirace, pokud je tato doba kratší). **DN4** se dá použít maximálně na čtyři 24-hodinové přístrojové cykly a mezi cykly se musí uchovávat při teplotě 2-8°C.

CN4 uchovávejte při teplotě 2-8°C. **CN4** je stále do vyznačeného data expirace. Po otevření je **CN4** činidlo při teplotě 2-8°C stabilní 30 dní (resp. do data expirace, pokud je tato doba kratší). **CN4** se dá použít maximálně na čtyři 24-hodinové přístrojové cykly a mezi cykly se musí uchovávat při teplotě 2-8°C.

SB3 a **SB** uchovávejte při teplotě 2-8°C. Dokud jsou neotevřená, jsou tato činidla stabilní do vyznačeného data expirace. Pracovní substrát se denně připravuje smísením **SB3** s **SB**. Pracovní substrát je v analyzátoru COBAS® AMPLICOR® stabilní po dobu 16 hodin. **SB3**, **SB** ani pracovní substrát nesmí přijít do styku s kovy ani s oxidačními činidly a nesmí se vystavovat přímému světlu.

Uchovávejte **WB** při teplotě 2-30°C. **WB** je stabilní do vyznačeného data expirace. Před naředěním **WB** prohlédněte; zpozorujete-li sraženinu, rozpustte ji zahřátím kapaliny na teplotu 30-37°C. Pracovní promývací pufr (1X), připravený zředěním činidla **WB** destilovanou nebo deionizovanou vodou v poměru 1:10, se v rezervoáru promývacího pufru přístroje COBAS® AMPLICOR® uchovává za teplot 2-25°C, kdy je stálý 2 týdny ode dne přípravy.

Částečně spotřebovaná detekční činidla uchovávejte mezi jednotlivými měřeními při teplotě 2-8°C. Před vložením do analyzátor COBAS® AMPLICOR® Analyzer zkontrolujte, zda otevřeným nebo pracovním činidlem nevypršela doba použitelnosti.

K dalšímu použití neúplně spotřebovaných detekčních činidel opětovně vložte činidla do stejného analyzátor COBAS® AMPLICOR®.

Materiály, jež jsou součástí dodávky

**COBAS® AMPLICOR®
HBV MONITOR Test**

HBM

P/N: 03610110 190

Činidla pro přípravu vzorků

HBM PREP

HBM LYS 1

(Činidlo pro lýzu HBV MONITOR 1)

HBM LYS 2

(Činidlo pro lýzu HBV MONITOR 2)

HBM LYS 3

(Činidlo pro lýzu HBV MONITOR 3)

HBM QS

(HBV MONITOR kvantifikační standard)

Kontrolní činidla

HBM CTL

NHP

[Negativní plazma (lidská)]

HBV (-) C

[HBV MONITOR (-) kontrola]

HBV L(+)C

[HBV MONITOR Low (+) kontrola]

HBV H(+)C

[HBV MONITOR High (+) kontrola]

Amplifikační činidla

HBM AMP

HBM MMX

(HBV MONITOR Master Mix)

HBM Mg²⁺

(Hořčíkové činidlo HBV MONITOR)

Specifická detekční činidla

HBM DK

AD3

(Ředící činidlo na amplikon)

BM PS1

(Suspenze sondy HBV MONITOR č. 1)

BM4

(Suspenze sondy HBV MONITOR č. 2)

BQ PS1

(Suspenze sondy kvantifikačního standardu HBV MONITOR 1)

BQ4

(Suspenze sondy kvantifikačního standardu HBV MONITOR 2)

Generická detekční činidla

DK

DN4

(Denaturační roztok)

CN4

(Konjugát avidinu s křenovou peroxidázou)

SB3

(Substrát A)

SB

(Substrát B)

COBAS® AMPLICOR®**Wash Buffer**

COBAS® AMPLICOR® Promývací pufr

WB

P/N: 20759899 123

ART: 07 5989 9

US: 83314

WB

(Promývací koncentrát 10X)

Potřebné materiály, jež nejsou součástí dodávky

Preamplifikace – prostor pro přípravu činidel

- A-kruh COBAS® AMPLICOR® osazený dvanácti A-zkumavkami (ART: 10 4563 6; P/N: 21045636001)
- Držák A-kruhu COBAS® AMPLICOR®
- Plastový uzavíratelný vak
- Vířivý mixér
- Pipetu Eppendorf Multipette® s dvanácti zásobníky Eppendorf Combitip® se špičkou pro objem 1,25 ml (sterilní, jednotlivě balené)
- Pipetory (objem 50 µl a 100 µl)* s aerosolovou bariérou nebo s pozitivními vyměnitelnými špičkami
- Rukavice na jedno použití bez pudru

Preamplifikace - prostor pro přípravu vzorků a kontrol

- 1,5 ml polypropylenové zkumavky se šroubovacím uzávěrem sterilní, nesilikonované, konické (Sarstedt 72.692.105 nebo ekvivalentní)**
- Stojany na zkumavky (Sarstedt 93.1428 nebo ekvivalentní)
- Sterilní přenosové pipety s tenkou špičkou
- Pipetu Eppendorf Multipette® s dvanácti zásobníky Eppendorf Combitip® se špičkou pro objem 1,25 ml (sterilní, jednotlivě balené)
- Pipetory (objem 25 µl, 50 µl a 100 µl)* s aerosolovou bariérou nebo s pozitivními vyměnitelnými špičkami
- Mikrocentrifuga (max. RCF 16 000 x g, min. RCF 12 500 x g); Eppendorf 5415C, HERMLE Z230M nebo ekvivalentní
- Vířivý mixér
- 60°C ± 2°C termoblok
- 100°C ± 2°C termoblok
- Rukavice na jedno použití bez pudru

Poamplifikace – prostor pro amplifikaci a detekci

- Analyzátor COBAS® AMPLICOR® s tiskárnou
- *Příručka operátora* k analyzátoru COBAS® AMPLICOR®
 - Volitelně: software AMPLILINK
 - Volitelně: Datová stanice pro software AMPLILINK s tiskárnou
 - Volitelně: Příručka uživatele k softwaru AMPLILINK verze 2.4 pro analyzátor COBAS® AMPLICOR® (pro použití se softwarem AMPLILINK verze 2.41) nebo Aplikační manuál k softwaru AMPLILINK verze 3.2 pro zařízení COBAS® AmpliPrep, analyzátor COBAS® TaqMan®, analyzátor COBAS® TaqMan® 48 a analyzátor COBAS® AMPLICOR® (pro použití se softwarem AMPLILINK verze 3.2).
- *Metodický manuál* pro test COBAS® AMPLICOR® HBV MONITOR
- Stojany s D-keřímkou (ART: 10 4564 4; P/N: 21045644001)
- Destilovaná nebo deionizovaná voda
- Serologické pipety 5 ml
- Vířivý mixér
- Rukavice na jedno použití bez pudru

* Pipetory musí být přesné s 3% objemovou chybou. Kde je tak uvedeno, je třeba používat špičky s aerosolovou bariérou nebo vyměnitelné špičky, aby se předešlo vzájemné kontaminaci vzorku a amplikonu.

** Na vzorek a kontrolní preparát se používají zkumavky se šroubovacím uzávěrem, aby se předešlo vystříknutí a případné vzájemné kontaminaci vzorků a kontrol. **Zkumavky s nasazovacím uzávěrem nepoužívejte.**

Odběr, přeprava a uchování vzorků

Poznámka

Se všemi vzorky je třeba zacházet jako s infekčními.

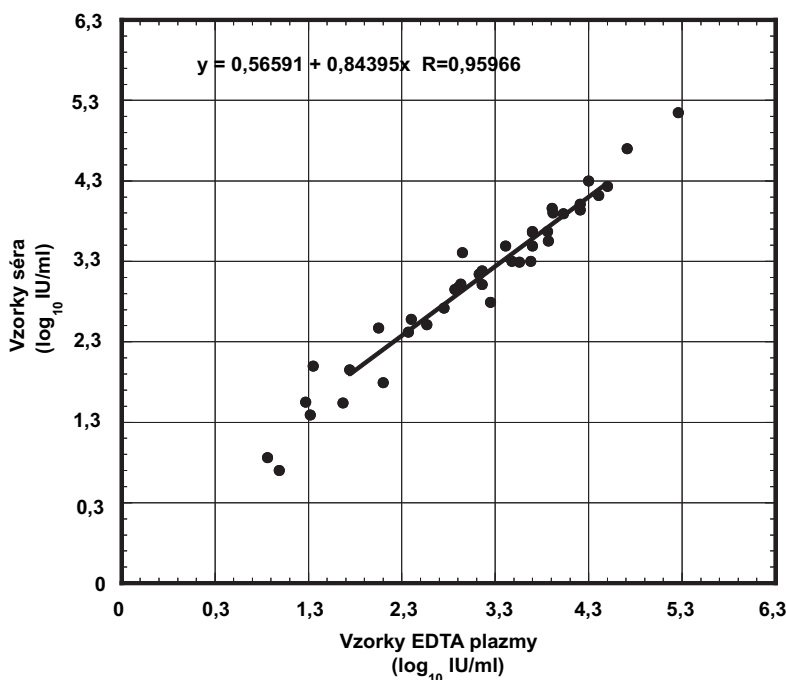
Odběr vzorků

Test COBAS® AMPLICOR® HBV MONITOR se používá pouze na vzorky séra nebo plazmy. Krev se odebírá do zkumavek SST® (sérové separační zkumavky) nebo do sterilních zkumavek za použití EDTA (uzávěr levandulové barvy) jako antikoagulantu. **Vzorky antikoagulované heparinem jsou pro tento test nevhodné.** Plnou krev uchovávejte při teplotě 2-25°C ne déle než 1 den (24 hodin).

Sérum nebo plazmu z plné krve separujte do 1 dne (24 hodin) od odběru, a to odstředováním při 800-1600 x g po dobu 20 minut za pokojové teploty. Sérum nebo plazmu převedte do sterilní polypropylenové zkumavky.

Použití EDTA plazmy nebo séra vede k výsledkům testu, které jsou přibližně ekvivalentní. Obrázek 1 ukazuje vliv typu matrix na výsledky HBV DNA pro vzorky pacienta.

Obrázek 1
Test COBAS® AMPLICOR® HBV MONITOR
Výsledky vzorků s EDTA a séra



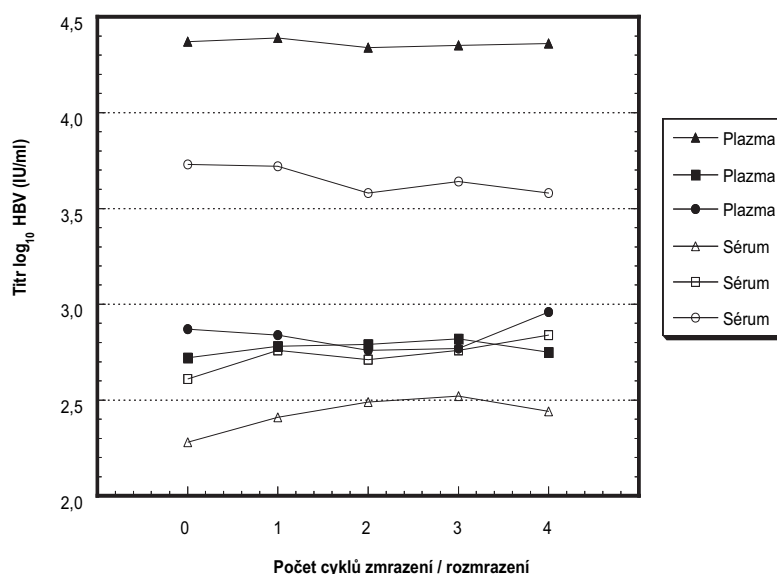
Přeprava vzorků

Při přepravě celé krve, séra nebo plazmy je třeba dodržovat celostátní resp. místní předpisy o dopravě etiologických látek³⁷. Plná krev se přepravuje za teplot 2-25°C a musí se zpracovat do 1 dne od odběru. Plasma nebo sérum může být transportována při 2-8°C po dobu až 8 dnů nebo mrazená.

Uchovávání vzorku

Vzorky séra nebo plazmy mohou být skladovány při pokojové teplotě po dobu až 3 dnů, při teplotě 2-8°C po dobu až 7 dnů nebo zmrazené na teplotu -20°C do -80°C po 6 týdnů. Doporučuje se vzorky uchovávat v alikvotních podílech po 250-300 μ l ve sterilních polypropylenových zkumavkách o objemu 1,5 ml se šroubovacím uzávěrem (například Sarstedt 72.692.105). Vzorky séra a plazmy mohou být zmrazeny a rozmrazeny maximálně čtyřikrát bez ztráty hodnoty IU/ml. Údaje ze studií zabývajících se cykly zmrazení-rozmrazení ukazuje obr. 2.

Obrázek 2
Stabilita zmrazených/ rozmrazených vzorků HBV

**Návod k použití****Poznámka**

Podrobné pokyny pro práci, tisk výsledků a vysvětlení značek a poznámek najdete v (1) Příručce uživatele k analyzátoru COBAS® AMPLICOR® a (2) jestliže používáte software AMPLILINK verze 2.41, přečtěte si Příručku uživatele k softwaru AMPLILINK verze 2.4 pro analyzátor COBAS® AMPLICOR®, nebo jestliže používáte software AMPLILINK verze 3.2, přečtěte si Aplikační manuál k softwaru AMPLILINK verze 3.2 pro zařízení COBAS® AmpliPrep, analyzátor COBAS® TaqMan®, analyzátor COBAS® TaqMan® 48 a analyzátor COBAS® AMPLICOR®.

Poznámka

Všechna činidla musejí mít před použitím teplotu okolí. Před započítáním testu se vizuálně přesvědčte, že je objem činidel dostatečný.

Poznámka

Vzorky séra a plazmy musejí mít před použitím teplotu okolí.

Poznámka

Kde je tak uvedeno, používejte pipetory s aerosolovou bariérou nebo se pozitivními vyměnitelnými špičkami. Dávejte obzvláštní pozor, abyste zajistili selektivní amplifikaci.

Poznámka

Vzorky i kontrolní preparát se musí uchovávat ve zkumavkách se šroubovacím uzávěrem, aby nemohly vystříknout a aby nemohlo dojít ke vzájemné (křížové) kontaminaci vzorků a kontrol. Nepoužívejte zkumavky s nasazovacím uzávěrem.

Poznámka

Test COBAS® AMPLICOR® HBV MONITOR musí být prováděn pouze v základním režimu.

Množství pro jeden cyklus Každá souprava obsahuje dostatečné množství činidla na čtyři 12-testové cykly, které mohou probíhat zvlášť nebo jako dva 24-testové cykly. Každý cyklus musí zahrnovat minimálně po jednom replikátu HBV MONITOR (-) kontrolu, HBV MONITOR Low (+) kontrolu a HBV MONITOR High (+) kontrolu (viz část „Kontrola kvality“).

Činidla pro přípravu vzorku a amplifikaci jsou balena v 12-testových lahvíčkách na jedno použití. Pro co nejefektivnější využití je vhodné zpracovávat činidla, vzorky i kontroly v dávkách, jež jsou násobky 12.

Poznámka **Test COBAS® AMPLICOR® HBV MONITOR musí být prováděn pouze v základním režimu.**

Pracovní tok COBAS® AMPLICOR® HBV MONITOR test se dá provést během jednoho dne nebo během dvou dnů. Pokud se má test provést během jednoho pracovního dne, postupuje se popořadě podle pokynů v částech *Příprava činidel, Příprava vzorků, Příprava kontrol, Amplifikace a Detekce*. Test lze také provést v průběhu dvou dnů. V takovém případě se první den provede *Příprava vzorků a kontrol* a příští den se pokračuje postupy *Příprava činidel, Amplifikace a Detekce*.

Chcete-li první den provést přípravu vzorků a kontrol a druhý den amplifikaci a detekci, proveďte z *Přípravy vzorků a kontrol* (kroky 1 až 15) a zpracované vzorky a kontroly uložte podle pokynů v kroku 15. Druhý den začněte *Přípravou činidel*, potom zpracované vzorky a kontroly rozmrazte na pokojovou teplotu, odstředte po dobu 15 minut a pokračujte v *Přípravě vzorků a kontrol*, krok 16, a postupujte dále k *Amplifikaci a Detekci*.

Příprava činidel

Provedená v: Preamplifikace – prostor pro přípravu činidel

1. Stanovte příslušný počet A-kruhů potřebných k testování vzorků a kontrol. A-kruh(y) uložte do držáku(ů).
2. Smíchejte **HBM Mg²⁺** vířením po dobu 5-10 sekund. Připravte Working Master Mix přidáním 100 µl **HBM Mg²⁺** do jedné lahvičky **HBM MMX**. *Objem Master Mix není třeba měřit. Přidejte 100 µl HBM Mg²⁺ do celé lahvičky s HBM MMX.* Zkumavku opět uzavřete a dobře promíchejte tak, že ji 10-15-krát obrátíte dnem vzhůru. K promísení Working Master Mix nepoužívejte víření. Zbývající množství **HBM Mg²⁺** zlikvidujte. Růžové barvivo v **HBM Mg²⁺** slouží k vizuálnímu ověření, že byl roztok **HBM Mg²⁺** přidán k **HBM MMX**. Working Master Mix se uchovává při teplotě 2-8°C a musí se spotřebovat do 4 hodin od přípravy.
3. Do každé A-zkumavky odměřte 50 µl Working Master Mix za použití opakovacího pipetoru nebo pipetoru s aerosolovou bariérou nebo se pozitivní vyměnitelnou špičkou. Nyní kryty A-zkumavek nezávěrejte. Nespotřebovaný Working Master Mix zlikvidujte.
4. A-kruh(y) s Working Master Mix vložte do těsně uzavíratelného plastového sáčku a sáček bezpečně těsně uzavřete. Přemístěte A-kruh(y) do prostoru Preamplifikace – příprava vzorku a kontroly. Uložte A-kruh(y) obsahující Working Master Mix do prostoru Preamplifikace – příprava vzorku a kontroly – při teplotě 2-8°C do doby, než bude příprava vzorku a kontroly hotova. Working Master Mix v A-zkumavkách uzavřených v plastovém sáčku je při teplotě 2-8°C stabilní 4 hodiny.

Příprava vzorků a kontrol

Prováděná v: Preamplifikace - prostor pro přípravu vzorků a kontrol

Poznámka

K amplifikaci dříve zpracovaných vzorků a kontrol nejprve proveďte kroky v kapitole “Příprava činidla”. Poté rozmrazte zpracované vzorky a kontroly při pokojové teplotě a následně odstředte po dobu 15 minut. Pokračujte krokem 16 “Příprava vzorku a kontroly”.

1. Označte po jedné 1,5 ml zkumavce se šroubovacím uzávěrem pro každý vzorek a další tři zkumavky označte „HBV (-) C“, „HBV L(+)C“ a „HBV H(+)C“.
2. Smíchejte **HBM LYS 1** vířením po dobu 5-10 sekund. Přidejte 50 μ l **HBM LYS 1** do každé zkumavky s použitím opakovací pipety a 1,25 ml Combipip reservoirem nebo mikropipetou s uzavírací špičkou.
3. Smíchejte **NHP** vířením po dobu 5-10 sekund. Do každé ze tří kontrolních zkumavek obsahujících **HBM LYS 1**, přidejte 100 μ l **NHP** a promíchejte vířením 5-10 sekund.

Poznámka

Používáte-li zmrazené vzorky séra nebo plazmy, rozmrazte je při pokojové teplotě a nechte je 5-10 sekund vířit. Zkumavkou se vzorkem krátce zapulsujte, abyste sebrali vzorek i ze dna zkumavky. Dejte pozor, abyste si při manipulaci se vzorky nekontaminovali rukavice.

4. Do každé z označených zkumavek se vzorkem obsahujících **HBM LYS 1**, přidejte 100 μ l vzorku a promíchejte vířením 5-10 sekund.
5. Na každé zkumavce si udělejte orientační značku a vložte zkumavky do mikrocentrifugy orientační značkou ven, takže se pelety podle nich vyrovnají. Zkumavky se vzorky a kontrolami odstředujte při pokojové teplotě po dobu 5 minut maximální rychlostí (12 500-16 000 x g).
6. Pomocí nové přenosné pipety na jedno použití s jemnou špičkou pro každý vzorek a kontrolu opatrně z každé zkumavky stáhněte a zlikvidujte supernatant, aniž byste přitom porušili peletu. Odstraňte tolik kapaliny, kolik je bez porušení pelety možné. Supernatant odebírejte pomalu, tak aby mohla kapalina ze stěn zkumavky kompletně stéci. Nepoužívejte vakuové odsávání.
7. Smíchejte **HBV (-) C** vířením po dobu 5-10 sekund. Přidejte 25 μ l **HBV (-) C** do zkumavky označené „HBV (-) C“.
8. Přidejte 25 μ l **HBV (-) C** do každé zkumavky se vzorkem.
9. Smíchejte **HBV L(+)C** vířením po dobu 5-10 sekund. Přidejte 25 μ l **HBV L(+)C** do zkumavky označené „HBV L(+)C“.
10. Smíchejte **HBV H(+)C** vířením po dobu 5-10 sekund. Přidejte 25 μ l **HBV H(+)C** do zkumavky označené „HBV H(+)C“.
11. Připravte následujícím způsobem pracovní činidlo pro lýzu 2: Smíchejte **HBM QS** vířením po dobu 10 sekund. Přidejte 50 μ l **HBM QS** do jedné zkumavky s **HBM LYS 2** a dobře promíchejte vířením po dobu 15 sekund.
12. Přidejte 100 μ l pracovní činidla pro lýzu 2 do všech zkumavek a dobře promíchejte vířením po dobu 15 sekund. Pelet se ne vždy rozpustí úplně, ale toto neovlivní s provedením testu.
13. Inkubujte všechny zkumavky při teplotě 60°C \pm 2°C po dobu 60 minut.
14. Přidejte 100 μ l **HBM LYS 3** do každé zkumavky a dobře promíchejte vířením po dobu 5-10 sekund. Inkubujte všechny zkumavky při teplotě 100°C \pm 2°C po dobu 10 minut.
15. Vložte zkumavky do mikrocentrifugy orientačními značkami ven a centrifugujte při pokojové teplotě po dobu 15 minut maximální rychlostí

(12 500-16 000 x g), aby byly sebrány všechny nerozpustné částice. Zpracované vzorky a kontroly amplifikujte do 1 hodiny od přípravy, nebo je můžete po dobu nepřesahující 1 měsíc uchovávat ve zmrazeném stavu při teplotě 20°C až -80°C nebo nižší, přičemž zmrazit a rozmrazit se mohou nanejvýš jednou. Více než jeden cyklus zmrazení a rozmrazení může způsobit ztrátu titru.

Poznámka

Pokud byly zpracované vzorky a kontroly uchovávány před amplifikací ve zmrazeném stavu, rozmrazte je za pokojové teploty, zvířete po dobu 5-10 sekund a před postoupením k bodu 16 je po dobu 15 minut odstředte.

16. Z každého zpracovaného vzorku a kontroly odměřte 50 µl do příslušné A-zkumavky obsahující Working Master Mix; použijte k tomu mikropipetor s aerosolovou bariérou nebo pozitivní vyměnitelnou špičkou. Pro každý vzorek a kontrolu použijte novou špičku. A-zkumavky uzavřete.
17. Znamenejte pozice kontrol a vzorků v A-kruhu (kruzích). S amplifikací je třeba začít do 1 hodiny od okamžiku, kdy byly zpracované vzorky a kontroly odměřeny do A-zkumavek obsahujících Working Master Mix. Připravené vzorky a kontroly v A-kruzích přemístěte do prostoru Amplifikace/detekce. Zbytek zpracovaného vzorku je možno zmrazit a po dobu až 1 měsíce uchovávat při teplotě -20°C - -80°C.

Amplifikace a detekce**Provádění v: Poamplifikace – prostor pro amplifikaci a detekci****Provádějte denní údržbu zařízení, včetně:**

- Otření inicializačního podstavce vlhkým hadříkem nepouštějícím vlákna a osušte
- Otření špičky zařízení pro manipulaci s D-kelímky vlhkým hadříkem nepouštějícím vlákna a osušte
- Kontroly rezervoáru s promývacím pufrům a v případě potřeby doplnit
- Následujícím postupem si připravte pracovní promývací pufr (1X). Prohlédněte **WB** a pokud v čínidle zpozorujete sraženinu, zahřejte je na 30-37°C, aby se sraženina rozpustila. 1 objem **WB** přidejte k 9 objemům destilované nebo deionizované vody a dobře promíchejte. Dobře promíchejte. V rezervoáru promývacího pufru (1X) by měly být vždy minimálně 3-4 litry pufru.
- Vyprázdněte nádobu na odpad
- Předplňte analyzátor COBAS® AMPLICOR®
- Během primingu zkontrolujte stříkačky a trubičky
- Během primingu zkontrolujte transferové špičky

Před každým cyklem:

- Zkontrolujte nádobu na odpad a podle situace ji vyprázdněte
- Zkontrolujte rezervoár na promývací pufr a podle potřeby připravte nový pufr
- Vyměňte stojany s použitými D-kelímky
- Předplňte systém

Plnění a provoz analyzátoru COBAS® AMPLICOR®

1. Zkontrolujte množství činidel v analyzátoru COBAS® AMPLICOR®. Připravte si dostatek kazet s činidly, abyste s nimi vystačili.

2. Dobře promíchejte **BM PS1** vířením. Do jedné kazety s **BM4** odměřte 2,5 ml **BM PS1**. Kazetu uložte do příslušného stojanu na činidla specifického pro daný test. Zlikvidujte použitou **BM PS1** lahvičku. Zaznamenejte datum přípravy činidla na kazetu **BM4**.
3. **BQ PS1** vířením důkladně promíchejte. Do jedné kazety s **BQ4** odměřte 2,5 ml **BQ PS1**. Kazetu uložte do příslušného stojanu na činidla specifického pro daný test. Použitou lékovku od **BQ PS1** zlikvidujte. Zaznamenejte datum přípravy činidla na kazetu **BQ4**.
4. Připravte pracovní substrát tak, že do jedné kazety s **SB3** odpipetujete 5 ml **SB**. K promísení pipetujte nahoru a dolů. Prázdnou lékovku od **SB** zlikvidujte. Na kazetě s **SB3** vyznačte datum přípravy.
5. Pracovní substrát umístěte do generického stojanu na činidla.
6. Kazetu s **AD3** uložte do stojanu na činidla specifického pro daný test. Na kazetě s **AD3** vyznačte datum přípravy.
7. Kazety s **DN4** a **CN4** uložte do generických stojanů na činidla. Na kazetách vyznačte datum, kdy byly otevřeny.
8. Identifikujte stojany s činidly jako obecné nebo testové pomocí tlačítek, skeneru čárových kódů nebo pomocí software AMPLILINK.
9. Nakonfigurujte stojany s činidly tak, že pomocí tlačítek, skeneru čárových kódů nebo pomocí software AMPLILINK vložíte pozice činidel a čísla šarží do analyzátoru COBAS® AMPLICOR®.
10. Vložte stojany s činidly do analyzátoru COBAS® AMPLICOR® pomocí tlačítek, skeneru čárových kódů nebo pomocí software AMPLILINK. Dbejte, aby byla každá kazeta s činidlem ve své přiřazené pozici a aby ve stojanu těsně seděla.
11. Stojan na D-kelímky uložte na plošinu pro D-kelímky. Pro každý vzorek a kontrolu je zapotřebí šest D-kelímek, dalších dvou D-kelímek je třeba pro jednotlivé kazety pracovního substrátu k provedení slepého pokusu pomocí analyzátoru COBAS® AMPLICOR®.
12. A-kruh(y) uložte do segmentu(ů) tepelného cyklizátoru analyzátoru COBAS® AMPLICOR®.
13. Vložte A-kruhy do analyzátoru COBAS® AMPLICOR® pomocí tlačítek, skeneru čárových kódů nebo pomocí software AMPLILINK.
14. Vytvořte pracovní seznam A-kruhu.

Poznámka

Nyní musí uživatel vložit do analyzátoru COBAS® AMPLICOR® počet IU jednotek specifické šarže kvantifikačního standardu HBV a rozmezí Low (+) a High (+) kontrol uvedených na datové kartě COBAS® AMPLICOR® HBV MONITOR. Tato rozmezí se do analyzátoru COBAS® AMPLICOR® vkládají pomocí klávesnice, snímače čárových kódů nebo softwaru AMPLILINK během nastavení pracovního seznamu A-kruhů.

15. Kryt segmentu(ů) tepelného cyklizátoru těsně uzavřete.
16. Spusťte analyzátor COBAS® AMPLICOR®.
17. Vyčkejte, dokud analyzátor COBAS® AMPLICOR® neohlásí, že kontrola vložení proběhla úspěšně.

Poznámka

Analyzátor COBAS® AMPLICOR® umožňuje provést dvě samostatná kvantitativní stanovení pro každou A-zkumavku. Potřebné množství

každého detekčního činidla je vypočítáno analyzátořem COBAS® AMPLICOR® a kontrola uložení provedená na začátku každého běhu stanovuje, zda je dostupné dostatečné množství činidel pro požadované testy.

18. Amplifikaci, ředění a detekci provádí analyzátoř COBAS® AMPLICOR® automaticky. Výsledky jsou vyjádřeny v HBV DNA IU/ml.

Poznámka

Test COBAS® AMPLICOR® HBV MONITOR musí být prováděn pouze v základním režimu.

Výsledky

Poznámka

Výsledky testu jsou pořizeny analyzátořem COBAS® AMPLICOR® v IU/ml. Tyto výsledky mohou být manuálně převedeny na HBV DNA kopii/ml s použitím konverzního faktoru, který je popsán níže.

Výpočet výsledku

U každého vzorku a kontroly stanoví analyzátoř COBAS® AMPLICOR® automaticky titry HBV DNA následovně:

- Vybere všechna zředění ampikonu HBV a kvantifikačního standardu, jejichž absorbance spadají do lineárního rozmezí pro daný test (0,15-2,0 A₆₆₀). Má-li být výsledek počítán, musí do tohoto lineárního rozmezí spadat minimálně jedno zředění HBV a jedno zředění ampikonu kvantifikačního standardu.
- U všech vybraných hodnot absorbance provede korekci na pozadí.
- Stanoví, že hodnota A₆₆₀ pro **HBM QS** je přijatelná, což potvrzuje že kroky zpracování vzorku, amplifikace a detekce byly provedeny správně.
- Určí, že všechna cílová zředění **HBV (-) C** poskytnou hodnoty A₆₆₀ ≤ 0,099.
- Vyhledá hodnoty A₆₆₀, kterou jsou mimo sekvenci.
- U všech vybraných zředění stanoví A₆₆₀ celkového HBV a celkového kvantifikačního standardu a pomocí maximální celkové hodnoty A₆₆₀ vypočítá počet kopií **HBV L(+)**C a **HBV H(+)**C a jednotlivých vzorků.
- Určuje, že vypočtená hodnota IU/ml pro **HBV L(+)**C a **HBV H(+)**C spadá do vymezeného rozmezí.
- Vygeneruje výtisk hodnot A₆₆₀ pro všechna zředění HBV a kvantifikačního standardu a vypočtených hodnot IU/ml pro každý vzorek a kontrolu. Titr je na výtisku výsledku zobrazen ve vědecké notaci pod identifikací vzorku.

Výpočet
HBV DNA kopii/ml

Na základě vnitřní studie je konverzní faktor pro 1. mezinárodní standard³⁸ pro HBV DNA je 5,26 HBV DNA kopií na mezinárodní jednotku (IU).

Pro převod výsledků testů na HBV DNA kopii/ml proveďte následující výpočet:

$$(IU/ml) \times (5,26 \text{ kopii/IU}) = \text{HBV DNA kopii/ml}$$

$$0,190 \text{ IU/ml} = 1 \text{ kopie/ml}$$

Validace cyklu

Zkontrolujte, zda ve výtisku nejsou žádné vlaječky a poznámky a že je tedy měření platné. Měření platné **není**, pokud se u kontrol HBV MONITOR objeví některý z následujících vlaječek nebo poznámek.

| Vlajčka | Poznámka | Interpretace |
|---------|-------------|---|
| _Q_ | QS_INVALID | HBM QS A_{660} hodnoty pro jakoukoli kontrolu nad nebo pod přípustným rozmezím. |
| _N_ | NC_INVALID | HBV (-) C A_{660} hodnota nad přípustný limit ($> 0,099$). |
| _H_ | HPC_INVALID | Hodnota HBV H(+) IU/ml nad nebo pod přiřazeným rozmezím. |
| _L_ | LPC_INVALID | Hodnota HBV L(+) IU/ml nad nebo pod přiřazeným rozmezím. |
| | OD_SEQUENCE | Indikuje cílovou hodnotu A_{660} ležící mimo sekvenci. Výsledky nebudou vypočítávány. Opakujte celý proces testování včetně přípravy vzorku a kontroly, amplifikace a detekce. |
| | QS_SEQUENCE | Indikuje hodnotu A_{660} kvantifikačního standardu ležící mimo sekvenci. Výsledky nebudou vypočítávány. Opakujte celý proces testování včetně přípravy vzorku a kontroly, amplifikace a detekce. |
| | TARGETOD_HI | Všechny cílové OD nad nejvyšší hodnotou stanoveného rozmezí. Pokud objeví vlajčka v případě níže anebo vysoce pozitivního kontrolního vzorku, analyzátor COBAS® AMPLICOR® nebude počítat titr. V případě nepřítomnosti vypočteného titru je ovlivněný výsledek příslušného kontrolního vzorku a testovací cyklus neplatný. |
| | TARGETOD_LO | Všechny cílové OD se nacházejí pod nejnižší hodnotou stanoveného rozmezí. Pokud objeví vlajčka v případě níže anebo vysoce pozitivního kontrolního vzorku, analyzátor COBAS® AMPLICOR® nebude počítat titr. V případě nepřítomnosti vypočteného titru je ovlivněný výsledek příslušného kontrolního vzorku a testovací cyklus neplatný. |
| | TARG_RANGE | Nejméně jedna cílová OD se nachází pod a jedna OD nad stanovené rozmezí, avšak ani jedna se nenachází ve specifikovaném rozmezí. Pokud objeví vlajčka v případě níže anebo vysoce pozitivního kontrolního vzorku, analyzátor COBAS® AMPLICOR® nebude počítat titr. V případě nepřítomnosti vypočteného titru je ovlivněný výsledek příslušného kontrolního vzorku a testovací cyklus neplatný. |

- Pokud je cyklus neplatný, zopakujte ho celý, včetně přípravy vzorku a kontroly, amplifikace a detekce.

Kontrola dat

Analyzátor COBAS® AMPLICOR® tiskne výsledky hodnoty A_{660} společně s hodnotou IU/ml vypočtenou pro každý vzorek a kontrolu. Hodnoty A_{660} při sériových ředěních cílového amplikonu a amplikonu kvantifikačního standardu mají s rostoucími faktory zředění vykazovat klesající trend hodnot A_{660} , s výjimkou zředění, kde hodnoty A_{660} překračují lineární rozmezí testu (vzorky o vysokém titru) nebo u kterých se hodnoty A_{660} naopak blíží pozadí (vzorky o nízkém titru).

Ředění amplikonu HBV

HBV ředění č. 1, 2, 3 a 4 představují neředěný amplikon HBV a amplikon sériově zředěný v poměru 1:10, 1:100 a 1:1000. Absorbance mají spolu se sériovým zředěním klesat s tím, že nejvyšší hodnotu A_{660} vykazuje u každého vzorku nebo kontroly první zředění (zředění č. 1) a nejnižší hodnotu A_{660} vykazuje zředění poslední (zředění č. 4). Pokud hodnoty A_{660} pro HBV toto pořadí nesledují, zobrazí se u daného vzorku nebo kontroly chybové hlášení OD_SEQUENCE.

Ředění amplikonu kvantifikačního standardu HBV

U kvantifikačního standardu HBV představuje ředění č. 1 neředěný amplikon a ředění č. 2 amplikon zředěný v poměru 1:10. Pokud je hodnota A_{660} při zředění č. 2 vyšší než hodnota A_{660} při zředění č. 1, došlo k chybě a zobrazí se chybové hlášení QS_SEQUENCE. Výsledek pro daný vzorek nebo kontrolu je neplatný. Celý test pro daný vzorek či kontrolu (včetně zpracování vzorku, amplifikace a detekce) je třeba zopakovat.

Interpretace výsledků s hodnotami A_{660} mimo sekvenci

- Hodnoty A_{660} pro ředění amplikonu HBV mají s rostoucím faktorem ředění vykazovat klesající trend hodnot A_{660} , s výjimkou ředění nasycených a zředění blízkých se pozadí hodnot A_{660} .
- V reakcích obsahujících vysoké množství HBV DNA mohou být ředění č. 1, 2 a 3 nasycená, což vede ke sníženým hodnotám A_{660} (viz příklad č. 1 v tabulce č. 1). Tyto výsledky jsou platné i tehdy, nevykazují-li hodnoty A_{660} ředění HBV klesající tendenci v řadě ředění č. 1 až 4.
- V reakcích s nízkým množstvím HBV DNA mohou ředění č. 2, 3 a 4 obsahovat hodnoty A_{660} blízkých se pozadí (viz příklad 2 v tabulce č. 1).

Tyto výsledky jsou platné i tehdy, nevykazují-li hodnoty A_{660} ředění HBV klesající tendenci v řadě ředění č. 1 až 4.

- Všechna ředění s hodnotami A_{660} mezi 0,15 a 2,0 musí sledovat trend snižování hodnot A_{660} pro ředění č. 1 až 4. **Jestliže hodnoty A_{660} mezi 0,15 a 2,0 nesledují tendenci snížení hodnoty A_{660} pro ředění č. 1 až 4, došlo k chybě (viz Příklady 3, 4 a 5 v Tabulce č. 1).** Výsledky pro daný vzorek nebo kontrolu jsou neplatné a celý test pro daný vzorek či kontrolu (včetně zpracování vzorku, amplifikace a detekce) je třeba zopakovat.

Tabulka 1
Příklady výsledků, kde se hodnoty A_{660} vymykají sekvenci

| | Cílová A_{660} (Faktor ředění) | | | | QS A_{660} (Faktor ředění) | | Interpretace výsledků |
|--------------|-------------------------------------|-------|-------|--------|---------------------------------|--------|--|
| | 1:1 | 1:10 | 1:100 | 1:1000 | 1:1 | 1:10 | |
| Příklad č. 1 | 2,578 | 3,603 | 3,201 | *0,700 | 2,618 | *0,397 | PLATNÉ: Vzorek o vysokém titru A_{660} nad rozmezím lineární absorbance. |
| Příklad č. 2 | *0,216 | 0,004 | 0,016 | 0,007 | 3,236 | *0,743 | PLATNÉ: Vzorek o nízkém titru A_{660} na úrovni nebo v blízkosti hladiny detekce. |
| Příklad č. 3 | 0,002 | 0,007 | 0,004 | 0,339 | 4,218 | *0,883 | NEPLATNÉ: Zobrazí se hlášení OD_SEQUENCE. |
| Příklad č. 4 | 3,052 | 1,597 | 3,384 | 2,887 | 1,357 | *0,158 | NEPLATNÉ: Zobrazí se hlášení OD_SEQUENCE. |
| Příklad č. 5 | 0,016 | 0,267 | 0,007 | 0,004 | 3,612 | *0,793 | NEPLATNÉ: Zobrazí se hlášení OD_SEQUENCE. |

* Označí hodnotu A_{660} vybranou analyzátořem COBAS® AMPLICOR® pro výpočet výsledku, jak je ukázáno na tisku. U vzorků, kde jsou hodnoty A_{660} mimo sekvenci, výsledky vypočítávány nejsou.

Interpretace výsledků

Pro platný cyklus zkontrolujte každý jednotlivý vzorek na přítomnost vlaječek nebo komentářů ve výtisku výsledku. Výsledky se interpretují takto:

Poznámka

Analyzátoř COBAS® AMPLICOR® je naprogramován tak, aby nejběžnější chyby a nesoulady výsledků označil vlaječkami. Nicméně doporučujeme, abyste v rámci běžného laboratorního hodnocení dat hodnoty A_{660} kontrolovali a zajistili tak maximální integritu výsledků.

- V případě vzorků, u kterých nejsou žádné vlaječky ani poznámky, nahlaste výsledky tak, jak jsou přístrojem vytištěny.
- **Platný** cyklus může zahrnovat platné i neplatné výsledky vzorků v závislosti na tom, zda se u jednotlivých vzorků objeví vlaječky a/ nebo poznámky.
- Vzorky s vlaječkami a/ nebo poznámkami se interpretují takto:

| Vlaječka | Poznámka | Interpretace |
|----------|-------------|---|
| Q | QS_INVALID | U žádného zředění kvantifikačního standardu neleží hodnota A_{660} v rozmezí lineární absorbance daného testu. Výsledek pro tento vzorek je neplatný. U vzorků s neplatnými výsledky je třeba test zopakovat, včetně přípravy vzorků a kontrol, amplifikace a detekce. |
| | TARGETOD_LO | Hodnoty A_{660} pro všechna HBV ředění pod rozmezím lineární absorbance testu. Výsledky nahlaste jako „HBV DNA nedetekována“. |
| | TARGETOD_HI | Hodnoty A_{660} pro všechna HBV ředění nad rozmezím lineární absorbance testu. Výsledek nahlaste jako „Ne stanoveno.“ Je-li požadován kvantitativní výsledek, zředte původní vzorek s HBV-negativní lidskou plazmou nebo sérum a opakujte test. Vynásobte uvedený výsledek faktorem ředění. |
| | RESULT_LO | Vypočtená hodnota IU/ml leží pod lineárním rozmezím testu. Výsledky uvádějte jako „HBV DNA detekována, méně než 60 IU/ml“. |
| | RESULT_HI | Vypočtená hodnota IU/ml leží nad lineárním rozmezím testu. Výsledky uvádějte jako „vyšší než $3,8 \times 10^4$ IU/ml“. Je-li požadován kvantitativní výsledek, zředte původní vzorek s HBV- negativní lidskou plazmou nebo sérum a opakujte test. Vynásobte uvedený výsledek faktorem ředění. |
| | TARG_RANGE | Všechny cílové hodnoty A_{660} leží mimo lineární rozmezí daného testu. Výsledek nahlaste jako „Nestanoveno.“ Opakujte test s původním vzorkem včetně opakování přípravy vzorku, amplifikace a detekce. |
| | OD_SEQUENCE | Indikuje cílovou hodnotu A_{660} ležící mimo sekvenci. Výsledky nebudou vypočítávány. Celý postup testu zopakujte včetně přípravy vzorků a kontrol, amplifikace a detekce. |
| | QS_SEQUENCE | Indikuje hodnotu A_{660} kvantifikačního standardu ležící mimo sekvenci. Výsledky nebudou vypočítávány. Celý postup testu zopakujte včetně přípravy vzorků a kontrol, amplifikace a detekce. |

Kontrola kvality

Každý testovací cyklus musí být minimálně po jednom replikátu COBAS® AMPLICOR® HBV MONITOR (–) kontroly, COBAS® AMPLICOR® HBV MONITOR Low (+) kontroly a COBAS® AMPLICOR® HBV MONITOR High (+) kontroly. Jak je tomu při každém novém laboratorním postupu, noví pracovníci obsluhy by měli zvážit, jestli by nebylo dobře při každém testování použít ještě další kontroly až do doby, než dokáží test provádět s vysokou jistotou správně. Na pozice kontrol v A-kruhu/kruzích nejsou kladeny žádné požadavky.

Zkontrolujte, zda výtisk cyklu neobsahuje vlaječky a poznámky a zda byl cyklus platný.

Negativní kontrola

COBAS® AMPLICOR® HBV MONITOR (–) kontrola musí dát "*HBV DNA Not Detected*" výsledek, tzn. všechny HBV A₆₆₀ hodnoty $\leq 0,099$. Jestliže HBV (–) Control toto kritérium nesplňuje, je celé měření neplatné. Celý postup zopakujte včetně přípravy vzorků a kontrol, amplifikace a detekce. Jestliže je absorbance kontroly HBV (–) je konzistentně vyšší než 0,099, spojte se s místním zastoupením firmy Roche a vyžádejte si technickou pomoc.

Pozitivní kontroly

Přiřazené rozmezí pro hodnoty COBAS® AMPLICOR® HBV MONITOR Low (+) a High (+) kontroly je specifické pro každou šarži kontroly a je uvedeno v *kartě s hodnotami testu COBAS® AMPLICOR® HBV MONITOR*, která je dodávána se soupravou. Tato rozmezí se do analyzátoru COBAS® AMPLICOR® vkládají pomocí klávesnice, snímače čárových kódů nebo softwaru AMPLILINK během sestavování pracovního seznamu pro A-kruh(y).

Hodnoty testu HBV DNA v IU/ml pro HBV MONITOR Low (+) kontrolu a HBV MONITOR High (+) kontrolu musí spadat do rozmezí uvedeného na *kartě s hodnotami testu COBAS® AMPLICOR® HBV MONITOR*. Pokud tomu tak u jedné nebo obou kontrol HBV MONITOR (+) není, je celé měření neplatné. Celý postup zopakujte (příprava vzorků a kontrol, amplifikace a detekce). Jestliže počet IU HBV DNA v jednom ml u jedné nebo obou kontrol HBV MONITOR (+) leží konzistentně mimo přiřazené rozmezí, obraťte se o technickou pomoc na místní zastoupení firmy Roche.

Bezpečnostní opatření při práci

Pracovní tok musí v laboratoři postupovat jednosměrně, od preamplifikačního prostoru směrem k poamplifikačnímu prostoru (amplifikace/detekce). Preamplifikační činnosti musí začínat přípravou činidel a pokračovat přípravou vzorků. Materiály a vybavení se musejí přiřadit jednotlivým preamplifikačním činnostem a nesmějí se používat k žádným jiným činnostem, ani se nesmějí přenášet mezi jednotlivými vyhrazenými prostory. Ve všech prostorách je nutné nosit rukavice, které se před opuštěním prostoru vymění. Vybavení a materiály pro přípravu činidla se nesmějí používat k přípravě vzorků, ani pro pipetování nebo zpracování amplifikované DNA či jiných zdrojů cílové DNA. Poamplifikační materiály a vybavení musí vždy zůstat v poamplifikačním prostoru.

Tak jako při každém testovacím postupu, je pro správné provedení tohoto testu zásadním požadavkem dodržovat principy správné laboratorní praxe. Vzhledem k vysoké analytické senzitivitě tohoto testu je třeba věnovat mimořádnou péči zachování čistoty činidel soupravy či amplifikačních směsí. U všech činidel je třeba čistotu bedlivě sledovat. Jakmile je podezření na kontaminaci, je třeba činidlo zlikvidovat.

Omezení metody

Tento test je validován pouze pro používání s lidským sérem nebo plazmou odebranými do antikoagulantů EDTA nebo ACD. Testování jiných typů vzorků může způsobit falešně negativní nebo falešně pozitivní výsledky. **Heparin inhibuje PCR; vzorky odebrané s použitím heparinu jako antikoagulantu nesmí být používány s testem COBAS® AMPLICOR® HBV MONITOR.**

K získání spolehlivých výsledků je třeba dodržovat příslušné postupy odběru, transportu, skladování a zpracování vzorků.

Přítomnost enzymu AmpErase v HBV MONITOR Master Mix snižuje riziko kontaminace amplikonu. Kontaminaci od HBV-pozitivních kontrol a HBV-pozitivních vzorků lze ovšem zabránit pouze důsledným uplatňováním zásad správné klinické praxe a pečlivým dodržováním postupů uvedených v této metodické příručce.

S produktem by měli pracovat pouze pracovníci proškolení v technice PCR.

Tento produkt se může používat pouze ve spojení s analyzátozem COBAS® AMPLICOR®.

Test COBAS® AMPLICOR® HBV MONITOR musí být provozován pouze ve základním režimu.

Tento test se nesmí používat ke klinickému hodnocení pacientů infikovaných genotypy F, G a H HBV viru.

Interferující látky

Heparin inhibuje PCR. Vzorky odebrané s heparinem nepoužívejte.

Je prokázáno, že zvýšené hladiny lipidů, bilirubinu, bílkoviny a hemoglobinu ve vzorcích neinterferují s kvantifikací HBV DNA tímto testem.

V případě následujících sloučenin nebylo prokázáno, že interferují s kvantifikací HBV testem COBAS® AMPLICOR® HBV MONITOR.

- | | |
|----------------------------------|-----------------|
| • Interferon alfa-2a | • Nevirapine |
| • Interferon alfa-2b | • Delvirdine |
| • Pegylated Interferon | • Ganciclovir |
| • Interferon alfacon-1 | • Indinavir |
| • Thymopsin alfa 1 | • Saquinavir |
| • Ribavirin / Interferon alfa-2b | • Ritonavir |
| • Zidovudine | • Nelfinavir |
| • Lamivudine | • Amatadin HCl |
| • Zalcitabine | • Paroxetin HCl |
| • Didanosine | • Fluoxetin HCl |
| • Stavudine | • Sertralin HCl |

Hodnocení neklinické výkonnosti

Popis studie

Limit detekce, lineární rozmezí a přesnost testu COBAS® AMPLICOR® HBV MONITOR jsou určeny analýzou sériových ředění dobře charakterizovaného kmene HBV viru jak v lidské HBV-negativní EDTA plazmě, tak i v HBV-negativním séru. Kmen viru byl získán z Virového diagnostického programu s kontrolovanou kvalitou (VQC) CLB laboratoře pro diagnostiku virů. Genotyp viru (genotyp A) a koncentrace kmene viru byla určena prodejcem. Příprava panelů viru a analýza testem COBAS® AMPLICOR® HBV MONITOR byly provedeny na místě.

Detekční limit

Detekční limit byl určen analýzou tří nezávislých ředění kmene HBV viru v HBV-negativní EDTA lidské plazmě a HBV-negativním séru pomocí dvou sad testu COBAS® AMPLICOR® HBV MONITOR. Studie ukazuje, že test může detekovat virion o koncentraci jen 60 IU/ml (300 HBV DNA kopií/ml) s možností míry pozitivity větší než 95% jak v EDTA plazmě, tak i v séru (Tabulka 2) za předpokladu, že OD vybraného D-kelímku je v specifikovaném OD rozmezí (0,15-2,00).

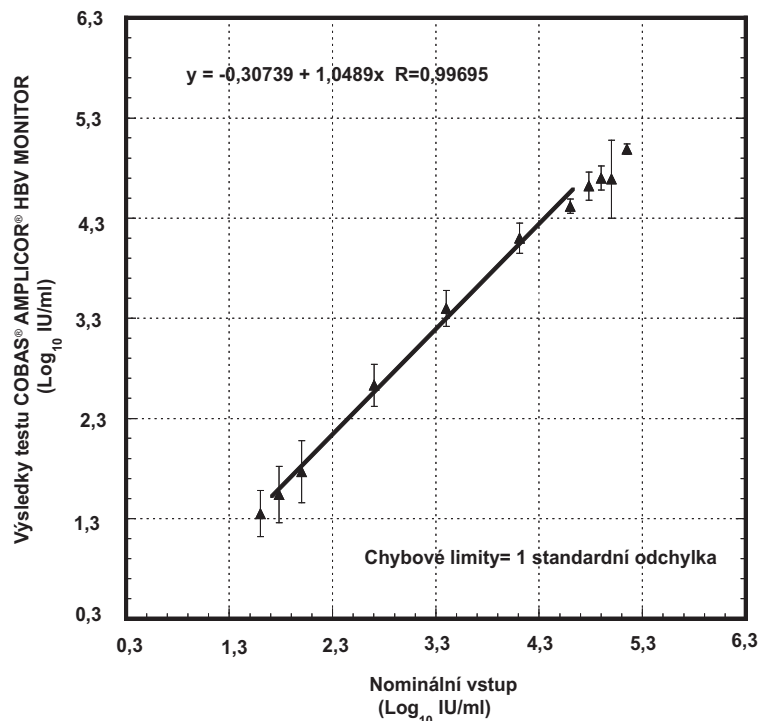
Tabulka 2
Detekční limit testu COBAS® AMPLICOR® HBV MONITOR

| Nominální vstup (IU/ml) | Nominální vstup (HBV DNA kopií/ml) | EDTA Plazma | | | Sérum | | |
|-------------------------|------------------------------------|--------------|--------------|-----------------|--------------|--------------|-----------------|
| | | č. replikáty | č. pozitivní | Míra pozitivity | č. replikátů | č. pozitivní | Míra pozitivity |
| 190 | 1000 | 106 | 106 | 100% | 108 | 108 | 100% |
| 152 | 800 | 107 | 107 | 100% | 108 | 108 | 100% |
| 114 | 600 | 108 | 108 | 100% | 108 | 108 | 100% |
| 95 | 500 | 107 | 107 | 100% | 108 | 107 | 99,1% |
| 76 | 400 | 108 | 108 | 100% | 108 | 107 | 99,1% |
| 57 | 300 | 107 | 106 | 99,1% | 108 | 106 | 98,1% |
| 38 | 200 | 108 | 100 | 92,6% | 108 | 90 | 83,3% |

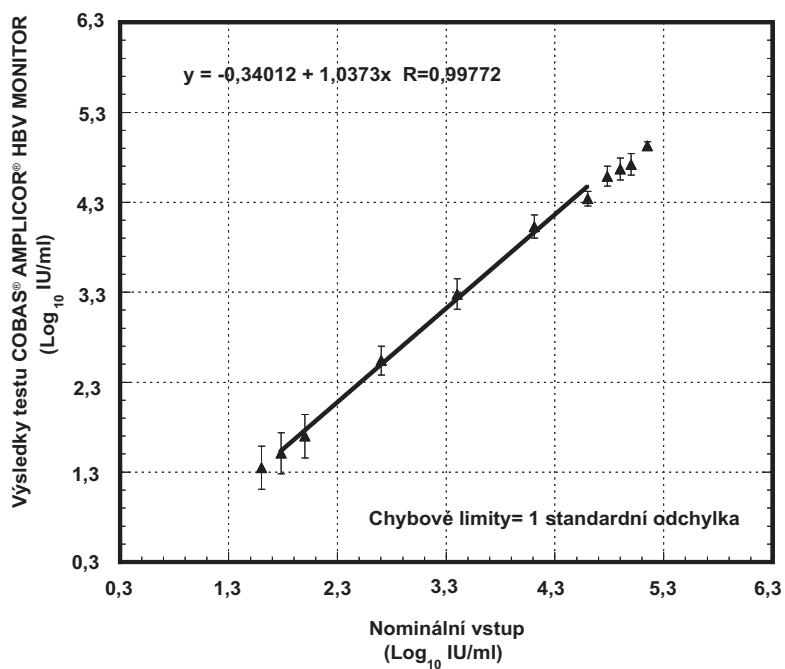
Lineární rozmezí

Lineární rozmezí bylo určeno analýzou tří nezávislých ředění kmene HBV viru v HBV-negativní EDTA lidské plazmě a HBV-negativním séru pomocí tří sad testu COBAS® AMPLICOR® HBV MONITOR. Jak je ukázáno na obrázku 3 a 4, test dával lineární odpověď od 60 ($\log_{10} = 1,78$) HBV DNA IU/ml do nejméně 38 000 ($\log_{10} = 4,58$) HBV DNA IU/ml v EDTA-plazmě i v séru.

Obrázek 3
Linearita testu COBAS® AMPLICOR® HBV MONITOR
Panel EDTA-plazmy



Obrázek 4
Linearita testu COBAS® AMPLICOR® HBV MONITOR
Panel séra



Přesnost

Přesnost byla hodnocena pomocí analyzační metody SAS's PROC MIXED (metoda=REML). Tato metoda umožňuje stanovení přesnosti testupomocí analýzy zdroje variace testu. Denně po dobu 4 dnů bylo prováděno měření zahrnující 2 replikáty každého vzorku každým ze 2 operátorů. Každý vzorek prošel celou procedurou testu COBAS® AMPLICOR® HBV MONITOR, zahrnující přípravu vzorku, amplifikaci a detekci. Zde uváděná přesnost tedy zahrnuje všechny aspekty testovacího postupu. Výsledky této studie přesnosti jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3
Přesnost testu COBAS® AMPLICOR® HBV MONITOR

| Nominální IU/ml | Nominální kopie/ml | Log kopii/ml | | Zdroje variace | Titr SD log | 95% CL pro SD | | %CV (Titr) | 95% CL pro %CV | | % variační atributu |
|-----------------|--------------------|--------------|----------|-------------------|---------------|---------------|--------------|-------------|----------------|------------|---------------------|
| | | Nominální | Výsledek | | | Dolní | Horní | | Dolní | Horní | |
| 57 | 300 | 2,5 | 2,2 | Šarže | 0,0000 | -- | -- | 0,0 | -- | -- | 0,0 |
| | | | | Operátor | 0,1106 | 0,042 | 104,338 | 25,9 | 10 | nekonečno | 13,6 |
| | | | | Operátor*šarže | 0,0000 | -- | -- | 0,0 | -- | -- | 0,0 |
| | | | | Cyklus (operátor) | 0,0000 | -- | -- | 0,0 | -- | -- | 0,0 |
| | | | | Reziduální | 0,2784 | 0,222 | 0,374 | 71,3 | 55 | 105 | 86,4 |
| | | | | Celkový | 0,2996 | 0,225 | 0,450 | 78,1 | 55 | 139 | 100,0 |
| | | | | Šarže | 0,1440 | 0,059 | 23,33 | 34,1 | 14 | -- | 23,8 |
| 95 | 500 | 2,7 | 2,4 | Operátor | 0,0000 | -- | -- | 0,0 | -- | -- | 0,0 |
| | | | | Operátor*šarže | 0,0000 | -- | -- | 0,0 | -- | -- | 0,0 |
| | | | | Cyklus (operátor) | 0,0689 | 0,021 | nekonečno | 16,0 | 5 | nekonečno | 5,4 |
| | | | | Reziduální | 0,2484 | 0,185 | 0,378 | 62,2 | 45 | 106 | 70,8 |
| | | | | Celkový | 0,2953 | 0,206 | 0,519 | 76,7 | 50 | 178 | 100,0 |
| | | | | Šarže | 0,0366 | 0,014 | 17,085 | 8,5 | 3 | nekonečno | 15,7 |
| | | | | Operátor | 0,0000 | -- | -- | 0,0 | -- | -- | 0,0 |
| 475 | 2500 | 3,4 | 3,2 | Operátor*šarže | 0,0000 | -- | -- | 0,0 | -- | -- | 0,0 |
| | | | | Cyklus (operátor) | 0,0000 | -- | -- | 0,0 | -- | -- | 0,0 |
| | | | | Reziduální | 0,0849 | 0,068 | 0,114 | 19,7 | 16 | 27 | 84,3 |
| | | | | Celkový | 0,0925 | 0,069 | 0,142 | 21,5 | 16 | 34 | 100,0 |
| | | | | Šarže | 0,0230 | 0,009 | 14,422 | 5,3 | 2 | nekonečno | 15,3 |
| | | | | Operátor | 0,0000 | -- | -- | 0,0 | -- | -- | 0,0 |
| | | | | Operátor*šarže | 0,0000 | -- | -- | 0,0 | -- | -- | 0,0 |
| 2376 | 12500 | 4,1 | 4,0 | Cyklus (operátor) | 0,0124 | 0,004 | nekonečno | 2,9 | 1 | nekonečno | 4,4 |
| | | | | Reziduální | 0,0528 | 0,039 | 0,080 | 12,2 | 9 | 19 | 80,3 |
| | | | | Celkový | 0,0589 | 0,044 | 0,090 | 13,6 | 10 | 21 | 100,0 |
| | | | | Šarže | 0,0000 | -- | -- | 0,0 | -- | -- | 0,0 |
| | | | | Operátor | 0,0050 | -- | -- | 1,1 | -- | -- | 0,4 |
| | | | | Operátor*šarže | 0,0000 | -- | -- | 0,0 | -- | -- | 0,0 |
| | | | | Cyklus (operátor) | 0,0429 | 0,023 | 0,209 | 9,9 | 5 | 51 | 30,0 |
| 12357 | 65000 | 4,8 | 4,7 | Reziduální | 0,0655 | 0,049 | 0,100 | 15,2 | 11 | 23 | 69,6 |
| | | | | Celkový | 0,0785 | 0,062 | 0,107 | 18,2 | 14 | 25 | 100,0 |
| | | | | Šarže | 0,0000 | -- | -- | 0,0 | -- | -- | 0,0 |
| | | | | Operátor | 0,0000 | -- | -- | 0,0 | -- | -- | 0,0 |
| | | | | Operátor*šarže | 0,0000 | -- | -- | 0,0 | -- | -- | 0,0 |
| | | | | Cyklus (operátor) | 0,0365 | 0,022 | 0,110 | 8,4 | 5 | 26 | 37,7 |
| | | | | Reziduální | 0,0468 | 0,035 | 0,071 | 10,8 | 8 | 17 | 62,3 |
| 38023 | 200000 | 5,3 | 5,1 | Celkový | 0,0594 | 0,047 | 0,081 | 13,7 | 11 | 19 | 100,0 |
| | | | | Šarže | 0,0000 | -- | -- | 0,0 | -- | -- | 0,0 |
| | | | | Operátor | 0,0000 | -- | -- | 0,0 | -- | -- | 0,0 |
| | | | | Operátor*šarže | 0,0000 | -- | -- | 0,0 | -- | -- | 0,0 |
| | | | | Cyklus (operátor) | 0,0365 | 0,022 | 0,110 | 8,4 | 5 | 26 | 37,7 |
| | | | | Reziduální | 0,0468 | 0,035 | 0,071 | 10,8 | 8 | 17 | 62,3 |
| | | | | Celkový | 0,0594 | 0,047 | 0,081 | 13,7 | 11 | 19 | 100,0 |

Inkluzivita

Výkonnost testu COBAS® AMPLICOR® HBV MONITOR HBV genotypů byla hodnocena analýzou 12 purifikovaných, linearizovaných a kvantifikovaných plazmidových DNA obsahujících reprezentativní vložené sekvence z HBV genotypů A až F (Tabulka 4). Každý plazmid byl zředěn na nominální koncentrace 285, 2852 a 28 517 IU/ml (1500, 15 000 a 150 000 HBV DNA kopií/ml). Každé ředění bylo testováno celkem dvanáctkrát pomocí dvou souprav testu COBAS® AMPLICOR® HBV MONITOR.

Test COBAS® AMPLICOR® HBV MONITOR dával ekvivalentní výsledky pro DNA plazmid hepatitidy B z genotypů A až E (Obrázek 5). Avšak oba DNA plazmidy genotypu F dávaly významně nižší výsledky než nominální vstupní hodnota a nebyl detekován izolát při vstupních koncentracích nižších než 28 517 IU/ml (150 000 HBV DNA kopií/ml). Sekvenční analýza plazmidu DNA genotypu F a jiných sekvencí genotypu F indikovala, že několik nukleotidů bylo mezi izoláty genotypu a sekvencí jednoho z primerů testu COBAS® AMPLICOR® HBV MONITOR nesprávně přiřazeno. Z tohoto důvodu nebude genotyp F amplifikován se stejnou účinností, jako jiné genotypy a bude znamenat nižší výsledek virové zátěže.

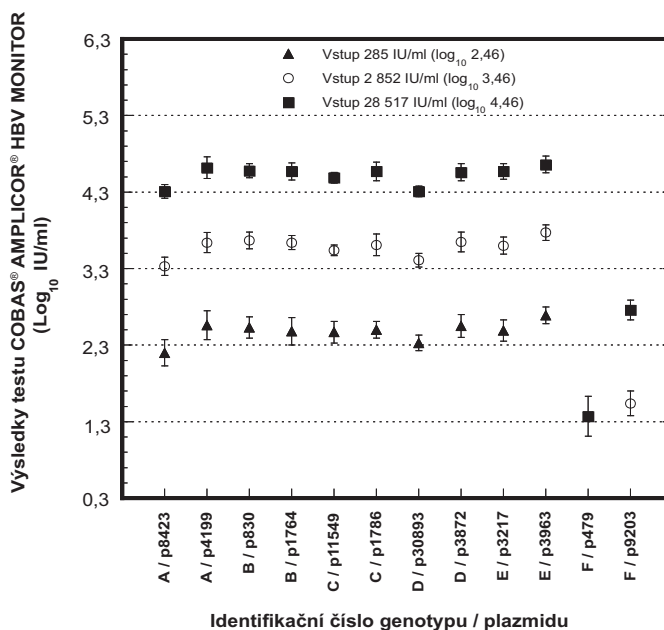
Genotyp G nebyl ve studii s DNA plazmidy testován, protože nebyly k dispozici izoláty. Avšak sekvenční informace z tohoto genotypu naznačuje, že tento genotyp má do virové sekvence vložených 36 nukleotidů zachycených detekční sondou používanou v testu COBAS[®] AMPLICOR[®] HBV MONITOR. Proto se předpokládá, že test nebude genotyp G přesně detekovat.

Byly provedeny doplňkové studie se šedesátosmi HBV-positivními klinickými vzorky známých genotypů. Studie obsahovala nejméně deset individuálních vzorků pro genotypy A až F a jeden vzorek genotypu G. Genotypy A až E byly ekvivalentně aplikovány a detekovány testem COBAS[®] AMPLICOR[®] HBV MONITOR. Výsledky ze vzorků genotypu F indikovaly, že tento genotyp nebyl ekvivalentně aplikován a detekován tímto testem. Jeden klinický vzorek HBV genotypu G přinesl výsledky srovnatelné s těmi získanými u genotypů A až E. Avšak výsledky testu z jednoho klinického vzorku nejsou prediktivní pro výkonnost testu s genotypem G HBV.

Tabulka 4
Test COBAS[®] AMPLICOR[®] HBV MONITOR
Test genotypové inkluzivity - testované plazmidy genotypu

| Označení plazmidu | Genotyp | Mateřská země původu |
|-------------------|---------|----------------------|
| p8423-c1 | A | Indie |
| p4199-c2 | A | Norsko |
| p1764-c1 | B | Čína |
| p830-c1 | B | Společenské ostrovy |
| p1786-c1 | C | Čína |
| p11549-1 | C | Bangladéš |
| p3872-c1 | D | Irán |
| p30893-c5 | D | Švédsko |
| p3217-c1 | E | Senegal |
| p3963-c2 | E | Nigérie |
| p9203-c1 | F | Kolumbie |
| p479-c1 | F | Venezuela |

Obrázek 5
Výkonnost testu COBAS[®] AMPLICOR[®] HBV MONITOR
u HBV genotypů A až F



Klinická specifická

Klinická specifická testu testu COBAS® AMPLICOR® HBV MONITOR byla stanovena analýzou HBV-negativního lidského séra a plazmy s EDTA od dárců krve. Bylo analyzováno celkem 216 vzorků (108 vzorků séra a 108 vzorků EDTA-plazmy), které nereagovaly s jedním nebo více z následujících markerů (HBsAg, HBeAg, anti-HBs, anti-HBe HBc IgG nebo HBc IgM). Všechny vzorky byly negativní pro HBV DNA (Tabulka 5). Z těchto výsledků vyplývá klinická specifická testu COBAS® AMPLICOR® HBV MONITOR ve výši 100%.

Tabulka 5
Klinická specifická testu COBAS® AMPLICOR® HBV MONITOR

| Druh testovaného vzorku | Počet vzorků | COBAS® AMPLICOR® HBV MONITOR Výsledky testu | | |
|-------------------------|--------------|--|---------------|---------------------|
| | | HBV nedetekovatelné | HBV pozitivní | Klinická specifická |
| EDTA plazma a sérum | 216 | 216 | 0 | 100% |
| EDTA plazma | 108 | 108 | 0 | 100% |
| sérum | 108 | 108 | 0 | 100% |

Analytická specifická

Analytická specifická testu COBAS® AMPLICOR® HBV MONITOR byla hodnocena přidáním kultivovaných buněk, virů nebo purifikovaných nukleových kyselin z organismů a virů uvedených v Tabulce 6 do HBV-negativní EDTA lidské plazmy nebo do analyzujících vzorků od infikovaných pacientů. Žádný z non-HBV organismů, virů ani purifikovaných nukleových kyselin nevykázal pozitivitu na HBV DNA.

Tabulka 6
Analytická specifická vzorků

| | |
|--------------------------------|--------------------------------|
| Lidský adenovirus typ 2 | HIV-1, podtyp C |
| Lidský adenovirus typ 3 | HIV-1, podtyp D |
| Lidský adenovirus typ 7 | HIV-1, podtyp E |
| <i>Chlamydia trachomatis</i> | HIV-1, podtyp F |
| Coxsackie virus B1 | HIV-1, podtyp G |
| Cytomegalovirus AD-169 | Genotyp HCV 1a |
| Cytomegalovirus Davis | Genotyp HCV 2b |
| Cytomegalovirus Towne | Genotyp HCV 2a/2c |
| Echovirus 1 | Genotyp HCV 3a |
| Epstein-Barr Virus | Genotyp HCV 3e |
| Hepatitida A | Genotyp HCV 4c/4d |
| Herpes simplex typ I F | Lidský papilloma virus typ 16 |
| Herpes simplex typ I HF | Lidský papilloma virus typ 18 |
| Herpes simplex typ I MacIntyre | Lidský papilloma virus typ 6a |
| Virus Herpes simplex typ II | <i>Propionibacterium acnes</i> |
| Lidský papilloma virus 6B | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| HIV-1, podtyp A | Varicella-zoster virus Ellen |
| HIV-1, podtyp B | Varicella-zoster virus Oka |

Literatura

1. Lee, W. 1997. Hepatitis B Virus Infection. *New England Journal of Medicine*. **337**:1733-1745.
2. Okamoto, H., Tsuda, F., et al. 1988. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen types. *Journal of General Virology*. **69**:2575-2583.
3. Norder, H., Hammas, B., et al. 1992. Comparison of the amino acid sequences of nine different serotypes of hepatitis B surface antigen and genomic classification of the corresponding hepatitis B virus strains. *Journal of General Virology*. **73**:1201-1208.
4. Stuyver, L., De Gendt, S., Van Geyt, C. et al. 2000. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *Journal of General Virology*. **81**:67-74.
5. Arauz-Ruiz, P., Norder, H., Robertson, B. H., et al. 2002. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *Journal of General Virology*. **83**:2059-2073
6. Vieth, S., Manegold, C., Drosten, C., et al. S. 2002. Sequence and phylogenetic analysis of hepatitis B virus genotype G isolated in Germany. *Virus Genes*. **24**:153-156
7. Kato, H., Orito, E., Sugauchi, F., et al. 2003. Frequent coinfection with hepatitis B virus strains of distinct genotypes detected by hybridization with type-specific probes immobilized on a solid-phase support. *Journal of Virological Methods*. **110**:29-35.
8. Beasley, R.P. 1988. Hepatitis B virus - the major etiology of hepatocellular carcinoma. *Cancer*. **61**:1942-1956.
9. Wong, D.H.K., Cheung, A.M., Orourke, K., et al. 1993. Effect of alpha-interferon treatment in patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B: a meta-analysis. *Annals of Internal Medicine*. **119**:312-323.
10. Zuckerman, A.J. and Lavanchy, D. 1999. Treatment options for chronic hepatitis: antivirals look promising. *British Medical Journal*. **319**:799-800.
11. McMahon, B.J. 1998. Chronic carriers of Hepatitis B Virus who clear hepatitis B surface antigen: Are they really "off the hook"? *Hepatology*. **28**:265-267.
12. Huo, T., Wu, J., Lee, P. et al. 1998. Sero-clearance of hepatitis b surface antigen in chronic carriers does not necessarily imply a good prognosis. *Hepatology* **28**:231-236.
13. Niederau, C., Heintges, T., Lange, S. et al. 1996. Long-term follow-up of HBeAg-positive patients treated with interferon alfa for chronic hepatitis B. *New England Journal of Medicine*. **334**:1422-1427.
14. Fattovich, G., Giustina, G., Realdi, G. et al. 1997. Long term outcome of hepatitis B e antigen-positive patients with compensated cirrhosis treated with interferon alfa. *Hepatology*. **26**:1338-1342.

15. Brown, J.L., Carman, W.F. and Thomas, H.C. 1992. The clinical significance of molecular variation within the hepatitis B virus genome. *Hepatology*. **15**:144-148.
16. Hoofnagle, J.H. 1990. Alfa-interferon therapy of chronic hepatitis B. Current status and recommendations. *Hepatology*. **11**:S100-S107.
17. Krogsgaard, K., Kryger, P., Aldershvile, J. et al. 1985. Hepatitis B virus DNA in serum from patients with acute hepatitis B. *Hepatology*. **5**:10-13.
18. Jardi, R., Buti, M., Rodriguez-Frias, F. et al. 1996. The value of quantitative detection of HBV-DNA amplified by PCR in the study of hepatitis B infection. *Journal of Hepatology*. **24**:680-685.
19. Niitsuma, H., Ishii, M., Miura, M. et al. 1997. Low-level hepatitis B viremia detected by polymerase chain reaction accompanies the absence of HBe antigenemia and hepatitis in hepatitis B virus carriers. *American Journal of Gastroenterology*. **92**:119-123.
20. Ranki, M., Schatzl, H.M., Zachoval, R. et al. 1995. Quantification of hepatitis B virus DNA over a wide range from serum for studying viral replicative activity in response to treatment and in recurrent infection. *Hepatology*. **21**:1492-1499.
21. Mason, A.L., Xu, L., Guo, L. et al. 1998. Molecular basis for persistent hepatitis B virus infection in the liver after clearance of serum hepatitis B surface antigen. *Hepatology*. **27**:1736-1742.
22. Saito, T., Shinzawa, H., Uchida, T. et al. 1999. Quantitative DNA analysis of low-level hepatitis B viremia in two patients with serologically negative chronic hepatitis B. *Journal of Medical Virology*. **58**:325-331.
23. Brunetto, M.R., Oliveri, F., Rocca, G. et al. 1989. Natural course and response to interferon of chronic hepatitis B accompanied by antibody to hepatitis B e antigen. *Hepatology*. **10**:198-202.
24. Saracco, G., Mazella, G., Rosina, F. et al. 1989. A controlled trial of human lymphoblastoid interferon in chronic hepatitis B in Italy. *Hepatology*. **10**:336-341.
25. Perillo, R., Schiff, R., Davis, G. et al. 1990. A randomized controlled trial of interferon alpha-2b alone and after prednisone withdrawal for the treatment of chronic hepatitis B. *New England Journal of Medicine*. **323**:295-301.
26. Perez, V., Tanno, H., Villamil, F. et al. 1990. Recombinant interferon alfa-2b following prednisone withdrawal in the treatment of chronic type B hepatitis. *Hepatology*. **11**:S113-S117.
27. Lai, C.-L., Ching, C.-K., Tung, S.K.-M. et al. 1997. Lamivudine is effective in suppressing Hepatitis B Virus DNA in Chinese Hepatitis B surface antigen carriers: A placebo-controlled trial. *Hepatology*. **25**:241-244.
28. Nagata, I., Colucci, G., Gregorio, G.V. et al. 1999. The role of HBV DNA quantitative PCR in monitoring the response to interferon treatment in chronic hepatitis B virus infection. *Journal of Hepatology*. **30**:965-969.
29. Hadziyannis, S.J., Manesis, E.K., and Papakonstantinou, A. 1999. Oral ganciclovir treatment in chronic hepatitis B virus infection: a pilot study. *Journal of Hepatology*. **31**:210-214.

30. Marcellin, P., Chang, T.-T., Lim, S.G. et al. 2003. Adefovir Dipivoxil for the treatment of Hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *New England Journal of Medicine*. **348**:808-816.
31. Puchhammer-Stöckl, E., Mandl, C.W., Kletzmayr, J., et al. 2000. Monitoring the virus load can predict the emergence of drug-resistant hepatitis B virus strains in renal transplant patients during lamivudine therapy. *Journal of Infectious Diseases*. **181**:2063-2066.
32. Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F. et al. 1995. Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**:1350-1354.
33. Mullis, K.B. and Faloona, F.A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* **155**:335-350.
34. Longo, M.C., Berninger, M.S., and Hartley J.L. 1990. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene*. **93**:125-128.
35. Richmond, J.Y. and McKinney, R.W. eds. 1999. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*. HHS Publication Number (CDC) 93-8395.
36. CLSI. Protection of Laboratory Workers from Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids, and Tissue. Approved Guideline. CLSI Document M29-A Villanova, PA:CLSI, 1997.
37. International Air Transport Association. Dangerous Goods Regulations, 41st Edition. 2000. 704 pp.
38. Saldanah, J., et al. 2001. An international collaborative study to establish a World Health Organization international standard for hepatitis B virus DNA nucleic acid amplification techniques. *Vox Sanguinis*. **80**:63-71.



Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ, 08876 USA
Člen Roche Group



Distributed by

Roche Diagnostics
Indianapolis, IN 46256 USA
(For Technical Assistance call the
Roche Response Centre toll free:
1-800 526 1247)

Roche Diagnostics
H7V 4A2 Laval, Quebec
(For Technical Assistance call:
Pour toute assistance technique,
appeler le: 1-877 273 3433)

Roche Diagnostics (Schweiz) AG
CH-6343 Rotkreuz

Roche Diagnostics
F-38240 Meylan

Roche Diagnostics GmbH
D-68298 Mannheim, Germany

Distributore in Italia:
Roche Diagnostics SpA
Piazza Durante 11
I-20131 Milano

Roche Diagnostics S.L.
E-08006 Barcelona

Distribuidor em Portugal:
Roche Farmacêutica Química, Lda
P-2700 Amadora

ROCHE, AMPERASE, AMPLICOR, AMPLILINK, COBAS a TAQMAN jsou obchodní značky společnosti Roche.

ROCHE RESPONSE CENTER je servisní značka společnosti Roche.

Paramagnetické částice Dynabeads® jsou licencovány v rámci patentů ve vlastnictví společnosti Dynal Biotech ASA, Oslo, Norsko. Dynabeads® je registrovaná obchodní známka společnosti Dynal Biotech ASA, Oslo, Norsko, licencovaná subjektu Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, Indiana.

Eppendorf Multipette® a Eppendorf Combitip® jsou registrované obchodní značky společnosti Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburk, Německo.

ProClin® je registrovaná obchodní známka společnosti Rohm and Haas Company.

SST® je registrovaná obchodní známka společnosti Becton Dickinson and Co.

Copyright 2007. Roche Molecular Systems, Inc.
Všechna práva vyhrazena.

5/2007

(00058003550-04ENGL)
05038383001-02



Roche Diagnostics GmbH
D-68298 Mannheim

