COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV Test, version 2.0

PRO DIAGNOSTICKÉ POUŽITÍ *IN VITRO*.

COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV Test, v2.0	**HBV V2.0**	72 Tests	P/N: 04894570 190
COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® Wash Reagent	**PG WR**	5.1 Liters	P/N: 03587797 190

POUŽITÍ

Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV, verze 2.0 (v2.0) je *in vitro* amplifikační test nukleové kyseliny pro kvantifikaci DNA viru hepatitidy B (HBV) v lidské plazmě a séru, s použitím zařízení COBAS® AmpliPrep pro automatizované zpracování vzorků a analyzátoru COBAS® TaqMan® nebo COBAS® TaqMan® 48 pro automatizovanou amplifikaci a detekci.

Tento test je určen pro použití jako pomoc při hodnocení léčby pacientů s chronickou infekcí HBV podstupujících protivirovou terapii. Tento test lze použít pro zjištění hladiny DNA HBV na počátku a během léčby pro pomoc ve vyhodnocení odezvy pacienta na léčbu. Výsledky testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV, v2.0 musí být interpretovány v kontextu všech relevantních klinických a laboratorních nálezů.

Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV, v2.0 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 několika virů, o nichž je známo, že způsobují virovou hepatitidu. Více než dvě miliardy lidí na celém světě jsou infikovány HBV, z čehož více než 350 miliónů osob jsou chronicky infikovaní nosiči[1,2]. Chroničtí nosiči jsou vystaveni vysokému riziku dlouhodobých komplikací následkem infekce zahrnujících chronickou hepatitidu, cirhózu a hepatocelulární karcinom[3,4,5]. Sérologické markery jsou běžně používány jako diagnostické a/nebo prognostické indikátory akutní nebo chronické HBV infekce. Nejběžnějším markerem HBV infekce je přítomnost povrchového antigenu HBV (HBsAg). I když mohou nosiči odstranit HBsAg a vytvořit si protilátky proti HBsAg, zdá se, že dále existuje riziko závažných jaterních komplikací později v průběhu života[6,7]. 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[8,9]. Různé kmeny HBV mohou produkovat buď HBeAg, který není detekovatelný v séru nebo může kmen ztratit schopnost vytvářet HBeAg, I když je přítomna aktivní infekce[10]. Proto může mít tento marker omezené využití při sledování progrese onemocnění[11]. Bylo zjištěno, že schopnost detekce HBV DNA v séru má prognostickou hodnotu s ohledem na výsledek akutní a chronické HBV infekce[12-15]. Metodologie umožňuje detekci HBV DNA po vymizení HBsAg[16] nebo detekci HBV při nedostatku sérologických markerů[17]. 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 měřením jaterních enzymů. Nicméně se soudí, že nejpřímějším a nejspolehlivějším měřením replikace viru je kvantifikace virové DNA HBV v séru nebo plazmě[14,18-20]. Rychlý a trvalý pokles hladin HBV DNA u pacientů léčených alfa-interferonem, Lamivudinem, Gancyklovirem nebo Adefovir Dipivoxilem byl prokázán jako prediktivní faktor úspěšného výsledku léčby[11,21-25]. Monitorování hladin HBV DNA může předpovědět rozvoj rezistence na Lamivudin[26]. Proto je cenným nástrojem kvantitativní test pro měření HBV DNA, který je možné použít spolu s dalšími sérologickými markery v léčbě infekce HBV.

Oddíl s informacemi o revizi dokumentu se nachází na konci tohoto dokumentu.

Množství HBV DNA v plazmě a séru je možné stanovit metodami amplifikace nukleové kyseliny, například využitím polymerázové řetězové reakce (PCR)[27-29]. Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV, v2.0 využívá technologii PCR pro dosažení maximální senzitivity a dynamického rozsahu pro kvantitativní detekci HBV DNA v EDTA nesrážlivé plazmě.

PRINCIPY POSTUPU

Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV, v2.0 je amplifikační test nukleové kyseliny pro kvantifikaci DNA viru hepatitidy B (HBV) v lidské plazmě a séru. Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV, v2.0 je založen na dvou hlavních procesech: (1) příprava vzorku pro izolaci HBV DNA a (2) simultánní PCR amplifikace[27] cílové DNA a detekci rozštěpené, dvojitě značené oligonukleotidové detekční sondy specifické pro cíl.

Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV, v2.0 umožňuje automatizovanou přípravu vzorku následovanou automatizovanou PCR amplifikací a detekcí cílové HBV DNA a kvantifikačního standardu (QS) HBV DNA. Činidlo Master Mix obsahuje páry primerů a sond, které jsou specifické jak pro HBV DNA, tak i pro HBV QS DNA. Činidlo Master Mix bylo vyvinuto tak, aby zajistilo ekvivalentní stanovení množství genotypů HBV A až H. Detekce amplifikované DNA se provádí pomocí cílově specifické a QS specifické, dvojitě značené oligonukleotidové sondy, která umožňuje nezávislou identifikaci amplikonu HBV a HBV QS.

Stanovení množství virové HBV DNA se provádí pomocí kvantifikačního standardu HBV. Kompenzuje účinky inhibitorů a kontroluje přípravné a amplifikační procesy, čímž umožňuje přesnější kvantifikaci HBV DNA v každém vzorku. Jde o neinfekční DNA konstrukci, která obsahuje HBV sekvence s identickými vazebnými místy pro primer jako cílovou HBV DNA a unikátní vazebnou oblast pro sondu, která umožňuje odlišení HBV QS amplikonu od HBV amplikonu.

HBV QS se přidává do každého vzorku o známém počtu kopií a prochází následujícími kroky přípravy vzorku, simultánní PCR amplifikací a detekcí štěpených, dvojitě značených oligonukleotidových detekčních sond. Analyzátor COBAS® TaqMan® nebo COBAS® TaqMan® 48 vypočítává koncentraci HBV DNA v testovaném vzorku srovnáním signálu HBV se signálem HBV QS u každého vzorku a kontroly.

Volba cílové sekvence

Výběr cílové sekvence DNA pro HBV závisí na identifikaci oblastí v genomu HBV, které vykazují maximální zachování sekvencí mezi jednotlivými genotypy HBV. Generická příprava vzorku založená na křemíku je používána pro zachycení HBV DNA a HBV QS DNA a definované oligonukleotidy jsou použity jako primery při amplifikaci HBV DNA a HBV QS DNA. Cílově specifiká a QSspecifická, dvojitě značená oligonukleotidová sonda umožňuje nezávislou identifikaci amplikonu HBV a HBV QS. Proto je patřičný výběr primerů a dvojitě značené oligonukleotidové sondy nezbytný pro schopnost testu amplifikovat a detekovat HBV genotypy. Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV, v2.0 používá pro PCR tři amplifikační primery. Signální, dvojitě značená sonda hybridizuje s komplementárním vláknem a je rozštěpena Z05 DNA polymerázou při polymerizaci primerů. Amplikon genotypů A-F a H se skládá ze sekvencí 145 nukleotidů. Amplikon genotypu G se však skládá z sekvence 181 nukleotidů. Připojení 36 bazí k jednovláknové, velmi zachované pre-Core/Core oblasti v genomu HBV má za následek delší amplikon u genotypu G[31].

Příprava vzorku

Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV, v2.0 využívá automatizovanou přípravu vzorku na zařízení COBAS® AmpliPrep pomocí generické vychytávací technologie založené na křemíku. Procedura zpracovává 500 µl plazmy nebo séra. HBV virové částice jsou rozštěpeny inkubací při zvýšené teplotě s proteázou a chaotropním lytickým/vazebným pufrem, který uvolňuje nukleové kyseliny a chrání uvolněnou HBV DNA před působením DNáz v plazmě a séru. Proteáza a známý počet molekul HBV QS DNA jsou přidány do každého vzorku spolu s lytickým činidlem a magnetickými skleněnými částicemi. Následně je směs inkubována a HBV DNA a HBV QS DNA jsou navázány na povrch skleněných částic. Nenavázané substance, jako soli, bílkoviny a ostatní buněčné nečistoty, jsou odstraněny propláchnutím magnetických skleněných částic. Po separaci kuliček a dokončení oplachování jsou absorbované nukleové kyseliny eluovány při zvýšené teplotě pomocí vodného roztoku. Zpracovaný vzorek, obsahující magnetické skleněné částice a uvolněnou HBV DNA a HBV QS DNA, je přidán do amplifikační směsi a přemístěn do analyzátoru COBAS® TaqMan® nebo COBAS® TaqMan® 48.

PCR amplifikace

Amplifikační PCR reakce je prováděna pomocí termostabilního rekombinantního enzymu *druhu Thermus* Z05 DNA polymerázy (Z05). V přítomnosti manganu (Mn^{2+}) a při vhodných podmínkách pufru má Z05 DNA polymerázovou aktivitu[32,33]. To umožňuje PCR amplifikaci spolu detekcí amplikonu v reálném čase.

Zpracované vzorky se přidají do amplifikační směsi v amplifikačních zkumavkách (K-zkumavkách), ve kterých probíhá PCR amplifikace. V přítomnosti Mn^{2+} a nadbytku deoxynukleotid-trifosfátů (dNTPs), mezi něž patří deoxyadenozin-, deoxyguanozin-, deoxycytidin- a deoxyuridin-triphosfáty, polymerizuje DNA Z05 polymeráza hybridizované primery za vzniku vlákna DNA.

Amplifikace cíle

Termocykler v analyzátoru COBAS® TaqMan® nebo COBAS® TaqMan® 48 zahřívá reakční směs pro denaturaci dvouvláknové DNA a vystavuje specifické cílové sekvence primeru na cirkulárním genomu HBV DNA a HBV QS DNA. Při chladnutí směsi se primery připojí k cílové DNA. Termostabilní Z05 DNA polymeráza (Z05) *druh Thermus* v přítomnosti Mn^{2+} a nadbytku deoxynukleotid-trifosfátů (dNTP), tj. deoxyadenozin-, deoxyguanozin-, deoxycytidin- a deoxyuridin-(místo deoxythymidin-) trifosfátu, polymerizuje primery po hybridizaci podél cílového templátu a vytváří molekulu dvouvláknové DNA nazývanou amplikon. Analyzátor COBAS® TaqMan® nebo COBAS® TaqMan® 48 opakuje automaticky tento proces po určený počet cyklů, kdy při každém cyklu dojde ke zdvojení množství amplikonové DNA. Požadovaný počet cyklů je předem naprogramovaný v analyzátoru COBAS® TaqMan® nebo COBAS® TaqMan® 48. 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® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV, v2.0 použitím enzymu AmpErase (uracil-N-glykosylázy) a deoxyuridin-trifosfátu (dUTP). Enzym AmpErase rozpozná a katalyzuje rozklad řetězců DNA obsahujících deoxyuridin[34], ale nikoliv DNA obsahující deoxythymidin. Deoxyuridin se v přirozené DNA nevyskytuje, je však vždy přítomen v amplikonu, díky použití deoxyuridin-trifosfátu jako jednoho z dNTP v činidle Master Mix, takže deoxyuridin obsahuje pouze amplikon. V důsledku přítomnosti deoxyuridinu je kontaminovaný amplikon citlivý vůči destrukci enzymem AmpErase před amplifikací cílové DNA. Jakýkoliv nespecifický produkt vytvořený po iniciální aktivaci Master Mix manganem je zničen enzymem AmpErase. Enzym AmpErase, který je obsažený v činidle Master Mix, katalyzuje rozštěpení DNA obsahující deoxyuridin v místě deoxyuridinového zbytku rozevřením deoxyribozového řetězce v pozici C1. Když je řetězec amplikonové DNA v prvním tepelně cyklizačním kroku zahříván, štěpí se v poloze deoxyuridinu, čímž se DNA stává neamplifikovatelnou. Enzym AmpErase zůstává neaktivní po delší dobu, jakmile je vystaven teplotám nad 55 °C, tzn. v průběhu kroků tepelného cyklování, a proto nerozkládá cílový amplikon vzniklý během amplifikace.

Detekce produktů PCR v testu COBAS® TaqMan®

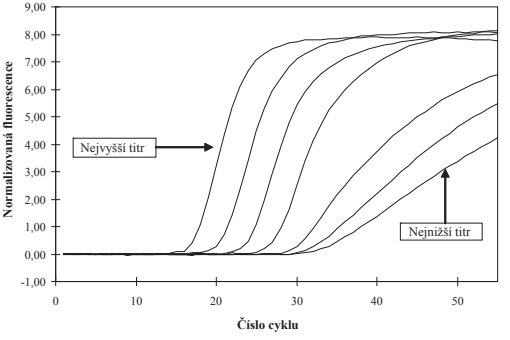
Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV v2.0 využívá v reálném čase běžící[27,28] PCR technologii. Použití dvojitě značených fluorescenčních sond umožňuje detekci akumulace PCR produktů v reálném čase monitorováním intenzity emise fluorescenčního barviva uvolněného během amplifikačního procesu. Sondy se skládají z HBV a HBV QS-specifických oligonukleotidových sond s oznamovacím a tlumícím barvivem. V testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV, v2.0 jsou HBV a HBV QS sondy značeny různými fluorescenčními oznamovacími barvivy. Jsou-li tyto sondy intaktní, je fluorescence oznamovacího barviva potlačena blízkostí tlumícího barviva kvůli vlivu Försterova přenosu energie. Při PCR hybridizuje sonda s cílovou sekvencí a je rozštěpena 5' → 3' nukleázovou aktivitou termostabilní Z05 DNA polymerázy. Jakmile je oznamovací a tlumící barvivo uvolněno a odděleno, nedochází nadále k útlumu a fluorescenční aktivita oznamovacího barviva se zvýší. Amplifikace HBV DNA a HBV QS DNA je měřena nezávisle při různých vlnových délkách. Tento proces je opakován po předem určený počet cyklů, přičemž každý cyklus efektivně zvyšuje emisní intenzitu jednotlivého oznamovacího barviva a umožňuje nezávislou identifikaci HBV a HBV QS DNA. PCR cyklus, při němž růstová křivka začíná exponenciální růst, souvisí s množstvím počátečního materiálu na začátku PCR reakce.

Základy kvantifikace v testu COBAS® TaqMan®

Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV, v2.0 je kvantitativní ve velmi širokém dynamickém rozmezí, protože monitorování amplikonu je prováděno v exponenciální fázi amplifikace. Čím vyšší je titr HBV ve vzorku, tím dřív překročí fluorescence oznamovacího barviva HBV sondy základní hladinu fluorescence (viz obrázek 1). Protože je množství HBV QS DNA konstantní ve všech vzorcích, tak by se měla fluorescence oznamovacího barviva sondy HBV QS objevit ve stejném cyklu u všech vzorků (viz obrázek 2). Ve vzorcích, v nichž je fluorescence QS postižena, je koncentrace upravena odpovídajícím způsobem. Objevení specifických fluorescenčních signálů je hlášeno jako kritická prahová hodnota (Ct). Ct je definována jako dílčí číslo cyklu, kdy fluorescence oznamovacího barviva překročí přednastavenou prahovou hodnotu (určenou fluorescenční hladinu) a začne exponenciální růstovou fázi tohoto signálu (viz obrázek 3). Vyšší Ct hodnota značí nižší titr původního HBV cílového materiálu. Dvojnásobný vzestup titru koreluje s poklesem o 1 Ct pro cílovou HBV DNA, zatímco desetinásobný vzestup titru koreluje s poklesem o 3,3 Ct.

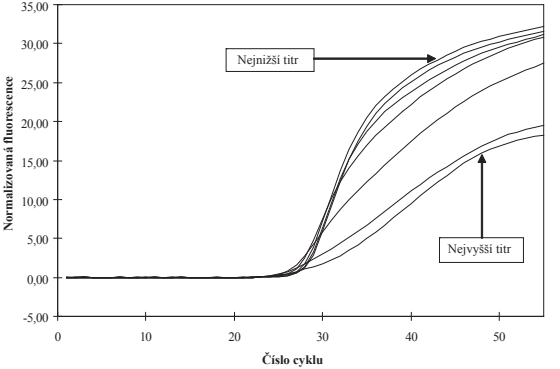
Obrázek 1 ukazuje cílové růstové křivky pro série ředění v rozsahu 5-$\log_{10}$. Jakmile koncentrace viru narůstá, růstové křivky se posouvají do dřívějších cyklů. Proto růstová křivka nejvíce vlevo odpovídá nejvyššímu titru viru, zatímco růstová křivka nejvíce vpravo odpovídá nejnižšímu titru viru.

Obrázek 1
Cílové růstové křivky pro série ředění viru v rozsahu 5-Log_{10}



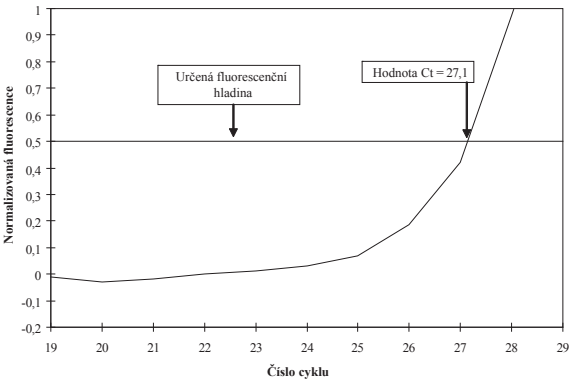
Obrázek 2 ukazuje růstové křivky kvantifikačního standardu pro vzorky ze sérií ředění viru zaujímající rozsah 5-$\log_{10}$. Množství kvantifikačního standardu přidaného do každého vzorku je konstantní pro každou reakci. Ct hodnota kvantifikačního standardu je stejná bez ohledu na titr viru.

Obrázek 2
Růstové křivky kvantifikačního standardu pro série ředění viru v rozsahu 5-Log$_{10}$



Na obrázku 3 je znázorněn příklad, jak jsou hodnoty fluorescence v každém cyklu normalizovány pro každou růstovou křivku. Dílčí číslo cyklu (Ct) je vypočítáno tam, kde fluorescenční signál překročí „Určenou fluorescenční hladinu“.

Obrázek 3
Hodnoty fluorescence v každém cyklu jsou normalizovány pro každou růstovou křivku



Kvantifikace HBV DNA

Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV, v2.0 stanovuje množství DNA HBV viru pomocí druhé cílové sekvence (kvantifikační standard HBV), který je do testovaného vzorku přidán o známé koncentraci. HBV QS je neinfekční DNA konstrukce, která obsahuje fragmenty HBV sekvencí s vazebnými oblastmi pro primer identickými s cílovými sekvencemi HBV. HBV QS obsahuje vazebné oblasti pro HBV primer a vytváří amplifikační produkt stejné délky a základního složení jako cílová HBV DNA. Vazebná oblast pro detekční sondu pro HBV QS byla modifikována pro odlišení amplikonu HBV QS od cílového amplikonu HBV.

Při hybridizační fázi PCR reakce v analyzátoru COBAS® TaqMan® nebo COBAS® TaqMan® 48 jsou vzorky osvětleny a excitovány filtrovaným světlem a filtrovaná emisní fluorescenční data jsou shromažďována pro každý vzorek. Hodnoty pro každý vzorek jsou poté korigovány na kolísání hodnot zařízení. Tyto hodnoty fluorescence jsou odeslány zařízením do softwaru AMPLILINK a uloženy v databázi. Předběžné kontroly se používají pro stanovení, zda údaje HBV DNA a HBV QS DNA reprezentují sady, které jsou platné a jsou vytvářeny příznaky v případě, že data leží mimo nastavené limity. Po dokončení a splnění všech předběžných kontrol jsou hodnoty fluorescence zpracovány pro vytvoření Ct hodnot pro HBV DNA a HBV QS DNA. Kalibrační konstanty specifické pro šarži poskytované spolu s testem COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV, v2.0, jsou používány pro kalkulaci hodnoty titru pro vzorky a kontroly založené na Ct hodnotách HBV DNA a HBV QS DNA. Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV, v2.0 je standardizován dle mezinárodního standardu WHO pro testování technologie analýzy nukleových kyselin (WHO International Standard for Hepatitis B Virus DNA for Nucleic Acid Technology (NAT) Assays Testing (NIBSC 97/746)[29]) a hodnoty titru jsou udávány v mezinárodních jednotkách (IU/ml).

ČINIDLA

COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV Test, v2.0 **HBV V2.0** 72 testů
(P/N: 04894570 190)

HBV2 CS1 **1 x 72 testů**
(HBV kazeta s činidly pro magnetické skleněné částice) 1 x 7,0 ml
Magnetické skleněné částice
93% Isopropanol

Xi 93% (hm.) Isopropanol
Dráždivý

F 93% (hm.) Isopropanol
Vysoce hořlavý

HBV2 CS2 **1 x 72 testů**
(HBV kazeta s lytickým činidlem) 1x 78 ml
Dihydrát citrátu sodného
42,5% Guanidinthiokyanát
< 5% Polydokanol
0,9% Dithiothreitol

Xn 42,5% (hm.) Guanidinthiokyanát
Zdraví škodlivý

N < 5% (hm.) Polydokanol
Nebezpečný pro životní prostředí

HBV2 CS3 **1 x 72 testů**
HBV Multičinidlová kazeta obsahuje:

Pase **1 x 3,8 ml**
(Roztok proteinázy)
Tris pufr
< 0,05% EDTA
Chlorid vápenatý
Octan vápenatý
≤ 7,8% Proteináza
Glycerol
Xn ≤ 7,8% (hm.) Proteináza
Zdraví škodlivý

EB, v2.0 **1 x 8,1 ml**
(Eluční pufr, v2.0)
Tříbázový pufr
0,2% Methylparaben

HBV2 CS4 **1 x 72 testů**
HBV kazeta s činidly pro test obsahuje:

HBV QS, v2.0 **1 x 3,6 ml**
(HBV kvantifikační standard, v2.0)
Pufr Tris-HCl
EDTA
< 0,005% Poly rA RNA (syntetická)
< 0,001% neinfekční, linearizovaný, dvouvláknový plazmid DNA obsahující vazebné sekvence HBV primeru a unikátní oblast pro vazbu sondy
0,05% Azid sodný

HBV MMX, v2.0 **1 x 3,4 ml**
(HBV Master Mix, v2.0)
Tricinový pufr
Octan draselný
Hydroxid draselný
0,09% Azid sodný
Glycerol
< 0,04% dATP, dCTP, dGTP, dUTP
< 0,003% Upstream a downstream HBV primery
< 0,003% Oligonukleotidový aptamer
< 0,003% Fluorescenčně značené oligonukleotidové sondy specifické pro HBV a kvantifikační standard HBV
< 0,05% Z05 DNA polymeráza (mikrobiální)
< 0,1% enzym AmpErase (uracil-N-glykosyláza) (mikrobiální)

HBV Mn^{2+} **1 x 19,8 ml**
(HBV roztok manganu)
< 0,5% Octan manganatý
Ledová kyselina octová
0,09% Azid sodný

HBV H(+)C, v2.0 **6 x 1,0 ml**

(HBV vysoce pozitivní kontrola, v2.0)
< 0,001% linearizovaná dvouvláknová plazmidová DNA obsahující HBV sekvence
Negativní lidská plazma, nereagující podle testů na protilátky proti HCV, protilátky proti HIV-1/2, HIV p24 antigenu a HBsAg; HIV-1 RNA, HCV RNA a HBV DNA nedetekovatelné PCR metodami
0,1% konzervant ProClin® 300

Xi směs (3:1) 5-chloro-2-methyl-2H-isothiazol-3-onu a 2-methyl-2H-isothiazol-3-onu

Dráždivý

R36/38: Dráždí oči a kůži.
R43: Může vyvolat senzibilizaci při styku s kůží.

HBV L(+)C, v2.0 **6 x 1,0 ml**

(HBV nízce pozitivní kontrola, v2.0)
< 0,001% linearizovaná dvouvláknová plazmidová DNA obsahující HBV sekvence
Negativní lidská plazma, nereagující podle testů na protilátky proti HCV, protilátky proti HIV-1/2, HIV p24 antigenu a HBsAg; HIV-1 RNA, HCV RNA a HBV DNA nedetekovatelné PCR metodami
0,1% konzervant ProClin® 300

Xi směs (3:1) 5-chloro-2-methyl-2H-isothiazol-3-onu a 2-methyl-2H-isothiazol-3-onu

Dráždivý

R36/38: Dráždí oči a kůži.
R43: Může vyvolat senzibilizaci při styku s kůží.

CTM (–) C **6 x 1,0 ml**

[COBAS® TaqMan® negativní kontrola (lidská plazma)]
Negativní lidská plazma, nereagující podle testů na protilátky proti HCV, protilátky proti HIV-1/2, HIV p24 antigenu a HBsAg; HIV-1 RNA, HCV RNA a HBV DNA nedetekovatelné PCR metodami
0,1% konzervant ProClin® 300

Xi směs (3:1) 5-chloro-2-methyl-2H-isothiazol-3-onu a 2-methyl-2H-isothiazol-3-onu

Dráždivý

R36/38: Dráždí oči a kůži.
R43: Může vyvolat senzibilizaci při styku s kůží.

HBV H(+)C, v2.0 Clip **1 x 6 klipů**

(Klipy s čárovým kódem pro vysoce pozitivní kontrolu HBV, v2.0)

HBV L(+)C, v2.0 Clip **1 x 6 klipů**

(Klip s čárovým kódem pro nízce pozitivní kontrolu HBV, v2.0)

HBV (–) C Clip **1 x 6 klipů**

(HBV klipy s čárovým kódem pro negativní kontrolu)

COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® Wash Reagent **PG WR** 1 x 5,1 l
COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® mycí činidlo
(P/N: 03587797 190)

PG WR
(COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® mycí činidlo)
Dihydrát citrátu sodného
< 0,1% N-Methylisothiazolon-HCl

VAROVÁNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

A. **PRO ÚČELY DIAGNOSTIKY *IN VITRO***.

B. Tento test je určen pro použití s lidským sérem nebo plazmou odebranou do antikoagulantu EDTA.

C. Nepipetujte ústy.

D. V laboratorních prostorech nejezte, nepijte a nekuřte. Při manipulaci se vzorky a s činidly ze soupravy noste ochranné rukavice na jedno použití, laboratorní pláště a prostředek pro ochranu očí. Po manipulaci se vzorky a činidly si pečlivě umyjte ruce.

E. **Při odebírání alikvotních podílů z kontrolních lahviček dbejte na to, aby nedošlo k mikrobiální nebo ribonukleázové kontaminaci.**

F. **Doporučuje se používat sterilní pipety na jedno použití a hroty na pipety bez DNázy.**

G. Nemíchejte dohromady kontroly z různých šarží, ani z různých lahviček téže šarže.

H. Nesmíchávejte kazety na činidla ani kontroly z různých souprav.

I. Neotevírejte kazety COBAS® AmpliPrep ani nevyměňujte, nemíchejte, neodstraňujte ani nepřidávejte láhve.

J. Nespotřebovaná činidla, odpad a vzorky likvidujte v souladu se státními a místními předpisy.

K. Po uplynutí data expirace již soupravu nepoužívejte.

L. Materiálové bezpečnostní listy (Material Safety Data Sheets, MSDS) jsou na požádání k dispozici u místního zastoupení firmy Roche.

M. Manipulace se vzorky a kontrolami se musí řídit pravidly pro zacházení s infekčním materiálem. Musí být používány bezpečné laboratorní postupy, např. postupy uvedené v publikaci *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*[35] a v dokumentu CLSI č. M29-A3[36]. Všechny plochy důkladně očistěte a vydezinfikujte čerstvě připraveným 0,5% roztokem chlornanu sodného v deionizované nebo destilované vodě.

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

N. **UPOZORNĚNÍ: CTM (–) C**, **HBV L(+)C, v2.0** a **HBV H(+)C, v2.0** obsahují lidskou plazmu pocházející z lidské krve. Zdrojový materiál byl testován a byl shledán nereaktivním na přítomnost povrchového antigenu hepatitidy B (HBsAg), protilátek proti HIV-1/2 a HCV a antigenu HIV p24. 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 všechen materiál lidského původu za potenciálně infekční.

S **CTM (–) C**, **HBV L(+)C, v2.0** a **HBV H(+)C, v2.0** je třeba zacházet jako s infekčním materiálem a při práci s nimi 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-A3[36]. Všechny plochy důkladně očistěte a vydezinfikujte čerstvě připraveným 0,5% roztokem chlornanu sodného v deionizované nebo destilované vodě.

O. **HBV QS, v2.0, HBV Mn^{2+}** a **HBV MMX, v2.0** obsahuje azid sodný. Ten může reagovat s olověným nebo měděným potrubím a vytvářet vysoce explozivní kovové azidy. Při likvidaci roztoků obsahujících azid sodný do laboratorního umyvadla propláchněte odtok velkým množstvím vody, abyste tak zabránili vytváření azidů.

P. Při práci s jakýmkoliv činidlem používejte rukavice na jedno použití, pracovní oděv a ochranné brýle. 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 některé činidlo rozlije, před vytřením dosucha je zřeďte vodou.

Q. Dbejte na to, aby **HBV2 CS2** a tekutý odpad ze zařízení COBAS® AmpliPrep, který obsahuje guanidin thiokyanát, nepřišel do styku s roztokem chlornanu sodného (bělidlo). Ze směsi by se mohl uvolňovat vysoce toxický plyn.

R. Při likvidaci jednotek pro zpracování vzorku (SPU – Sample Processing Unit) ze zařízení COBAS® AmpliPrep, které obsahují guanidinthiokyanát, zabraňte jakémukoli kontaktu s roztokem chlornanu sodného (bělidlo). Ze směsi by se mohl uvolňovat vysoce toxický plyn.

POŽADAVKY NA SKLADOVÁNÍ A MANIPULACI

A. ***Činidla ani kontroly nezmrazujte***.

B. Skladujte **HBV2 CS1**, **HBV2 CS2**, **HBV2 CS3** a **HBV2 CS4** při teplotě 2–8 °C. Pokud jsou tato činidla nepoužitá, jsou stabilní až do vypršení uvedené doby použitelnosti. Po použití jsou při teplotě 2–8 °C stálá ještě 63 dní nebo do data expirace, je-li tato doba kratší. **HBV2 CS1**, **HBV2 CS2**, **HBV2 CS3** a **HBV2 CS4** je možné v zařízení COBAS® AmpliPrep použít maximálně po celkovou dobu 64 hodin. Činidla musí být mezi jednotlivými cykly uchována při teplotě 2–8 °C.

C. Skladujte **HBV H(+)C, v2.0**; **HBV L(+)C, v2.0** a **CTM (–) C** při teplotě 2–8 °C. Kontroly jsou stálé do vyznačeného data expirace. Po otevření je nutné nespotřebovanou část zlikvidovat.

D. Skladujte klipy s čárovým kódem [**HBV H(+)C, v2.0 Clip**, **HBV L(+)C, v2.0 Clip** a **HBV (–) C Clip**] při teplotě 2–30 °C.

E. Skladujte **PG WR** při teplotě 2–30 °C. **PG WR** je stálý až do vypršení vyznačené doby expirace. Po otevření je toto činidlo stabilní při teplotě 2–30 °C po dobu 28 dní nebo do data expirace, je-li tato doba kratší.

DODÁVANÝ MATERIÁL

A. **COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV Test, v2.0** **HBV V2.0**
(P/N: 04894570 190)

HBV2 CS1
(HBV kazeta s činidly pro magnetické skleněné částice)

HBV2 CS2
(HBV kazeta s lytickým činidlem)

HBV2 CS3
(HBV multičinidlová kazeta)

HBV2 CS4
(kazeta s činidly specifickými pro Test HBV)

HBV H(+)C, v2.0
(HBV vysoce pozitivní kontrola, v2.0)

HBV L(+)C, v2.0
(HBV nízce pozitivní kontrola, v2.0)

CTM (–) C
[COBAS® TaqMan® negativní kontrola (lidská plazma)]

HBV H(+)C, v2.0 Clip
(klip s čárovým kódem pro HBV vysoce pozitivní kontrolu, v2.0)

HBV L(+)C, v2.0 Clip
(klip s čárovým kódem pro HBV nízce pozitivní kontrolu, v2.0)

HBV (–) C Clip
(klip s čárovým kódem pro HBV negativní kontrolu)

B. **COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® Wash Reagent** **PG WR**
COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® mycí činidlo
(P/N: 03587797 190)

PG WR
(COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® mycí činidlo)

POTŘEBNÝ MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ DODÁVKY

Vybavení a software

- Zařízení COBAS® AmpliPrep
- Analyzátor COBAS® TaqMan® nebo COBAS® TaqMan® 48
- Volitelné: Dokovací stanice
- Volitelné: Zařízení **cobas p** 630
- Software AMPLILINK, verze 3.2 nebo 3.3
- Datová stanice pro software AMPLILINK s tiskárnou
- Příručky pro software AMPLILINK verze 3.2 nebo 3.3:
  - Uživatelská příručka pro zařízení COBAS® AmpliPrep pro použití s analyzátorem COBAS® TaqMan®, analyzátorem COBAS® TaqMan® 48, analyzátorem COBAS® AMPLICOR® nebo se zařízením **cobas p** 630 a se softwarem AMPLILINK, verze 3.2 nebo 3.3
  - Příručka k analyzátoru COBAS® TaqMan® (plus k volitelné dokovací stanici) pro použití s aplikační příručkou softwaru AMPLILINK, verze 3.2 a 3.3
  - Příručka k analyzátoru COBAS® TaqMan® 48 při použití s aplikační příručkou softwaru AMPLILINK, verze 3.2 a 3.3
  - Aplikační příručka softwaru AMPLILINK verze 3.2 pro použití se zařízením COBAS® AmpliPrep, analyzátorem COBAS® TaqMan® a analyzátorem COBAS® TaqMan® 48 a analyzátorem COBAS® AMPLICOR®

    nebo
  - Aplikační příručka softwaru AMPLILINK verze 3.3 pro použití se zařízením COBAS® AmpliPrep, analyzátorem COBAS® TaqMan®, analyzátorem COBAS® TaqMan® 48, analyzátorem COBAS® AMPLICOR® a zařízením **cobas p** 630
  - Volitelné: příručka obsluhy **cobas p** 630, verze softwaru 2.2

Spotřební materiál

- Jednotky pro zpracování vzorku: SPU
- Vstupní zkumavky pro vzorek (S-zkumavky) s klipy s čárovým kódem
- Stojany s K-špičkami
- Krabice s K-zkumavkami v počtu 12 x 96

DALŠÍ POTŘEBNÝ MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ DODÁVKY

- Stojan na vzorky (stojan SK24)
- Stojan na činidlo
- Stojan SPU
- K-nosič
- Přemísťovač K-nosiče
- Stojan na K-nosiče
- Pipetory s aerosolovou bariérou nebo špičkami bez DNázy s pozitivním posunem (obsah 1000 µl)*
- Rukavice na jedno použití bez pudru
- Vířivý mixér

* *Pipetory musí být přesné s 3% objemovou chybou. Kde je tak uvedeno, musejí být použity špičky s aerosolovou bariérou nebo špičky s pozitivním posunem bez DNázy, aby se zabránilo vzájemné kontaminaci vzorku a amplikonu.*

ODBĚR, PŘEPRAVA A SKLADOVÁNÍ VZORKŮ

Pozn.: Zacházejte se vzorky a kontrolami jako s potenciálně infekčním materiálem.

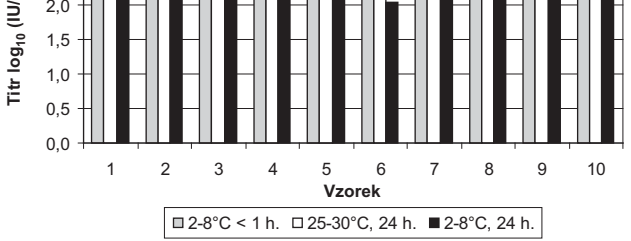
Pozn.: Tento test je validován pro používání pouze s lidským sérem nebo plazmou odebranou do EDTA jako antikoagulantu. Testování jiných typů vzorků může vést k nepřesným výsledkům.

A. Odběr vzorků

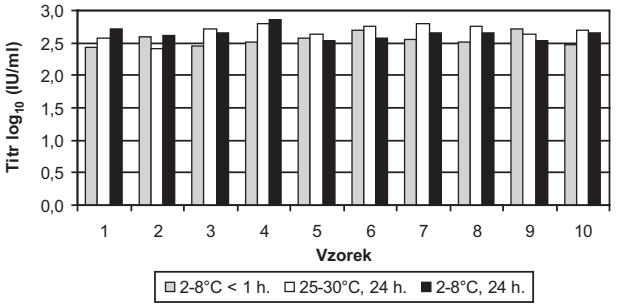
Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV, v2.0 je určen pro použití se vzorky plazmy nebo séra. Krev se odebírá do sterilních zkumavek za použití EDTA (uzávěr levandulové barvy) jako antikoagulantu nebo do zkumavek SST® (zkumavky pro separaci séra).

Plnou krev uchovávejte při teplotě 2–25 °C maximálně 24 hodin. Sérum nebo plazmu z krve separujte do 24 hodin od odběru, a to odstřeďováním při 800-1600 x g po dobu 20 minut za pokojové teploty (15–30 °C). Plazmu nebo sérum přeneste do sterilní polypropylenové zkumavky. Na obrázcích 4 a 5 jsou uvedeny údaje o stabilitě vzorků ze studií o stabilitě vzorků provedených pro test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV, v2.0.

Obrázek 4
Stabilita HBV v plné krvi (odebrané do plazmových zkumavek s EDTA)



Obrázek 5
Stabilita HBV v plné krvi (odebrané do zkumavek pro separaci séra)



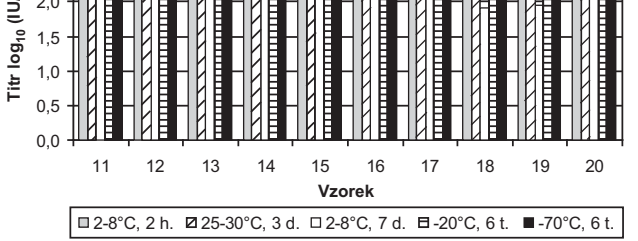
B. Přeprava vzorků

Při přepravě plné krve, plazmy nebo séra je třeba dodržovat celostátní resp. místní předpisy o dopravě etiologických látek[37]. Plná krev se přepravuje za teplot 2–25 °C a musí se odstředit do 24 hodin od odběru. Plazma nebo sérum se může přepravovat při teplotě 2–8 °C nebo ve zmrazeném stavu při teplotách -20 °C až -80 °C.

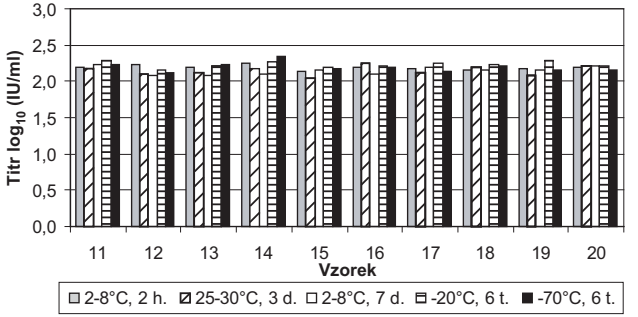
C. Skladování vzorků

Vzorky plazmy nebo séra mohou být skladovány při teplotě 25–30 °C až po dobu 3 dnů, při teplotě 2–8 °C až po dobu 7 dnů nebo zmrazené na teplotu -20 °C až -80 °C po dobu nejméně šesti týdnů. Doporučuje se vzorky uchovávat v alikvotních podílech po 800-900 µl ve sterilních polypropylenových zkumavkách o objemu 2,0 ml se šroubovacím uzávěrem (například Sarstedt 72.694.006). Na obrázcích 6 a 7 jsou uvedeny údaje o stabilitě vzorků ze studií o skladování vzorků provedených pro test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV, v2.0.

Obrázek 6
Stabilita HBV v EDTA plazmě

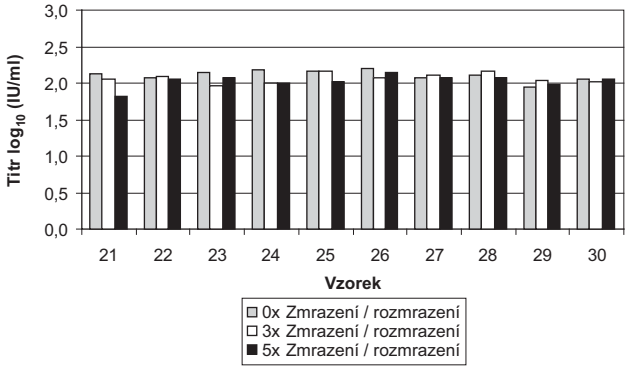


Obrázek 7
Stabilita HBV v séru

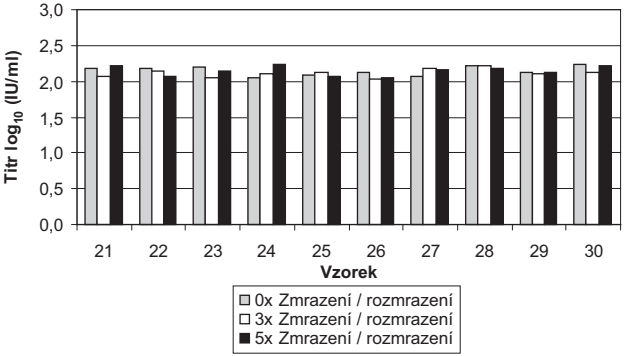


Vzorky plazmy a séra mohou být zmrazeny a rozmrazeny maximálně pětkrát bez ztráty HBV DNA. Na obrázcích 8 a 9 jsou uvedeny údaje ze studií o zmrazování-rozmrazování vzorků provedených pro test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV, v2.0

Obrázek 8
Výsledky HBV po až pěti cyklech zmrazení-rozmrazení (F-T) (v EDTA plazmě)



Obrázek 9
Výsledky HBV po až pěti cyklech zmrazení-rozmrazení (F-T) (sérum)



NÁVOD K POUŽITÍ

Pozn.: ***Podrobné provozní pokyny, podrobný popis možných konfigurací, tisku výsledků a interpretaci příznaků, komentářů a chybových zpráv naleznete (1) v uživatelské příručce k zařízení COBAS® AmpliPrep pro použití s analyzátorem COBAS® TaqMan®, analyzátorem COBAS® TaqMan® 48, analyzátorem COBAS® AMPLICOR® nebo zařízením cobas p 630 a softwarem AMPLILINK, verze 3.2 a 3.3 (2) uživatelské příručce k analyzátoru COBAS® TaqMan® (s volitelnou dokovací stanicí) pro použití se softwarem AMPLILINK, verze 3.2 a 3.3 (3) v uživatelské příručce k analyzátoru COBAS® TaqMan® 48 pro použití se softwarem AMPLILINK, verze 3.2 a 3.3 (4) v aplikační příručce k softwaru AMPLILINK verze 3.2 pro použití se zařízením COBAS® AmpliPrep, analyzátorem COBAS® TaqMan®, analyzátorem COBAS® TaqMan® 48 a analyzátorem COBAS® AMPLICOR® nebo aplikační příručkou k softwaru AMPLILINK verze 3.3 pro použití se zařízením COBAS® AmpliPrep, analyzátorem COBAS® TaqMan®, analyzátorem COBAS® TaqMan® 48, analyzátorem COBAS® AMPLICOR® a zařízením cobas p 630 (5) volitelné: příručka obsluhy cobas p 630, verze softwaru 2.2.***

Velikost dávky

Každá souprava obsahuje dostatek činidel pro 72 testů, které mohou být provedeny v dávkách po 12 až 24 testech. Alespoň jedna z každé kontroly **CTM (–) C**, **HBV L(+)C, v2.0** a **HBV H(+)C, v2.0** musí být zahrnuta do každé dávky (viz část "Kontrola kvality").

Pracovní postup

Cyklus analyzátoru COBAS® TaqMan® nebo COBAS® TaqMan® 48 musí být započat do 120 minut po dokončení přípravy vzorku a kontroly.

Pozn.: ***Nezmrazujte ani neskladujte zpracované vzorky a kontroly.***

Příprava vzorku a kontroly

Pozn.: ***Používáte-li vzorky zmrazené, ponechte je před použitím při pokojové teplotě (15–30 °C), dokud úplně nerozmrznou a ponechte je 3–5 sekund vířit. Kontroly by měly být před použitím vyjmuty ze skladování při teplotě 2–8 °C a vyrovnány na okolní teplotu.***

Nastavení zařízení COBAS® AmpliPrep

Část A. Údržba a plnění

A1. Zařízení COBAS® AmpliPrep je připraveno k práci v pohotovostním režimu.

A2. Zapněte datovou stanici pro software AMPLILINK (**ON**). Připravte datovou stanici dle následujícího návodu:

a. Přihlaste se k operačnímu systému Windows® XP.

b. Dvakrát klikněte na ikonu softwaru AMPLILINK.

c. Přihlaste se k softwaru AMPLILINK zadáním přiděleného uživatelského jména a hesla.

A3. Zkontrolujte zásobu **PG WR** pomocí obrazovky **Status** a v případě potřeby jej doplňte.

A4. Proveďte veškerou údržbu, jak je uvedeno v záložce **Due**. Zařízení COBAS® AmpliPrep automaticky naplní systém.

Část B. Plnění kazet s činidly

Pozn.: Všechny kazety s činidly by měly být vyjmuty ze skladovacího místa s teplotou 2–8 °C, okamžitě vloženy do zařízení COBAS® AmpliPrep a ponechány pro vyrovnání s okolní teplotou v zařízení po dobu minimálně 30 minut předtím, než bude zpracován první vzorek. Nenechejte kazety s činidly vyrovnat s teplotou mimo zařízení, protože by mohlo dojít ke kondenzaci na štítcích s čárovým kódem. Neotírejte kondenzát v případě, že se objeví na štítcích s čárovým kódem.

B1. Vložte **HBV2 CS1** do stojanu na činidla. Vložte **HBV2 CS2**, **HBV2 CS3** a **HBV2 CS4** do samostatného stojanu na činidla.

B2. Zaveďte stojan na činidla obsahující **HBV2 CS1** do pozice stojanu **A** zařízení COBAS® AmpliPrep.

B3. Zaveďte stojan na činidla obsahující **HBV2 CS2**, **HBV2 CS3** a **HBV2 CS4** do pozice stojanu **B**, **C**, **D** nebo **E** zařízení COBAS® AmpliPrep. (Další informace viz tabulka 1.)

Část C. Plnění spotřebním materiálem

Pozn.: Stanovte počet kazet na činidla pro zařízení COBAS® AmpliPrep, jednotek pro zpracování vzorků (SPU), vstupních zkumavek na vzorky (S-zkumavky), K-špiček a K-zkumavek, které budou potřeba. Jedna SPU, jedna vstupní S-zkumavka, jedna K-špička a jedna K-zkumavka jsou potřeba pro každý vzorek a kontrolu.

Pro použití zařízení COBAS® AmpliPrep s analyzátorem COBAS® TaqMan® nebo COBAS® TaqMan® 48 je možné provést více nastavení pracovních postupů. Bližší informace *viz* tabulka 1 uvedená níže. Podle použitého postupu práce, zaveďte příslušný počet stojanů s kazetami na činidla, stojanů se vzorky se vstupními S-zkumavkami, stojanů SPU, stojanů s K-hroty, stojanů s K-zkumavkami a K-nosiči na stojanech pro K-nosiče do příslušných pozic stojanů zařízení COBAS® AmpliPrep (další informace *viz* tabulka 1).

C1. Umístěte SPU do stojanu(ů) SPU a zaveďte stojan(y) do pozice stojanu **J**, **K** nebo **L** zařízení COBAS® AmpliPrep.

C2. Podle použitého postupu práce zaveďte plný(é) stojan(y) K-zkumavek do polohy stojanu **M**, **N**, **O** nebo **P** zařízení COBAS® AmpliPrep.

C3. Zaveďte plný(é) stojan(y) s K-hroty do polohy stojanu **M**, **N**, **O** nebo **P** zařízení COBAS® AmpliPrep.

C4. Při postupu práce 3 s využitím analyzátoru COBAS® TaqMan® 48 zaveďte K-nosiče na stojanech K-nosičů do polohy stojanu **M** & **N** nebo **O** & **P** zařízení COBAS® AmpliPrep.

Tabulka 1
Možné postupy práce pro použití se zařízením COBAS® AmpliPrep s analyzátorem COBAS® TaqMan® nebo analyzátorem COBAS® TaqMan® 48

Pracovní postup		Režim přenosu do analyzátoru COBAS® TaqMan® nebo analyzátoru COBAS® TaqMan® 48	Stojany, nosiče a spotřební materiál	Poloha na zařízení COBAS® AmpliPrep
1	Zařízení COBAS® AmpliPrep plus dokovací stanice plus analyzátor COBAS® TaqMan®	Automatický přesun K-nosiče	K-zkumavky v plných stojanech K-zkumavek	M – P
			K-špičky v plných stojanech na K-špičky	M – P
			Vstupní S-zkumavky obsahující vzorky a kontroly na stojanech na vzorky	F – H
			SPU ve stojanech na SPU	J – L
			CS1 ve stojanu na kazety	A
			CS2, CS3, CS4 ve stojanu na kazety	B – E
2	Zařízení COBAS® AmpliPrep plus analyzátor COBAS® TaqMan®	Manuální přesun K-zkumavek na stojanu(ech) na vzorky do analyzátoru COBAS® TaqMan®	K-zkumavky v plných stojanech K-zkumavek	M – P
			K-špičky v plných stojanech na K-špičky	M – P
			Vstupní S-zkumavky obsahující vzorky a kontroly na stojanech na vzorky	F – H
			SPU ve stojanech na SPU	J – L
			CS1 ve stojanu na kazety	A
			CS2, CS3, CS4 ve stojanu na kazety	B – E
			Po dokončení zpracování vzorku: K-zkumavky ve stojanech na vzorky (připravené k manuálnímu přesunu)	Stejné jako výše (F – H)
3	Zařízení COBAS® AmpliPrep plus analyzátor(y) COBAS® TaqMan® 48	Manuální přesun K-nosiče na stojanu(ech) pro K-nosiče do analyzátoru COBAS® TaqMan® 48	K-zkumavky na stojanech na vzorky	F - H
			K-špičky v plných stojanech na K-špičky	M - P
			Vstupní S-zkumavky obsahující vzorky a kontroly na stojanech na vzorky	F - H
			SPU ve stojanech na SPU	J - L
			CS1 ve stojanu na kazety	A
			CS2, CS3, CS4 ve stojanu na kazety	B - E
			Prázdný K-nosič označený čárovým kódem ve stojanu pro K-nosič	M - P
			Po dokončení zpracování vzorku: K-zkumavky v K-nosiči ve stojanu pro K-nosič	Stejné jako výše (M – P)

Část D. Objednávání a vkládání vzorků

D1. Připravte stojany na vzorky dle následujícího postupu: Připevněte klipy s čárovým kódem ke každé pozici stojanu na vzorky, kam je ukládán vzorek (S-zkumavka). Připevněte jeden ze specifických klipů s čárovým kódem pro kontroly [**CTM (–) C**, **HBV L(+)C, v2.0** a **HBV H(+)C, v2.0**] ke každé pozici stojanu na vzorky, do které budou kontroly (S-zkumavky) uloženy. Kontrola **CTM (–) C** musí být umístěna do pozice na stojanu na vzorky za poslední klinický vzorek nebo pozitivní kontrolu [**HBV L(+)C, v2.0** nebo **HBV H(+)C, v2.0**] v každé dávce s 12 až 24 testy. Klipy s čárovým kódem by měly mít stejné číslo dávky kontroly, jako je číslo dávky na kontrolních lahvičkách v soupravě. Dbejte na to, abyste přiřadili správnou kontrolu k pozici s odpovídajícím kontrolním klipem s čárovým kódem. Vložte jednu vstupní S-zkumavku do každé pozice obsahující klip s čárovým kódem.

D2. Pomocí softwaru AMPLILINK vytvořte objednávky pro každý vzorek a kontrolu v okně **Orders** ve složce **Sample**. Zvolte příslušný testový soubor a dokončete uložením.

D3. Přiřaďte objednávky pro vzorek a kontrolu k pozici stojanu na vzorky v okně **Orders** ve složce **Sample Rack**. Číslo stojanu na vzorky musí být pro stojan připravený v kroku D1.

D4. Vytiskněte zprávu **Sample Rack Order** pro použití jako pracovní tabulku.

D5. Připravte stojany na vzorek a kontrolu na určeném místě pro přidávání vzorků a kontrol dle následujícího postupu: Vířením promíchejte každý vzorek a kontrolu [**CTM (–) C**, **HBV L(+)C, v2.0** a **HBV H(+)C, v2.0**] po dobu 3 až 5 sekund. Při manipulaci se vzorky a kontrolami zabraňte kontaminaci rukavic.

D6. Přeneste 650 µl každého vzorku a kontroly [**CTM (–) C**, **HBV L(+)C, v2.0** a **HBV H(+)C, v2.0**] do odpovídající vstupní S-zkumavky s čárovým kódem pomocí mikropipetoru s aerosolovou bariérou nebo špičkou bez DNázy s pozitivním posuvem. ***Zabraňte přenosu částiček a/nebo fibrinových sraženin z originálního vzorku do vstupní S-zkumavky***. Vzorky a kontroly musí být přenášeny do pozic na zkumavky, jak bylo určeno a zaznamenáno v pracovní tabulce v kroku D4. Klipy s čárovým kódem pro kontroly musí mít stejné číslo dávky kontroly, jako je číslo dávky na kontrolních lahvičkách v soupravě. Přiřaďte správnou kontrolu k pozici s odpovídajícím klipem s čárovým kódem kontroly. ***Zabraňte kontaminaci horní části S-zkumavky vzorkem nebo kontrolami.***

D7. Jestliže používáte zařízení **cobas p** 630 pro přípravu vzorků, přečtěte si příručku obsluhy pro zařízení **cobas p** 630.

D8. Pro pracovní postupy 1 a 2 zaveďte stojan(y) na vzorky naplněné vstupními S-zkumavkami do pozic **F**, **G** nebo **H** v zařízení COBAS® AmpliPrep.

D9. Pro pracovní postup 3 pomocí analyzátoru COBAS® TaqMan® 48 zaveďte stojan(y) na vzorky se vstupními S-zkumavkami a K-zkumavkami (jedna pro každou vstupní S-zkumavku, zavedené v pozici vpravo vedle vstupních S-zkumavek) do pozice stojanu **F**, **G** nebo **H** zařízení COBAS® AmpliPrep.

Část E. Spusťte cyklus zařízení COBAS® AmpliPrep

E1. Spusťte zařízení COBAS® AmpliPrep pomocí softwaru AMPLILINK.

Část F. Konec cyklu zařízení COBAS® AmpliPrep a přesun do analyzátoru COBAS® TaqMan® nebo analyzátoru COBAS® TaqMan® 48 (pouze pro pracovní postup 2 a 3)

F1. Zkontrolujte příznaky a chybová hlášení.

F2. Vyjměte zpracované vzorky a kontroly ze zařízení COBAS® AmpliPrep na stojanech na vzorky (pro analyzátor COBAS® TaqMan® bez dokovací stanice) nebo na stojanech pro K-nosiče (pro analyzátor COBAS® TaqMan® 48), v závislosti na postupu práce (další podrobnosti viz Část G).

F3. Odstraňte odpad ze zařízení COBAS® AmpliPrep.

Pozn.: Zpracované vzorky a kontroly nesmí být po dokončení přípravy vzorku a kontroly vystaveny světlu.

Amplifikace a detekce

Nastavení analyzátoru COBAS® TaqMan® nebo analyzátoru COBAS® TaqMan® 48

Cyklus analyzátoru COBAS® TaqMan® nebo COBAS® TaqMan® 48 musí být započat do 120 minut po dokončení přípravy vzorku a kontroly.

Pozn.: Nezmrazujte ani neskladujte zpracované vzorky a kontroly.

Část G. Plnění zpracovaných vzorků

G1. V závislosti na zvoleném pracovním postupu proveďte odpovídající kroky pro přemístění K-zkumavek do analyzátoru COBAS® TaqMan® nebo COBAS® TaqMan® 48:

Pracovní postup 1:	Automatizovaný přesun K-nosiče přes dokovací stanici do analyzátoru COBAS® TaqMan®. Manuální zásah není nutný.
Pracovní postup 2:	Manuální přesun K-zkumavek ve stojanu(ech) na vzorky do analyzátoru COBAS® TaqMan®.
Pracovní postup 3:	Manuální přesun K-nosiče na K-stojanu(ech) K-nosiče do analyzátoru COBAS® TaqMan® 48. Manuální přesun K-nosičů do analyzátoru COBAS® TaqMan® 48 za použití přemísťovače K-nosiče.

Část H. Spuštění cyklu analyzátoru COBAS® TaqMan® nebo analyzátoru COBAS® TaqMan® 48

H1. Spusťte analyzátor COBAS® TaqMan® nebo COBAS® TaqMan® 48 jednou z možností uvedených níže v závislosti na použitém pracovním postupu:

Pracovní postup 1:	Není nutný žádný zásah.
Pracovní postup 2:	Automatické spuštění analyzátoru COBAS® TaqMan® po vložení stojanu(ů) na vzorky.
Pracovní postup 3:	Naplňte K-nosič prázdnými K-zkumavkami v případě, že je méně než 6 K-zkumavek v K-nosiči. Plnění je řízeno pomocí softwaru AMPLILINK. Otevřete kryt termocykleru, zaveďte K-nosič a uzavřete víko. Spusťte cyklus analyzátoru COBAS® TaqMan® 48.

Část I. Ukončení cyklu analyzátoru COBAS® TaqMan® nebo analyzátoru COBAS® TaqMan® 48

I1. Po dokončení cyklu analyzátoru COBAS® TaqMan® nebo COBAS® TaqMan® 48 vytiskněte výsledkový protokol. Zkontrolujte příznaky a chybová hlášení ve výsledkovém protokolu. Vzorky s příznaky a komentáři jsou interpretovány podle popisu v části „Výsledky“. Po odsouhlasení uložte data do archívu.

I2. Vyjměte použité K-zkumavky z COBAS® TaqMan® nebo z analyzátoru COBAS® TaqMan® 48.

VÝSLEDKY

Analyzátor COBAS® TaqMan® nebo analyzátor COBAS® TaqMan® 48 automaticky stanovuje koncentrace HBV DNA pro vzorky a kontroly. **Koncentrace HBV DNA je vyjádřena v mezinárodních jednotkách (IU)/ml. Konverzní faktor mezi kopiemi HBV/ml a HBV IU/ml je 5,82 kopií/IU za použití mezinárodního standardu WHO pro DNA virové hepatitidy B pro testování technologie analýzy nukleových kyselin (NIBSC 97/746)[29].**

V případě potřeby je možné provést manuální konverzi výsledků na kopie/ml použitím následujícího konverzního výpočtu:

Koncentrace HBV DNA v IU/ml x 5,82 kopií/IU = HBV DNA v kopiích/ml
Příklad: 1,23E+04 IU/ml x 5,82 kopií/IU = 7,16E+04 kopií/ml

Pozn.: Rozsah analytického měření hodnot analytu, které mohou být přímo změřeny u vzorku bez jakéhokoliv ředění s použitím testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV, v2.0 je 20 až 1,7E+08 IU/ml.

Pozn.: Rozsah klinických zaznamenatelných hodnot analytu, které mohou být přímo změřeny u vzorku s maximálním ředěním jedna ku deseti s použitím testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV, v2.0 je 20 až 1,7E+09 IU/ml.

Software AMPLILINK:

- Stanovuje prahovou hodnotu cyklu (Ct) pro HBV DNA a HBV QS DNA.
- Stanovuje koncentraci HBV DNA založenou na Ct hodnotách pro HBV DNA a HBV QS DNA a kalibračních koeficientech specifických pro danou dávku, které jsou poskytnuty na čárových kódech kazet.
- Určuje, že vypočtená hodnota titru v IU/ml pro **HBV L(+)C, v2.0** a **HBV H(+)C, v2.0** spadá do vymezeného rozsahu.

Validace dávek – AMPLILINK, verze 3.2

Zkontrolujte výsledkové okno softwaru AMPLILINK nebo výsledkový výtisk na přítomnost příznaků a komentářů, abyste se ujistili, že je dávka platná. Pro kontrolní objednávky je provedena kontrola pro stanovení, zda-li je hodnota IU/ml pro kontrolu v rámci specifikovaného rozsahu. Je-li hodnota IU/ml pro kontrolu mimo její rozsah, objeví se PŘÍZNAK, který označuje, že kontrola selhala.

Dávka je platná v případě, že se neobjeví žádný příznak pro žádnou kontrolu [**HBV L(+)C, v2.0**; **HBV H(+)C, v2.0** a **CTM (–) C**].

Dávka není platná, pokud se u HBV kontrol objeví některý z následujících příznaků:

Negativní kontrola

Příznak	Výsledek	Interpretace
_N_NC_INVALID	Invalid	Neplatný výsledek nebo „platný“ výsledek, který nebyl negativní pro cílový HBV

HBV nízce pozitivní kontrola, v2.0

Příznak	Výsledek	Interpretace
_L_LPCINVALID	< 2.00E+01 IU/mL	Kontrola pod rozmezím testu
_L_LPCINVALID	Target Not Detected	Kontrola pod rozmezím testu
_L_LPCINVALID	Numerický titr X.XXE+XX IU/mL	Kontrola mimo rozsah testu
_L_LPCINVALID	> 1.70E+08 IU/mL	Kontrola nad rozmezím testu
_L_LPCINVALID	Invalid	Neplatný výsledek

HBV vysoce pozitivní kontrola, v2.0

Příznak	Výsledek	Interpretace
_H_HPCINVALID	< 2.00E+01 IU/mL	Kontrola pod rozmezím testu
_H_HPCINVALID	Target Not Detected	Kontrola pod rozmezím testu
_H_HPCINVALID	Numerický titr X.XXE+XX IU/mL	Kontrola mimo rozmezí testu
_H_HPCINVALID	> 1.70E+08 IU/mL	Kontrola nad rozmezím testu
_H_HPCINVALID	Invalid	Neplatný výsledek

Pokud je dávku neplatná, musíte zopakovat celou dávka, včetně přípravy vzorku a kontroly, amplifikace a detekce.

Validace dávek – AMPLILINK, verze 3.3

Zkontrolujte výsledkové okno softwaru AMPLILINK nebo výsledkový výtisk na přítomnost příznaků a komentářů, abyste se ujistili, že je dávka platná. Pro kontrolní objednávky je provedena kontrola, zda-li je hodnota IU/ml pro danou kontrolu v rámci specifikovaného rozmezí. Je-li hodnota IU/ml pro danou kontrolu mimo její rozsah, je vytvořen PŘÍZNAK, který ukazuje, že kontrola selhala.

Dávka je platná v případě, že se neobjeví žádný příznak pro žádnou kontrolu [**HBV L(+)C, v2.0; HBV H(+)C, v2.0** a **CTM (–) C**].

Dávka není platná, pokud se u HBV kontrol objeví některý z následujících příznaků.

Negativní kontrola:

P íznak	Výsledek	Interpretace
NC_INVALID	Invalid	Neplatný výsledek nebo „platný“ výsledek, který nebyl negativní pro cílový HBV

HBV Nízce pozitivní kontrola, v2.0:

Příznak	Výsledek	Interpretace
LPCINVALID	Invalid	Neplatný výsledek nebo kontrola mimo rozsah

HBV Vysoce pozitivní kontrola, v2.0:

Příznak	Výsledek	Interpretace
HPCINVALID	Invalid	Neplatný výsledek nebo kontrola mimo rozsah

Pokud je dávka neplatná, musíte zopakovat celou šarži, včetně přípravy vzorku a kontroly, amplifikace a detekce.

Interpretace výsledků

Pro platnou dávku zkontrolujte každý jednotlivý vzorek na přítomnost příznaků nebo komentářů ve výtisku výsledku. Výsledky se interpretují takto:

- Platná dávka může zahrnovat platné i neplatné výsledky vzorků v závislosti na tom, zda se u jednotlivých vzorků objeví příznaky a/nebo poznámky.

Výsledky vzorků se interpretují takto:

Výsledek titru	Interpretace
Target Not Detected	Výsledky uveďte jako „HBV DNA nedetekována“.
< 2.00E+01 IU/mL	Vypočtená hodnota IU/ml je pod detekční hranicí testu. Výsledky uvádějte jako „HBV DNA detekována, méně než 20 HBV DNA IU/ml“.
≥ 2.00E+01 IU/mL a ≤ 1.70E+08 IU/mL	Vypočítané výsledky větší než nebo rovny 20 IU/ml a menší než nebo rovny 1,70E+08 IU/ml jsou v lineárním rozmezí testu.
> 1.70E+08 IU/mL	Vypočtená hodnota IU/ml leží nad rozmezím testu. Výsledky uvádějte jako „vyšší než 1,70E+08 HBV DNA IU/ml“. Jsou-li žádané kvantitativní výsledky, měl by být originální vzorek rozředěn HBV-negativním lidským sérem nebo EDTA plazmou v závislosti na základní látce původního vzorku a test by měl být zopakován. Vynásobte uvedený výsledek faktorem ředění.

Pozn.: Vzorky nad rozsahem testu, které vykazují neplatný výsledek s příznakem „QS_INVALID“, nesmí být vykázány jako > 1,70E+08 IU/ml. Originální vzorek je nutné rozředit lidskou EDTA plazmou negativní na HBV a test by měl být zopakován. Vynásobte uvedený výsledek faktorem ředění.

Pozn.: Výsledek „Failed“. Interpretace: Během přípravy vzorků na zařízení COBAS® AmpliPrep nebyl vzorek správně zpracován.

Pozn.: Výsledek titru „Invalid“. Interpretace: Neplatný výsledek.

KONTROLA KVALITY

Jedna negativní kontrola COBAS® TaqMan®, jedna HBV nízce pozitivní kontrola, v2.0 a HBV vysoce pozitivní kontrola, v2.0, musí být zahrnuta do každé testové dávky. Dávka je platná v případě, že se neobjeví žádný příznak pro žádnou kontrolu [**HBV L(+)C, v2.0; HBV H(+)C, v2.0** a **CTM (–) C**].

Neexistují žádné požadavky týkající se pozice pozitivních kontrol [**HBV L(+)C, v2.0 a HBV H(+)C, v2.0**] na stojanu na vzorky. Nicméně kontrola **CTM (–) C** musí být umístěna do pozice na stojanu na vzorky za poslední klinický vzorek nebo pozitivní kontrolu [**HBV L(+)C, v2.0** nebo **HBV H(+)C, v2.0**] v každé dávce s 12 až 24 testy.

Na výtisku výsledků zkontrolujte výskyt příznaků a poznámek pro ověření, zda je šarže platná.

Negativní kontrola

CTM (–) C musí dát výsledek cíl nebyl detekován – „Target Not Detected". Je-li **CTM (–) C** označeno jako neplatné (invalid), pak je celá dávka neplatná. Celý postup zopakujte (příprava vzorků a kontrol, amplifikace a detekce). Je-li **CTM (–) C** trvale neplatná ve více dávkách, kontaktujte vašeho místního zástupce společnosti Roche pro technickou pomoc.

Pozitivní kontroly

Pevná rozmezí titrů pro **HBV L(+)C, v2.0** a **HBV H(+)C, v2.0** jsou uvedena na čárových kódech kazety s činidly pro test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV, v2.0.

HBV DNA IU/ml pro **HBV L(+)C, v2.0** a **HBV H(+)C, v2.0** musí spadat do svých pevně stanovených rozmezí titrů. Jsou-li jedna nebo obě pozitivní kontroly označeny příznakem jako neplatné, je neplatná celá dávka. Celý postup zopakujte (příprava vzorků a kontrol, amplifikace a detekce). Jestliže leží titr HBV DNA u jedné nebo obou pozitivních kontrol soustavně mimo přiřazené rozmezí u více dávek, obraťte se pro technickou pomoc na místní zastoupení firmy Roche.

BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ PŘI PRÁCI

Jak je tomu při každém testovacím postupu, je pro správné fungování tohoto testu zásadním požadavkem dodržovat principy správné laboratorní praxe.

PROCEDURÁLNÍ OMEZENÍ

1. Tento test byl validován pro používání pouze s lidským sérem nebo plazmou odebranou do EDTA jako antikoagulantu. Testování jiných typů vzorků může vést k nepřesným výsledkům.

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

3. Díky přítomnosti enzymu AmpErase v Master Mixu pro COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV, v2.0 se snižuje riziko kontaminace amplikonu. Kontaminaci od HBV pozitivních kontrol a klinických vzorků lze ovšem zabránit pouze důsledným uplatňováním zásad správné laboratorní praxe a pečlivým dodržováním postupů uvedených v tomto příbalovém letáku.

4. S tímto výrobkem mohou pracovat pouze pracovníci proškolení v technice PCR.

5. Tento produkt může být použit pouze spolu s zařízením COBAS® AmpliPrep a analyzátorem COBAS® TaqMan® nebo COBAS® TaqMan® 48.

6. I když vzácně, mutace ve vysoce konzervovaných oblastech virového genomu pokryté primery testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV, v2.0 a/nebo sondami mohou vést k podhodnocení množství nebo selhání detekce viru.

7. Detekce HBV DNA závisí na tom, kolik virových částic je ve vzorku přítomno, na což mají vliv metody odběru vzorku a stav pacienta (např. věk, přítomnost symptomů a/nebo stádium infekce).

8. Vzhledem k rozdílům mezi technologiemi se doporučuje, aby uživatelé před přechodem k jiné technologii provedli ve své laboratoři korelační metodické studie a kvantifikovali rozdíly mezi technologiemi.

INTERFERUJCÍ LÁTKY

Je prokázáno, že zvýšené hladiny triglyceridů, bilirubinu a albuminu ve vzorcích neinterferují s kvantifikací HBV DNA tímto testem. Je prokázáno, že zvýšené hladiny hemoglobinu ve vzorcích do koncentrace 250 mg/dl neinterferují s kvantifikací HBV DNA tímto testem.

Následující složky léčiv testované třikrát při maximální plazmatické hladině (C_{max}) nevykázaly interferenci s kvantifikací HBV DNA testem COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV, v2.0:

Nukleotidové inhibitory DNA polymerázy Tenofovir Adefovir dipivoxil Telbivudin	**Nukleozidové inhibitory reverzní transkriptázy a DNA polymerázy** Lamivudin Zidovudin Stavudin Abacavir Didanosin Entekavir
Inhibitory HIV proteázy Indinavir Saquinavir Ritonavir Amprenavir Lopinavir/Ritonavir	**Nenukleozidové inhibitory HIV reverzní transkriptázy** Nevirapin Efavirenz **Inhibitory HIV fúze** Enfuvirtid
Imunomodulátory Interferon alfa-2a Ribavirin Interferon alfa-2b Peginterferon alfa-2a Peginterferon alfa-2a + Ribavirin Interferon alfa-2b + Ribavirin Peginterferon alfa-2b	**Antidepresiva** Paroxetin HCl Fluoxetin Sertralin **Látky pro léčbu herpetických virů** Gancyklovir Valganciclovir HCl Acyklovir

VYHODNOCENÍ LABORATORNÍCH VÝSLEDKŮ

A. Detekční mez s použitím mezinárodního standardu WHO

Detekční mez testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV, v2.0 byla stanovena pro HBV DNA při různých ředěních s použitím mezinárodního standardu WHO pro DNA virové hepatitidy B při testování technologie analýzy nukleových kyselin (NAT) (NIBSC 97/746)[29], genotyp A v HBV-negativní lidské EDTA plazmě nebo séru. Pro každou základní složku byly analyzovány tři série ředění. Celkem bylo pro každý typ základní složky analyzováno 72 replikátů na koncentraci.

Koncentrace HBV DNA, kterou lze detekovat s mírou pozitivity větší než 95%, jak je určeno analýzou PROBIT, je 9 IU/ml (viz tabulka 2) pro EDTA plazmu a 19 IU/ml pro sérum (viz tabulka 3).

Tabulka 2
Detekční mez testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV, v2.0 v EDTA plazmě s použitím mezinárodního standardu WHO

Nominální vstup (HBV DNA IU/ml)	Počet replikátů	Počet pozitivních	Míra pozitivity
30	72	72	100%
20	71	71	100%
10	72	68	94%
5	72	63	88%
2,5	72	38	53%
PROBIT 95% úspěšnost detekce	**9 IU/ml** (95% interval spolehlivosti: 6,8 – 12,1 IU/ml)		

Tabulka 3
Detekční mez testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV, v2.0 v séru s použitím mezinárodního standardu WHO

Nominální vstup (HBV DNA IU/ml)	Počet replikátů	Počet pozitivních	Míra pozitivity
30	72	72	100%
20	72	70	97%
10	72	58	81%
5	72	29	40%
2,5	72	24	33%
PROBIT 95% úspěšnost detekce	**19 IU/ml** (95% interval spolehlivosti: 11,0 – 107,1 IU/ml)		

B. Detekční mez s použitím klinických vzorků napříč všemi genotypy

Kromě toho byly analyzovány ředění klinických vzorků v HBV-negativní lidské EDTA plazmě nebo séru představující genotypy A-F a H a dvě kvantifikované purifikované plazmidové DNA, jedna pro genotyp G a jedna pro mutace pre-core oblasti se dvěma sadami šarží činidel testů COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV, v2.0. Bylo testováno dvacet čtyři replikátů v jedné úrovni ředění, genotypu, základní látky a šarže soupravy.

Koncentrace HBV DNA, která je detekovatelná s mírou detekce vyšší než 95 %, jak je určeno analýzou PROBIT, je 16,4 IU/ml kombinovaná pro obě matrice (viz Tabulka 4).

Tabulka 4
Detekční mez testu
COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV, v2.0 v EDTA plazmě a séru s použitím
Genotypu A-H a mutace pre-core oblasti

Genotyp	Matrice	95% míra detekce PROBIT koncentrace šarže 1	95% míra detekce PROBIT koncentrace šarže 2	95% míra detekce PROBIT koncentrace šarže (max.)	95% PROBIT interval spolehlivosti
A	Plazma	10,6	<5*	10,6	4,6 – 37,7
	Sérum	10,4	5,5		
B	Plazma	5,6	5,3	16,4	12,0 – 28,6
	Sérum	5,8	16,4		
C	Plazma	5,8	5,8	14,8	10,4 – 28,7
	Sérum	14,8	10,9		
D	Plazma	5,9	10,4	10,4	7,0 – 24,1
	Sérum	5,6	9,8		
E	Plazma	13,1	6,1	15,7	10,7 – 33,4
	Sérum	6,3	15,7		
F	Plazma	4,9	5,8	6,0	**
	Sérum	6,0	5,9		
G	Plazma	12,3	5,9	12,3	8,6 – 24,3
	Sérum	5,8	11,6		
H	Plazma	9,8	5,5	11,6	6,9 – 30,3
	Sérum	11,6	11,2		
Mutace oblasti Pre-Core	Plazma	10,4	11,2	12,2	9,1 – 22,2
	Sérum	5,8	12,2		

* Žádná PROBIT analýza a 95% interval spolehlivosti nemohly být stanoveny vzhledem ke 100% míře detekce u všech úrovní koncentrací pro šarži 2

** Žádný 95% interval spolehlivosti nemohl být vypočítán analýzou PROBIT vzhledem ke 100% míře detekovatelnosti všech testovaných úrovní ředění

Poznámka: Zásobní koncentrace všech testovaných vzorků byla stanovena pomocí kalibračního potvrzení (ISO 11095:1996) s použitím testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV, v2.0.

Aby se zabránilo potenciálnímu ovlivnění, byly koncentrace klinických vzorků genotypů A-F a H verifikovány pomocí jednoho nebo více následujících testů: Abbott Real*Time* HBV, Siemens VERSANT HBV DNA 3.0 a test COBAS® TaqMan® HBV pro použití se systémem High Pure. Sledované titry ukázaly maximální odchylku v kvantifikaci ≤ 0,3 Log_{10}. Koncentrace pro dva plazmidy obsahující cílové oblasti genotypu G a mutace oblasti pre-core byly verifikovány pomocí metody PicoGreen® a přesnost přiřazeného titru byla prokázána v samostatné srovnávací studii.

C. Přesnost

Přesnost testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV, v2.0 byla stanovena analýzou série ředění klinických HBV vzorků (genotyp A) v HBV-negativní lidské EDTA plazmě a séru. Přiřazení titru klinických vzorků (zásobní koncentrace) bylo provedeno metodou, která zajišťuje sledování standardu HBV WHO pro DNA viru hepatitidy B pro testování technologie analýzy nukleových kyselin (NIBSC 97/746)[29]. Bylo provedeno 15 cyklů na základní látku, každý se skládal ze 6 úrovní ředění a 3 replikátů na každou úroveň. Každý vzorek prošel celou procedurou testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV, v2.0 zahrnující přípravu vzorku, amplifikaci a detekci. Zde uváděná přesnost tedy zahrnuje všechny aspekty testovacího postupu. Studie byla provedena s použitím tří šarží činidel testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV, v2.0. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 5 (EDTA plazma) a tabulce 6 (sérum).

Tabulka 5
Přesnost testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV, v2.0 (vzorky EDTA plazmy)

Titr (IU/ml)	Šarže 1		Šarže 2		Šarže 3	
	Celkový variační koeficient (%)	Celková SD v log	Celkový variační koeficient (%)	Celková SD v log	Celkový variační koeficient (%)	Celková SD v log
1,00E+02	26	0,12	28	0,13	25	0,11
1,00E+03	17	0,07	17	0,07	20	0,09
1,00E+04	12	0,05	11	0,05	14	0,06
1,00E+05	8	0,04	8	0,04	13	0,06
1,00E+06	11	0,05	11	0,05	12	0,05
1,00E+07	14	0,06	12	0,06	18	0,08

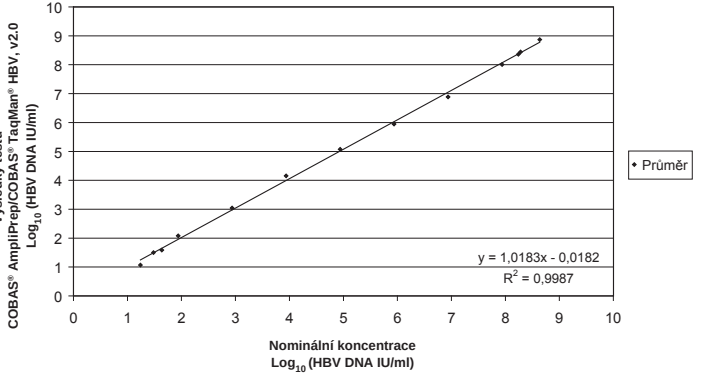
Tabulka 6
Přesnost testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV, v2.0 (vzorky séra)

Titr (IU/ml)	Šarže 1		Šarže 2		Šarže 3	
	Celkový variační koeficient (%)	Celková SD v log	Celkový variační koeficient (%)	Celková SD v log	Celkový variační koeficient (%)	Celková SD v log
1,00E+02	27	0,13	22	0,11	28	0,13
1,00E+03	13	0,06	15	0,06	17	0,08
1,00E+04	11	0,05	10	0,04	14	0,06
1,00E+05	10	0,04	12	0,05	11	0,05
1,00E+06	11	0,05	12	0,05	11	0,05
1,00E+07	15	0,07	15	0,07	13	0,06

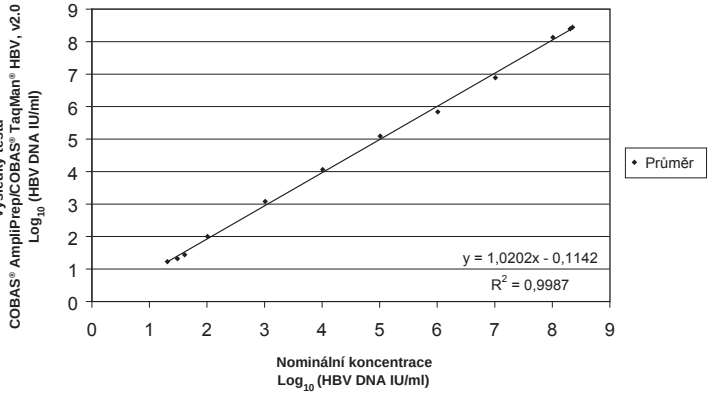
D. Lineární rozmezí

Jak je ukázáno na obrázku 10 a 11, test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV, v2.0 poskytoval lineární odezvu od 20 (Log_{10} = 1,30) HBV DNA IU/ml až 1.7E+08 (Log_{10} = 8,24) HBV DNA IU/ml pro EDTA plazmu i sérum. Vyhodnocení bylo provedeno podle směrnice CLSI EP6-A s použitím dvou šarží činidel testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV, v2.0 a sériových ředění o vysokém titru HBV DNA (+) vzorků EDTA plazmy nebo séra. Bylo testováno třináct koncentrací EDTA plazmy a dvanáct úrovní koncentrací séra, s 10 replikáty na každou úroveň.

Obrázek 10
Linearita pro vzorky EDTA plazmy testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV, v2.0



Obrázek 11
Linearita pro vzorky séra testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV, v2.0



E. Kvantifikace titru genotypu

Do dnešní doby bylo pro HBV navrženo osm kategorií genotypu na základě divergence nukleotidů v rámci genomu větší než 8%[38,39,40]. Tyto genotypy jsou označeny velkými písmeny abecedy od A do H. Genotypy HBV mají charakteristické geografické rozšíření [41].

Účinnost testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV, v2.0 u genotypů HBV byla hodnocena analýzou 25 purifikovaných, linearizovaných a kvantifikovaných plazmidových DNA obsahujících reprezentativní sekvence z HBV genotypů A až H a nejběžnější mutace pre-core oblasti (viz tabulka 7). Přiřazení nominálních koncentrací zásobních plazmidových roztoků bylo provedeno metodou PicoGreen. Každá plazmidová DNA byla rozředěna do nominální koncentrace přibližně 3,00E+03, 3,00E+05 a 3,00E+07 PicoGreen kopií/ml v EDTA plazmě i séru. Koncentrace (IU/ml) byly poté analyzovány testem COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV, v2.0 pomocí dvou šarží činidel a výsledky všech testovaných plazmidů byly porovnány.

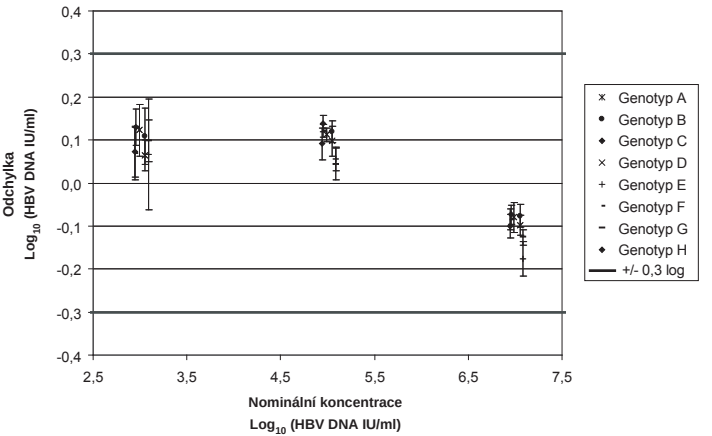
Hodnocení všech 25 plazmidů analyzovaných testem COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV, v2.0 prokazuje ekvivalentní kvantifikaci všech plazmidů a genotypů pro EDTA plazmu a sérum.

Tabulka 7
Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV, v2.0
Testování inkluzivity – Testovány typizované plazmidové DNA

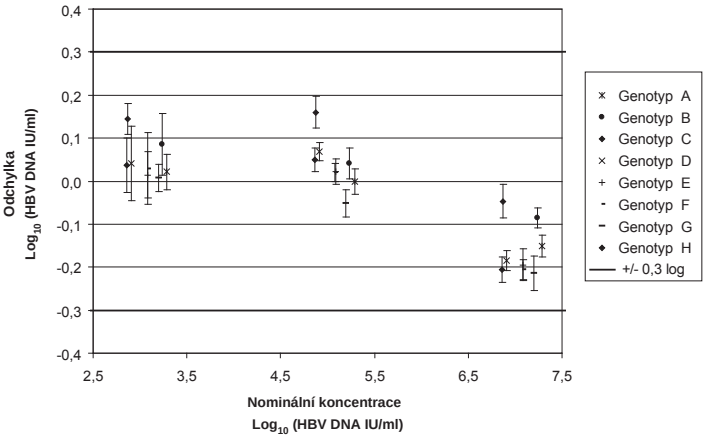
Označení plazmidu	Genotyp	Původ mateřského vzorku
p8423-c1	A	Indie
p1115-c1		Burundi
p3952-c1		Kamerun
p4199-c2		Norsko
p1764-c1	B	Čína
p1767-c1		Čína
p3958-c1		Východní Asie
p830-c1		Společenské ostrovy
p3982-c1		Vietnam
p1786-c1	C	Čína
p11549-1		Bangladéš
p3872-c1	D	Irán
p1103-c1		Tunis
p3953-c2		Severní Afrika
p18-c1		Švédsko
p30893-5		Švédsko
p4244-c1		Dánsko
p3217-c1	E	Senegal
p3963-c2		Nigérie
p9203-c1	F	Kolumbie
p479-c1		Venezuela
p1009-c1		Španělsko
p00042975-4	G	Spojené státy americké
pEFHBV20	H	Nikaragua
pITmut1896	Mutace Pre-Core	Itálie

Kromě toho, pro osm těchto plazmidů, zastupujících všechny genotypy, byla prokázána inkluzivita v lineárním rozmezí (obrázek 12 a 13). Pro každý plazmid byly testovány tři úrovně koncentrace EDTA plazmy a séra, s 10 replikáty na každou úroveň.

Obrázek 12
Účinnost testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV, v2.0 u HBV genotypů A v EDTA plazmě



Obrázek 13
Účinnost testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV, v2.0 u HBV genotypů A v séru



F. Klinická specificita

Specificita testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV, v2.0 byla stanovena analýzou HBV-negativní EDTA plazmy a séra od dárců krve. Celkově bylo testováno 647 jednotlivých vzorků EDTA plazmy a 649 vzorků séra. Všechny vzorky byly negativní na HBV DNA. Na základě těchto výsledků byla specificita testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV, v2.0 100% s mezí spolehlivosti 99,54%.

G. Křížová reaktivita

Analytická specificita testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV, v2.0 byla hodnocena přidáním kultivačních organismů (viry, baktérie, kvasinky) nebo DNA (HTLV-2, 2,5E+07 kop./PCR) do HBV negativní lidské EDTA plazmy (viz tabulka 8).

Žádný z testovaných HBV negativních organismů nebyl pozitivní na HBV DNA.

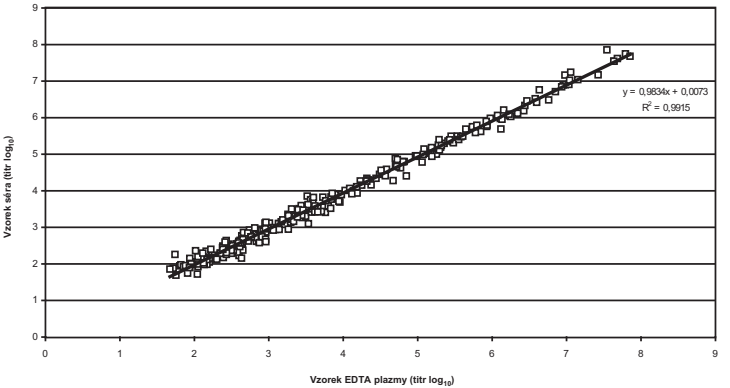
Tabulka 8
Analytická specificita vzorků

Virus	**Baktérie**
Adenovirus typ 5	*Staphylococcus aureus*
Cytomegalovirus	*Propionibacterium acnes*
Virus Epsteinův-Barrové	
Lidský herpes virus typ 6	
Herpes simplex virus typ 1	
Herpes simplex virus typ 2	**Kvasinky**
Lidský T-buněčný lymfotropní virus typ 1	*Candida albicans*
Lidský T-buněčný lymfotropní virus typ 2	
Chřipka typu A	
Virus hepatitidy A	
Virus hepatitidy C	
HIV-1	

H. Korelace EDTA plazmy a séra

Korelace testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV, v2.0 byla testována analýzou HBV-pozitivních klinických vzorků EDTA plazmy a séra. Bylo analyzováno 279 odpovídajících sad vzorků od HBV infikovaných pacientů. Výsledky testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV, v2.0 ukázaly vysokou korelaci mezi vzorky EDTA plazmy a séra (obrázek 14).

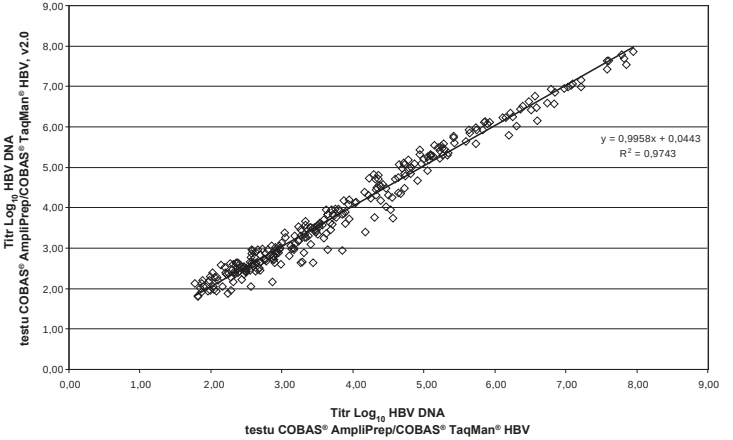
Obrázek 14
Korelace testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV, v2.0
u vzorků EDTA plazmy a séra od HBV infikovaných pacientů (n=279)



I. Účinnost testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV, v2.0 v porovnání s testem COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV

Účinnost testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV, v2.0 byla porovnána s testem COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV[30] analýzou HBV pozitivních (≥ 54 IU/ml) klinických vzorků. Zbylé vzorky EDTA plazmy z rutinní diagnózy byly analyzovány ve dvou externích laboratořích. Titry vzorků byly rozloženy po dynamickém rozmezí testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV, v2.0. Lineární regresní analýza byla provedena u 275 platných vzorků (143 testovaných v jedné laboratoři a 132 ve druhé) (obrázek 15).

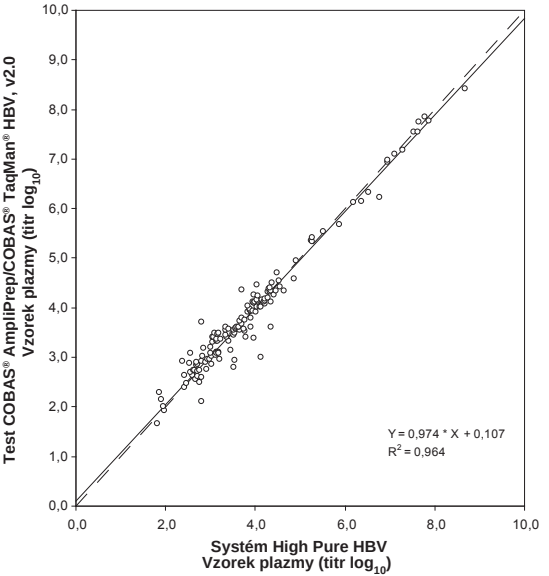
Obrázek 15
Korelace testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV, v2.0 a testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV u vzorků EDTA plazmy od HBV infikovaných pacientů (n=275)



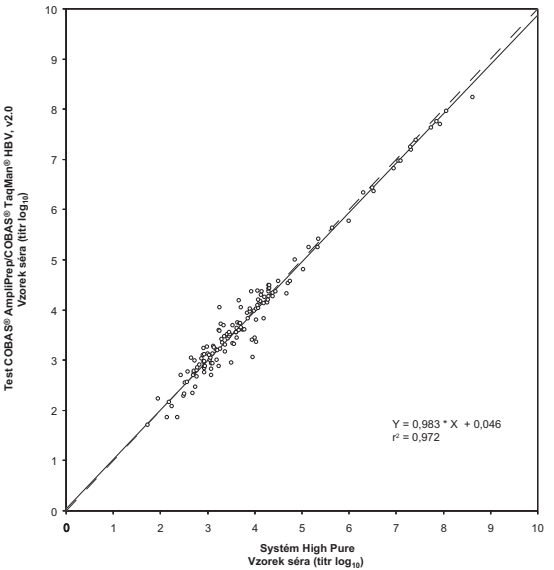
J. Metoda korelace

Účinnost testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV, v2.0 byla porovnána s testem COBAS® TaqMan® HBV pro použití se systémem High Pure (HPS HBV, obrázky 16 a 17), testem COBAS® AMPLICOR® HBV MONITOR (COBAS® AMPLICOR® HBV, obrázky 18 a 19) a testem VERSANT HBV DNA 3.0 (obrázky 20 a 21) regresní analýzou neředěných klinicky charakterizovaných vzorků od HBV infikovaných pacientů. Vzorky byly získány z Teragenix (Fort Lauderdale, FL, USA). Regresní analýza byla provedena pro vzorky séra a EDTA plazmy, které vykázaly výsledky v lineárním rozmezí.

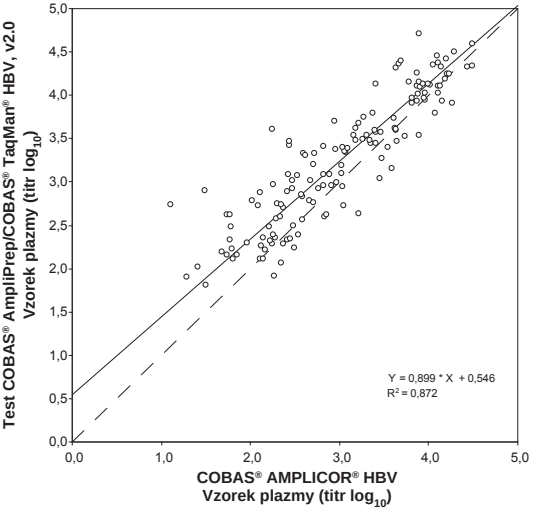
Obrázek 16
Korelace testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV, v2.0 a testu COBAS® TaqMan® HBV pro použití se systémem High Pure u vzorků EDTA plazmy od HBV infikovaných pacientů (n=146)



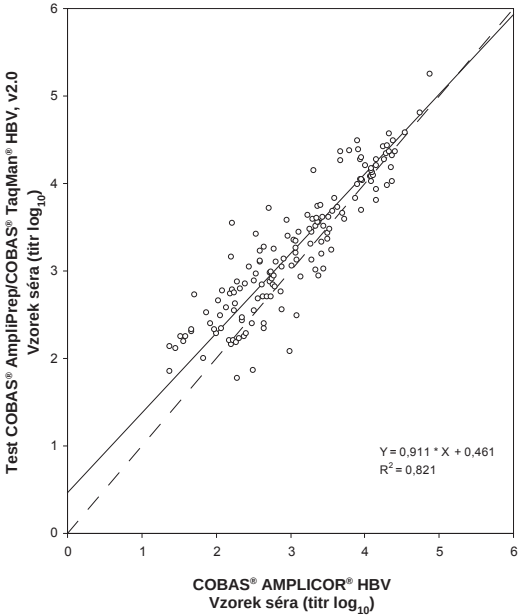
Obrázek 17
Korelace testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV, v2.0 a testu COBAS® TaqMan® HBV pro použití se systémem High Pure u vzorků séra od HBV infikovaných pacientů (n=142)



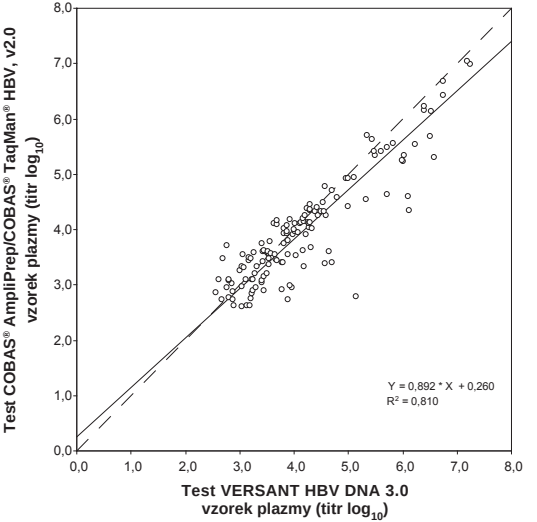
Obrázek 18
Korelace testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV, v2.0 a testu COBAS® AMPLICOR® HBV MONITOR u vzorků EDTA plazmy od HBV infikovaných pacientů (n=143)



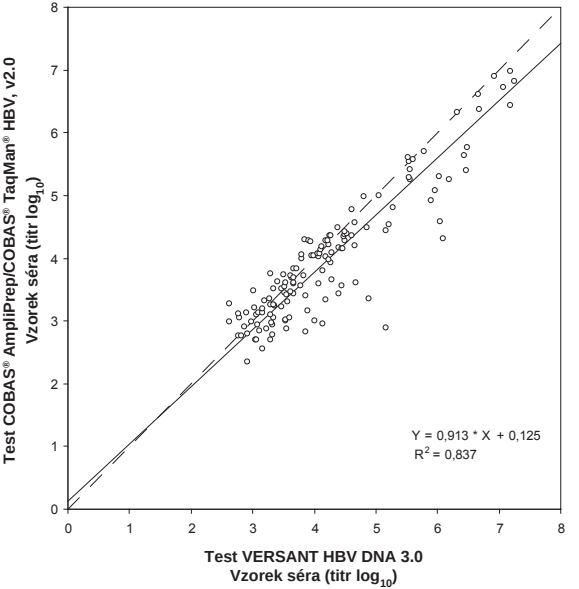
Obrázek 19
Korelace testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV, v2.0 a testu COBAS® AMPLICOR® HBV MONITOR u vzorků séra od HBV infikovaných pacientů (n=154)



Obrázek 20
Korelace testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV, v2.0 a testu VERSANT HBV DNA 3.0 u vzorků EDTA plazmy od HBV infikovaných pacientů (n=138)



Obrázek 21
Korelace testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV, v2.0 a testu VERSANT HBV DNA 3.0 u vzorků séra od HBV infikovaných pacientů (n=138)



LITERATURA

1. Lee, W. 1997. Hepatitis B Virus Infection. New England Journal of Medicine. **337**:1733-1745.
2. http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/HepatitisB_whocdscsrlyo2002_2.pdf.
3. Beasley, R.P. 1988. Hepatitis B virus - the major etiology of hepatocellular carcinoma. Cancer. **61**:1942-1956.
4. Wong, D.H.K., Cheung, A.M., O'Rourke, 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.
5. Zuckerman, A.J. and Lavanchy, D. 1999. Treatment options for chronic hepatitis: antivirals look promising. British Medical Journal. **319**:799-800.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. Hoofnagle, J.H. 1990. Alfa-interferon therapy of chronic hepatitis B. Current status and recommendations. Hepatology. **11**:S100-S107.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. Saracco, G., Mazzella, G., Rosina, F. et al. 1989. A controlled trial of human lymphoblastoid interferon in chronic hepatitis B in Italy. Hepatology. **10**:336-341.
20. Perrillo, 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.
21. 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.
22. 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.

23. 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.

24. 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.

25. 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.

26. Puchhammer-Stockl, 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.

27. Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., and Griffith, R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. Bio/Technology **10**:413-417.

28. Heid, C.A., Stevens, J., Livak, J.K., and Williams, P.M. 1996. Real time quantitative PCR. Genome Research **6**:986-994.

29. Saldanha, J., Gerlich, W., Lelie, N., Dawson, P., Heermann, K., Heath, A., and the WHO Collaborative Study Group. 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.

30. Hochberger, S., Althof, D., Gallegos de Schrott, R., Nachbaur, N., Röck, H. and Leying, H. 2006. Fully automated quantitation of Hepatitis B virus (HBV) DNA in human plasma by the COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® System. Journal of Clinical Virology **35**:373-380.

31. Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C, Zoulim F, Fried M, Schinazi RF, Rossau R. 2000. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. Journal of General Virology **81**:67-74.

32. Smith, E.S., Li, A.K., Wang, A.M., Gelfand, D.H. and Myers, T.M. 2003. Amplification of RNA: Hightemperature Reverse Transcription and DNA Amplification with a Magnesium-activated Thermostable DNA Polymerase. PCR Primer, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press: Section 16.

33. Meng, Q., Wong, C., Rangachari, A. et al. 2001. Automated Multiplex Assay System for Simultaneous Detection of Hepatitis B Virus DNA, Hepatitis C Virus RNA, and Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA. Journal of Clinical Microbiology. **39**:2937-2945.

34. Longo, M.C., Berninger, M.S. and Hartley, J.L. 1990. Use of uracil DNA glycosylase to control carryover 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. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline-Third Edition. CLSI Document M29-A3 Wayne, PA:CLSI, 2005.

37. International Air Transport Association. Dangerous Goods Regulations, 41st Edition. 2000. 704 pp.

38. Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewignjo RI, Imai M, Miyakawa Y, Mayumi M. 1988. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. Journal of General Virology **69**:2575-2583.

39. Norder H, Courouce AM, Coursaget P, Echevarria JM, Leef S-D, Mushahwar IK, Robertson BH, Locarnini S, Magnius LO. 2004. Genetic Diversity of Hepatitis B Virus Strains Derived Worldwide: Genotypes, Subgenotypes, and HBsAG Subtypes. Intervirology **47**:289-309.

40. Schaefer S. 2007. Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. World J Gastroenterol **13(1)**:14-21.

41. Norder H, Hammas B, Lee SD, Bile K, Courouce AM, Mushahwar IK, Magnius LO. 1993. Genetic relatedness of hepatitis B viral strains of diverse geographical origin and natural variations in the primary structure of the surface antigen. Journal of General Virology **74**: 1341-1348.

Informace k revizi dokumentu	
Doc Rev 7.0 04/2011	Části **POTŘEBNÝ MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ DODÁVKY** a **NÁVOD K POUŽITÍ** byly aktualizovány, aby odpovídaly revizi názvu Uživatelské příručky k zařízení **cobas p** 630 od verze softwaru 2.0 do verze 2.2. Pokud máte jakékoliv dotazy, kontaktujte prosím místního zástupce společnosti Roche.
Doc Rev. 6.0 12/2010	V kapitole **NÁVOD K POUŽITÍ** byl vymazán text „při teplotě 2–8 °C“ z poznámky o skladování zpracovaných vzorků a kontrol, protože zpracované vzorky nemohou být vůbec skladovány. V kapitole **NÁVOD K POUŽITÍ** a kapitole **KONTROLA KVALITY** byl přidán pokyn týkající se umístění Negativní kontroly na konec stojanu na vzorky. V kapitole **VÝSLEDKY** byla pro lepší přehlednost vymazána věta „Ct hodnota pro HBV je nad hranicí testu nebo nebyla žádná Ct hodnota pro HBV získána“ u výsledků titrů „Target Not Detected“ v tabulce „Interpretace výsledků“. V kapitole **ODBĚR, PŘEPRAVA A SKLADOVÁNÍ VZORKŮ** byly harmonizovány stupnice osy y na obr. 4 až 9. V kapitole **HODNOCENÍ NEKLINICKÝCH FUNKČNÍCH PARAMETRŮ** byl opraven jeden datový bod na obr. 17. V kapitole **HODNOCENÍ NEKLINICKÝCH FUNKČNÍCH PARAMETRŮ** byly opraveny označení pro osy na obr. 14. Pokud máte jakékoliv dotazy, kontaktujte prosím místního zástupce společnosti Roche.

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

Distributed by

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

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Straße 116
68305 Mannheim, Germany

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

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

Roche Diagnostics
2, Avenue du Vercors
38240 Meylan, France

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

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

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

ROCHE, AMPERASE, AMPLICOR, AMPLILINK, COBAS, AMPLIPREP, HIGH PURE, TAQMAN a COBAS P jsou ochranné známky společnosti Roche.

ARMORED RNA je patentovaná technologie vyvinutá ve spolupráci Ambion, Inc. a Cenetron Diagnostics, LLC. U.S. patenty č. 5,677,124, č. 5,919,625, č. 5,939,262, č. 6,214,982, č. 6,399,307, a ostatní patenty v jednání. ARMORED RNA je obchodní známka společností Ambion a Cenetron.

MICROSOFT a WINDOWS jsou obchodní známky společnosti Microsoft Corporation ve Spojených státech anebo jiných zemích.

PROCLIN je obchodní známka společnosti Rohm and Haas Company.

SST je obchodní známka společnosti Becton Dickinson and Co.

VERSANT je obchodní známka společnosti Bayer.

Kyaninová barviva v tomto produktu podléhají patentovým právům GE Healthcare Bio-Sciences Corp. a Carnegie Mellon University a jsou licencovány společnosti Roche pouze za účelem výzkumu a jako součást diagnostických sad *in vitro*. Jakékoliv použití takových sad pro jiné účely než pro výzkum nebo *in vitro* diagnostiku vyžaduje poskytnutí sublicence od společnosti GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, New Jersey, U.S.A. a Carnegie Mellon University, Pittsburgh, Pennsylvania, U.S.A.

Některé části tohoto výrobku jsou chráněny jedním nebo více patenty US a jejich zahraničními ekvivalenty, které vlastní Isis Pharmaceuticals a jsou licencovány společnosti Roche Molecular Systems, Inc.

Technologie prevence přenosu je chráněna US patentem 5,035,996 a zahraničními odpovídajícími patenty vlastněnými společností Life Technologies, Inc. a licencovanými společnosti Roche Molecular Systems, Inc.

© 2011 Roche Molecular Systems, Inc. Všechna práva vyhrazena.

04/2011 (5382874001-07ENGL)

Doc Rev. 7.0 05549191001-06

EC REP

Roche Diagnostics GmbH
D-68298 Mannheim

CE
0088