

COBAS® TaqMan® HBV Test For Use With The High Pure System

cobas®

PRO ÚČELY DIAGNOSTIKY *IN VITRO*.

COBAS® TaqMan® HBV Test
High Pure System Viral Nucleic Acid Kit

HBV HPS

48 Tests P/N: 03500756 190

48 Tests P/N: 03502295 001

URČENÉ POUŽITÍ

Test COBAS® TaqMan® HBV určený pro použití se systémem High Pure (HPS) je *in vitro* amplifikační test nukleové kyseliny určený pro kvantifikaci DNA viru hepatitidy B (HBV) v lidském séru nebo plazmě za použití soupravy High Pure System Viral Nucleic Acid pro manuální přípravu vzorku a analyzátoru COBAS® TaqMan® 48 pro automatizovanou amplifikaci a detekci.

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

SOUHRN A VÝKLAD 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. Chroničtí nosiči jsou vystaveni vysokému riziku dlouhodobých komplikací infekce zahrnujících chronickou hepatitis, cirhózu a hepatocelulární karcinom^{2,3,4}. 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 v budoucím životě^{5,6}. 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 jaterního selhání^{7,8}. Různé kmeny HBV mohou produkovat buď HBeAg, který není detekovatelný v séru nebo může kmen ztratit schopnost vytvářet HBeAg, i když je přítomna aktivní infekce⁹. Proto může mít tento marker omezené využití při sledování progresu onemocnění¹⁰. Bylo zjištěno, že schopnost detekce HBV DNA v séru má prognostickou hodnotu s ohledem na výsledek akutní a chronické HBV infekce^{11,12,13,14}. Metodologie umožňuje detekci HBV DNA po vymizení HBsAg¹⁵ nebo detekci HBV při nedostatku sérologických markerů¹⁶. 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 HBV DNA v séru nebo plazmě^{13,17,18,19}. Rychlý a trvalý pokles hladin HBV DNA u pacientů léčených alfa-interferonem, Lamivudinem nebo Gancyklovirem byl prokázán jako prediktivní faktor úspěšného výsledku léčby^{10,20,21,22,23,24}. Monitorování hladin HBV DNA může předpovědět rozvoj rezistence na Lamivudin²⁵. Proto je cenným nástrojem kvantitativní test pro měření HBV DNA, který je možné použít spolu s dalšími sérologickými markery v léčbě HBV infekce.

PRINCIPY PROCEDURY

Test COBAS® TaqMan® HBV je založen na dvou základních postupech: (1) manuální příprava vzorku pro získání HBV DNA; (2) automatická PCR amplifikace cílové DNA za použití HBV specifických komplementárních primerů a detekce rozštěpených duálních fluorescenčních oligonukleotidových detekčních sond, které umožňují kvantifikaci HBV cílového amplifikovaného produktu (amplikon) a kvantifikačního standardu HBV DNA, který je zpracován, amplifikován a detekován simultánně se vzorkem.

Činidlo Master Mix obsahuje páry primerů a sond, které jsou specifické jak pro HBV DNA tak i kvantifikační standard HBV DNA. Činidlo Master Mix bylo vyvinuto tak, aby zajistilo ekvivalentní stanovení množství genotypů HBV A až G. Detekce amplifikované DNA se provádí pomocí cílově specifických a kvantifikačnímu standardu specifických, dvojitě značených oligonukleotidových sond, které umožňují nezávislou identifikaci amplikonu HBV a amplikonu kvantifikačního standardu HBV.

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 a kontroly o známém počtu kopií a společně s cílovou HBV prochází celým postupem přípravy vzorku, PCR amplifikace a detekce. Analyzátor COBAS® TaqMan® 48 vypočítává titer HBV DNA v testovaných vzorcích tak,

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

04958594041-06CS

1

Doc Rev. 7.0

že u každého vzorku a kontroly porovnává signál HBV se signálem kvantifikačního standardu HBV. Kvantifikačním standardem HBV se kompenzují inhibiční efekty a kontroluje se příprava a amplifikační proces tak, aby bylo možno v každém vzorku přesně stanovit množství HBV DNA.

Příprava vzorku

Test COBAS® TaqMan® HBV zpracovává vzorky plazmy a séra a izoluje HBV DNA pomocí generické manuální přípravy vzorku založené na vazbě nukleové kyseliny na skelná vlákna. HBV virové částice jsou rozloženy inkubací při zvýšené teplotě s proteázou a chaotropním lytickým/vazebným pufrům, který uvolňuje nukleové kyseliny a chrání uvolněnou HBV DNA před působením DNáz v plazmě a séru. Do každého vzorku se společně s činidlem pro lýzu zavádí známý počet molekul kvantifikačního standardu HBV DNA. Následně je k lytické směsi přidán isopropanol a tato směs je pak centrifugována ve sloupci s filtrační vložkou ze skelného vlákna. Během centrifugace jsou HBV DNA a kvantifikační standard HBV DNA navázány na povrch filtru ze skelného vlákna. Nenavázané substance, jako soli, bílkoviny a ostatní buněčné nečistoty, jsou odstraněny centrifugací. Absorbované nukleové kyseliny jsou vymyty a eluovány vodným roztokem. Spotřební materiál umožňuje paralelní zpracovávání 12 vzorků nebo jejich násobků. Zpracovaný vzorek obsahující HBV DNA a kvantifikační standard HBV DNA je přidán k amplifikační/detekční směsi. Cílová HBV DNA a kvantifikační standard HBV DNA jsou pak amplifikovány a detekovány pomocí analyzátoru COBAS® TaqMan® 48 použitím amplifikačních a detekčních činidel dodávaných v testové soupravě.

PCR amplifikace

Volba cíle

Výběr cílové sekvence DNA pro HBV závisí na identifikaci oblastí v genomu HBV, které vykazují maximální zachování sekvencí mezi všemi genotypy. V této souvislosti má pro schopnost testu detekovat všechny 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 genotypy. Test COBAS® TaqMan® HBV používá primery PCR amplifikace, které definují sekvence ve vysoce konzervované oblasti pre-Core/Core v HBV genomu.

Cílová amplifikace

Zpracované vzorky se přidávají do amplifikační směsi v amplifikačních zkumavkách (K-zkumavkách), ve kterých probíhá PCR amplifikace. Termocykler v analyzátoru COBAS® TaqMan® 48 zahřívá reakční směs pro denaturaci dvouvláknové DNA a vystavuje specifické cílové sekvence primeru na cirkulárním genomu HBV DNA a kvantifikačním standardu HBV DNA. Při chlazení směsi se primery připojí k cílové DNA. Termostabilní Z05 DNA polymeráza (Z05) *Thermus specie* v přítomnosti Mn^{2+} a nadbytku deoxynukleotid-trifosfátů (dNTP), tj. deoxyadenozin-, deoxyguanozin-, deoxycytidin- a deoxyuridin- (místo thymidin-) trifosfátu, polymerizuje primery po hybridizaci podél cílového templátu a vytváří molekulu dvouvláknové DNA nazývanou amplikon. Analyzátor COBAS® TaqMan® 48 opakuje automaticky tento proces po určený počet cyklů, kdy při každém cyklu dojde ke zdvojení množství amplikonové DNA. Požadovaný počet cyklů se na analyzátoru COBAS® TaqMan® 48 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® TaqMan® HBV použitím enzymu AmpErase (uracil-N-glykosylázy) a deoxyuridin-trifosfátu (dUTP). Enzym AmpErase rozpozná a katalyzuje rozklad řetězců DNA obsahujících deoxyuridin²⁶, ale nikoli 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. Také jakýkoliv nespecifický produkt vytvořený po iniciální aktivaci Master Mix manganem je zničen enzymem AmpErase a tím se zvyšuje senzitivita a specificita. Enzym AmpErase, který je obsažen 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 je neaktivní při teplotě nad 55 °C, tedy během tepelného cyklování, a proto nerozkládá cílový amplikon vytvořený během amplifikace.

Detekce produktů PCR v testu COBAS® TaqMan®

Test COBAS® TaqMan® HBV 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 oligonukleotidových sond specifických pro HBV a kvantifikační standard HBV s oznamovacím a tlumícím barvivem. V testu COBAS® TaqMan® HBV jsou sondy HBV a kvantifikačního standardu HBV značeny různými fluorescenčními oznamovacími barvivy. Jsou-li tyto dvojitě fluorescenčně značené sondy intaktní, je

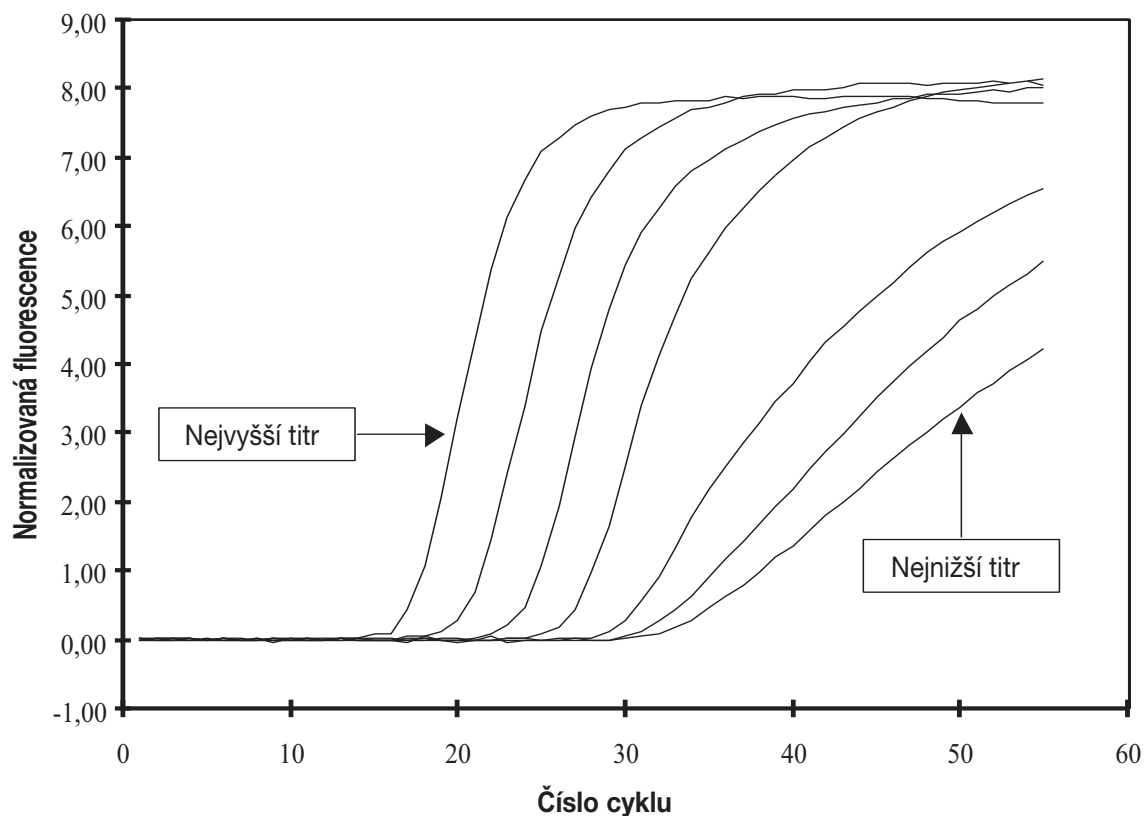
fluorescence oznamovacího barviva potlačena blízkostí tlumicího barviva kvůli přenosovému vlivu energie Försterova typu. Při PCR hybridizuje sonda s cílovou sekvencí a je rozštěpena 5' → 3' nukleázovou aktivitou termostabilní Z05 DNA polymerázy. Jakmile je oznamovací a tlumicí barvivo uvolněno a odděleno, nedochází nadále k útlumu a fluorescenční aktivita oznamovacího barviva se zvýší. Amplifikace HBV DNA a kvantifikačního standardu HBV 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 DNA a kvantifikačního standardu HBV DNA. Intenzita signálů odpovídá množství výchozího materiálu na začátku PCR reakce.

Základy kvantifikace v testu COBAS® TaqMan® HBV

Test COBAS® TaqMan® HBV poskytuje přesně kvantitativní výsledky ve velmi širokém dynamickém rozmezí, protože monitorování amplikonu je prováděno v exponenciální fázi amplifikace. Čím vyšší je titer HBV ve vzorku, tím dříve překročí fluorescence oznamovacího barviva HBV sondy základní hladinu fluorescence (viz obrázek 1). Protože je množství kvantifikačního standardu (QS) HBV DNA konstantní ve všech vzorcích, měla by se fluorescence oznamovacího barviva sondy HBV QS objevit ve stejném cyklu u všech vzorků (viz obrázek 2). V případech, kdy je amplifikace a detekce QS ovlivněna inhibicí nebo špatnou obnovou vzorku, objeví se fluorescence opožděně a tím umožní výpočet titru cílové HBV DNA odpovídajícím způsobem upravit. Objevení specifického fluorescenčního signálu 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 fází tohoto signálu (viz obrázek 3). Vyšší Ct hodnota značí nižší titer původní cílové HBV DNA. Dvojnásobný vzestup titru koreluje s poklesem o 1 Ct pro cílovou HBV DNA, zatímco desetinasobný vzestup titru koreluje s poklesem o 3,3 Ct.

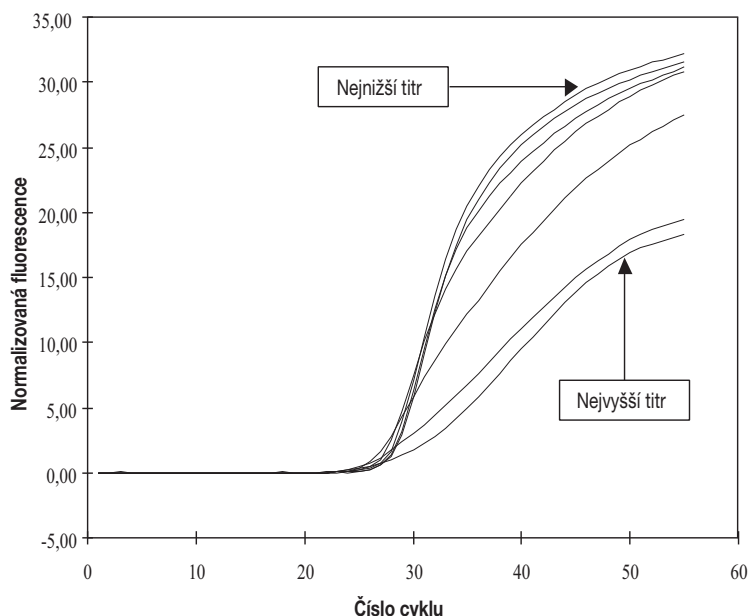
Obrázek 1 ukazuje cílové růstové křivky pro sérii ředění viru v rozsahu 5-log₁₀. Jakmile koncentrace viru narůstá, růstové křivky se posouvají do dřívějších cyklů. Proto růstová křivka nejvíce vlevo odpovídá nejvyššímu titru viru, zatímco růstová křivka nejvíce vpravo odpovídá nejnižšímu titru viru.

Obrázek 1



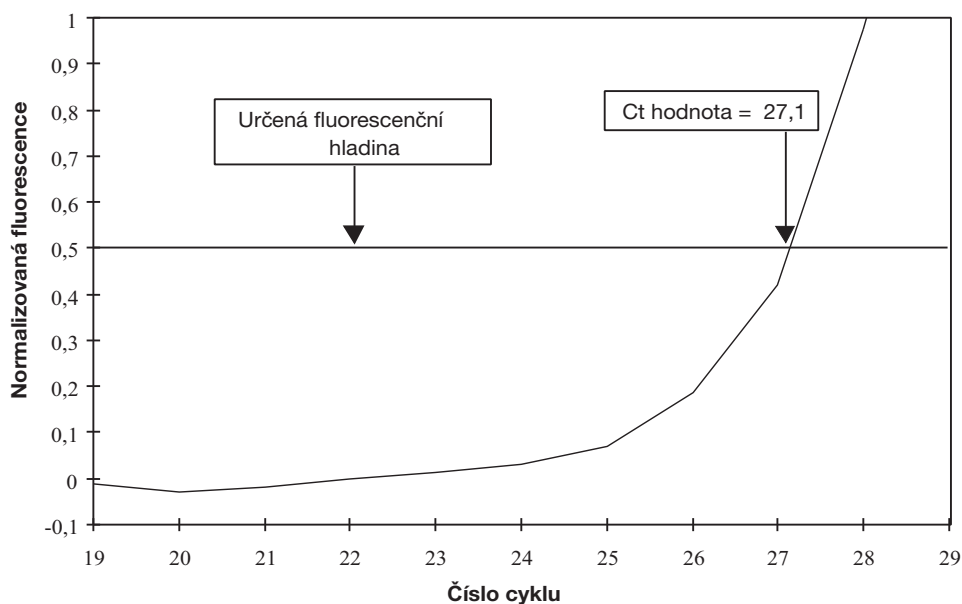
Obrázek 2 ukazuje růstové křivky kvantifikačního standardu pro vzorky ze sérií ředění viru zajímaví rozsah 5-log_{10} . Množství kvantifikačního standardu přidaného do každého vzorku je konstantní pro každou reakci. Ct hodnota kvantifikačního standardu je podobná bez ohledu na titer viru.

Obrázek 2



Obrázek 3 ukazuje příklad, jak jsou hodnoty fluorescence v každém cyklu normalizovány pro každou růstovou křivku. Dílčí číslo cyklu (Ct) je vypočítáno kde fluorescenční signál překročí Určenou fluorescenční hladinu.

Obrázek 3



Kvantifikace HBV DNA

Test COBAS® TaqMan® HBV 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 lineární plazmidová DNA konstrukce, která obsahuje fragmenty HBV sekvencí s vazebnými oblastmi pro primer identickými s cílovými sekvencemi HBV. Kvantifikační standard HBV generuje také amplifikační produkt stejné délky a základního složení, jako je cílová HBV DNA. Oblast vazující detekční sondu v kvantifikačním standardu HBV je modifikována tak, aby se amplicon kvantifikačního standardu HBV odlišil od cílového ampliconu HBV.

Při hybridizační fázi PCR reakce v analyzátoru COBAS® TaqMan® 48 jsou vzorky osvětleny a excitovány filtrovaným světlem a filtrovaná emisní fluorescenční data jsou shromažďována pro každý vzorek. Odečty pro každý vzorek jsou pak korigovány na fluktuace zařízení. Tyto odečty fluorescence jsou odeslány zařízením do softwaru AMPLILINK a uloženy v databázi. Pre-Checks (kontroly) se používají pro stanovení, zda-li data HBV DNA a kvantifikačního standardu HBV DNA reprezentují sady, které jsou platné a indikátory jsou generovány v případě, že data leží mimo nastavené limity. Po dokončení a splnění všech kontrol jsou odečty fluorescence zpracovány pro generování Ct hodnot pro HBV DNA a kvantifikační standard HBV DNA. Kalibrační konstanty specifické pro sérii, poskytované spolu s testem COBAS® TaqMan® HBV, jsou používány pro kalkulaci hodnoty titru pro vzorky a kontroly založené na Ct hodnotách HBV DNA a kvantifikačního standardu HBV DNA. Test COBAS® TaqMan® HBV je standardizován na mezinárodní standard WHO HBV pro NAT testování 97/746²⁹ a výsledky titru jsou hlášeny v mezinárodních jednotkách (IU/ml).

ČINIDLA

High Pure System Viral Nucleic Acid

48 testů

Souprava High Pure System Viral Nucleic Acid

(P/N: 03502295 001)

LYS

2 x 25 ml


(Lytický/vazebný pufr)

Tris

52% Guanidin-HCl

< 1% Urea

20% Triton X-100

Xn  52% hm. guanidin-HCl

Zdraví škodlivý

CAR

2 x 2 mg

(RNA, lyofilizovaná)

PK

2 x 100 mg

(Proteináza K, lyofilizovaná)

99% Proteináza K, lyofilizovaná

Xn  99% Proteináza K, lyofilizovaná

Zdraví škodlivý

IRB

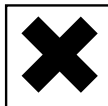
1 x 33 ml

(Pufr na odstraňování inhibitorů)

Tris

65% Guanidin-HCl

(přidejte 20 ml ethanolu)

Xn  65% hm. guanidin-HCl

Zdraví škodlivý

WASH

1 x 20 ml

(Promývací pufr)

Tris

NaCl

(přidejte 80 ml ethanolu)

ELB

1 x 30 ml

(Eluční pufr)

RS 4 kusy
(Stojanová souprava systému High Pure System Viral Nucleic Acid)

Lytický stojan
Stojan filtrační zkumavky s připevněným odpadním stojanem
Eluční stojan
Krycí stojan

WR 8 kusů
(Odpadní stojan High Pure System Viral Nucleic Acid)

COBAS® TaqMan® HBV Test
(P/N: 03500756 190)

HBV HPS

48 testů


Příprava vzorku a kontrolní činidla

HBV QS 2 x 1,0 ml
(Kvantifikační standard COBAS® TaqMan® HBV)

Pufr Tris-HCl
EDTA
< 0,001% linearizovaná dvouvláknová plazmidová DNA obsahující vložku. DNA vložka obsahuje sekvence vázající HBV primer a unikátní oblast pro vazbu sondy.
Amarantové barvivo
< 0,005% Poly rA RNA (syntetická)
0,05% azid sodný

HBV H(+)C**** 2 x 1,0 ml
[HBV High (+) kontrola]

< 0,001% linearizovaná dvouvláknová plazmidová DNA obsahující HBV sekvence
Negativní lidská plasma, nereagující podle US FDA licenčního testu na protilátky proti HCV, protilátky proti HIV-1/2, HIV p24 antigen a HBsAg; HIV-1 RNA, HCV RNA a HBV DNA nedetekovatelné PCR metodami
0,1% konzervační činidlo ProClin® 300


Xi  (3:1) směs 6-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**** 2 x 1,0 ml
[HBV Low (+) kontrola]

< 0,001% linearizovaná dvouvláknová plazmidová DNA obsahující HBV sekvence
Negativní lidská plasma, nereagující podle US FDA licenčního testu na protilátky proti HCV, protilátky proti HIV-1/2, HIV p24 antigen a HBsAg; HIV-1 RNA, HCV RNA a HBV DNA nedetekovatelné PCR metodami
0,1% konzervační činidlo ProClin® 300

Xi  (3:1) směs 6-chloro-2-methyl-2H-isothiazol-3-onu a 2-methyl-2H-isothiazol-3-onu

Dráždivý

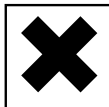
R36/38: Dráždí oči a kůži.
R43: Může vyvolat senzibilizaci při styku s kůží.

CTM (-) C

4 x 1,0 ml

[Negativní kontrola COBAS® TaqMan® (Lidská plazma)]

Negativní lidská plazma, nereagující podle US FDA licenčního testu na protilátky proti HCV, protilátky proti HIV-1/2, HIV p24 antigen a HBsAg; HIV-1 RNA, HCV RNA a HBV DNA nedetekovatelné PCR metodami
0,1% konzervační činidlo ProClin® 300

Xi  (3:1) směs 6-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.

Amplifikační a detekční činidla**HBV MMX****2 x 24 testů**

(COBAS® TaqMan® HBV Master Mix)

2 x 1,4 ml

Tricinový pufr
Hydroxid draselný
Acetát draselný
Glycerol
< 0,001% dATP, dCTP, dGTP, dUTP
< 0,001% Upstream a downstream primery pro Pre-Core/Core oblast HBV
< 0,001% Fluorescenčně značené oligonukleotidové sondy specifické pro HBV a kvantifikační standard HBV
< 0,001 % oligonukleotidový aptamer
< 0,05 % Z05 DNA polymeráza (mikrobiální)
< 0,1% enzym AmpErase (uracil-N-glykosyláza) (mikrobiální)
0,09% azid sodný

CTM Mn²⁺**2 x 24 testů**

(COBAS® TaqMan® roztok manganu)

2 x 1,0 ml

< 1,2% Acetát manganatý
Ledová kyselina octová
0,09% azid sodný

UPOZORNĚNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

- A. **PRO IN VITRO DIAGNOSTICKÉ POUŽITÍ.**
- B. Tento test je určen pro použití s lidskou plazmou odebranou do EDTA antikoagulačního činidla a lidského séra.
- C. Nepipetovat ústy.
- D. 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.
- E. ***Při odebírání alikvotních podílů z lahvíček s činidly dbejte na to, aby nedošlo k mikrobiální nebo ribonukleázové kontaminaci činidel.***
- F. ***Doporučuje se používat sterilní pipety na jedno použití a špičky na pipety prosté DNázy.***
- G. Nesměšujte dohromady činidla z různých šarží, ani z různých lahvíček téže šarže.
- H. Nesměšujte dohromady činidla z různých souprav.
- I. Nespotřebovaná činidla, odpad a vzorky likvidujte v souladu s celostátními a místními předpisy.
- J. Po uplynutí data expirace již soupravu nepoužívejte.
- K. Bezpečnostní listy pro materiály (MSDS) zašle na vyžádání Vaše místní pobočka společnosti Roche.
- L. Se vzorky je třeba zacházet jako s infekčními a používat odpovídající laboratorní postupy, například ty, jež jsou uvedeny v publikaci *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*³⁰ nebo v dokumentu CLSI M29-A3³¹. 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 chlornanu sodného o koncentraci 0,5 % tak dostanete zředěním bělidla pro domácnost v poměru 1:10.

- M. **UPOZORNĚNÍ: CTM (-) C, HBV L(+)**C** a HBV H(+)**C**** obsahují lidskou plazmu pocházející z lidské krve. Zdrojový materiál byl testován licenčními testy US FDA a byl sledován nereaktivním na přítomnost povrchového antigenu hepatitidy B (HBsAg), protilátek proti HIV-1/2 a HCV a HIV p24 antigenu. 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 **CTM (-) C, HBV L(+)**C** a HBV H(+)**C**** 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*³⁰ nebo v dokumentu CLSI M29-A3³¹. Všechny plochy důkladně očistěte a vydezinfikujte čerstvě připraveným 0,5% roztokem chlornanu sodného v deionizované nebo destilované vodě.
- N. **HBV MMX, HBV QS a CTM Mn²⁺** obsahují azid sodný. Ten může reagovat s olovenými 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.
- O. Při práci s jakýmkoli 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 některá činidla rozlijí nebo rozsypou, rozřeďte je vodou a dosucha vytřete.

ZACHÁZENÍ SE VZORKY A JEJICH SKLADOVÁNÍ

Činidla pro přípravu vzorků

- A. Skladujte činidla pro soupravu High Pure System Viral Nucleic Acid při teplotě 15–25 °C po přijetí.
- B. Skladujte eluční pufr (**ELB**) a lytický/vazebný pufr (**LYS**) při teplotě 15–25 °C. Po otevření skladujte **ELB** a **LYS** při teplotě 15–25 °C. Otevřené **ELB** a **LYS** musí být spotřebovány během 30 dní nebo do doby použitelnosti na obalu, dle toho, která je kratší.
- C. Po přidání elučního pufru (**ELB**) pro rekonstituci nosičové RNA a proteinázy K uchovávejte nespotebovanou rekonstituovanou nosičovou RNA (**CAR**) a nepoužitou rekonstituovanou proteinázu K (**PK**) při teplotě -15 až -25 °C. Po rekonstituci musí být nosičová RNA a proteináza K spotřebovány během 30 dnů nebo do doby použitelnosti na obalu, dle toho, která je kratší.
- D. Po přidání etanolu uchovávejte pufr pro odstranění inhibitorů (**IRB**) a promývací pufr (**WASH**) při teplotě 15–25 °C. Tyto pracovní roztoky jsou stabilní po dobu 30 dnů nebo do doby použitelnosti, dle toho, která je kratší.
- E. Lytický/vazebný pracovní roztok [lytický/vazebný pufr s nosičovou RNA, proteináza K a **HBV QS**] musí být spotřebovány okamžitě po přípravě. Jakýkoliv nadbytek musí být zlikvidován.

Amplifikační a detekční činidla

- A. **Činidla ani kontroly nezmrazujte.**
- B. Skladujte **HBV MMX, CTM (-) C, HBV L(+)**C**, HBV H(+)**C**, HBV QS a CTM Mn²⁺** při teplotě 2–8 °C. Pokud nebyly otevřeny, jsou tyto činidla stabilní do uvedeného data použitelnosti. Po otevření odeberte alikvotní množství pro velikost šarže o 12 vzorcích, skladujte zbývající **HBV MMX, HBV L(+)**C**, HBV H(+)**C**, HBV QS a CTM Mn²⁺** při teplotě 2–8 °C. Po otevření jsou **HBV MMX, HBV L(+)**C**, HBV H(+)**C**, HBV QS a CTM Mn²⁺** stabilní při teplotě 2–8 °C po dobu 30 dnů nebo do data použitelnosti, dle toho které je dřív. Po otevření je třeba jakoukoliv nespotebovanou část **CTM (-) C** zlikvidovat.
- C. Pracovní Master Mix (připravený přidáním **CTM Mn²⁺** do **HBV MMX**) musí být uchováván při teplotě 2–8 °C v temnu. Připravené vzorky a kontroly musí být přidány během 2 hodiny přípravy pracovního Master Mix.
- D. Zpracované vzorky a kontroly jsou stabilní maximálně 3 hodiny při teplotě 20–30 °C, 24 hodin při teplotě 2–8 °C nebo při zmrazení na -20 °C po dobu 1 týdne.
- E. S amplifikací je třeba začít do 3 hodin od okamžiku, kdy byly zpracované vzorky a kontroly přidány do pracovního Master Mix.

DODÁVANÝ MATERIÁL

Činidla pro přípravu vzorků

A. High Pure System Viral Nucleic Acid

Souprava High Pure System Viral Nucleic Acid
(P/N: 03502295 001)

LYS

(Lytický/vazebný pufr)

CAR

(Nosičová RNA)

PK

(Proteináza K)

IRB

(Pufr na odstraňování inhibitorů)

WASH

(Promývací pufr)

ELB

(Eluční pufr)

RS

(Stojanová souprava systému High Pure System Viral Nucleic Acid)

WR

(Odpadní stojan High Pure System Viral Nucleic Acid)

Amplifikační a detekční činidla

B. COBAS® TaqMan® HBV Test

(P/N: 03500756 190)

HBV HPS

HBV QS

(Kvantifikační standard COBAS® TaqMan® HBV)

HBV H(+)**C**

[HBV High (+) kontrola]

HBV L(+)**C**

[HBV Low (+) kontrola]

CTM (-) **C**

[Negativní kontrola COBAS® TaqMan® (Lidská plazma)]

HBV MMX

(COBAS® TaqMan® HBV Master Mix)

CTM Mn²⁺

(COBAS® TaqMan® roztok manganu)

POTŘEBNÝ MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ DODÁVKY

Vybavení a software

- Analyzátor COBAS® TaqMan® 48
- AMPLILINK software
- Datová stanice pro software AMPLILINK
- Příručka pro analyzátor COBAS® TaqMan® 48 pro použití se softwarem AMPLILINK, verze 3.2 a 3.3
- Aplikační příručka pro software AMPLILINK, verze 3.2 pro použití se zařízením COBAS® AmpliPrep, analyzátořem COBAS® TaqMan®, analyzátořem COBAS® TaqMan® 48 nebo aplikační příručka pro software AMPLILINK, verze 3.3 pro použití se zařízením COBAS® AmpliPrep, analyzátořem COBAS® TaqMan®, analyzátořem COBAS® TaqMan® 48, analyzátořem COBAS® AMPLICOR® a zařízením **cobas p 630**
- Víčkovač K-zkumavek (P/N: 03516539001)
- Uzavírací nástroj K-zásobníků (P/N: 03339904001)
- K-nosič analyzátořu COBAS® TaqMan® 48 (P/N: 28150397001)
- Nosič K-zásobníku (P/N: 03341488001)
- Držák K-nosiče (P/N: 03287696001)
- Přemístovač K-nosičů (P/N: 03517519001)

Spotřební materiál

- Box s K-zkumavkami v počtu 12 x 96 (P/N: 03137082001)
- Box s K-zásobníky 24 ks (P/N: 03343146001)

Požadavky na centrifugu

- Stolní centrifuga Sigma 4-15C nebo ekvivalentní mikrotitrační destičková centrifuga s centrifugačním výkonem 4600 x g
- Vychylující rotor centrifugy Sigma P/N: 11118 (obsahuje 2 nádoby P/N: 13218 a 2 držáky destičky P/N: 17978) nebo ekvivalentní

DALŠÍ POTŘEBNÝ MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ DODÁVKY

- Isopropanol (> 99 %) - vyhovuje ACS specifikacím nebo lepší
- Ethanol (96–100 %) – vyhovuje ACS specifikacím nebo lepší
- Nastavitelné pipety*: (kapacita 250 µl a 1000 µl) s aerosolovou bariérou nebo DNázy prostými špičkami s pozitivním posuvem
- Pipetová pomůcka: Drummond (P/N: 4-000-100) nebo ekvivalentní
- Vodní lázeň nastavená na 50 °C (± 2 °C)
- Vyhřívací blok nastavený na 70 °C (± 2 °C)
- Sterilní jednorázové sérologické pipety: 5, 10 a 25 ml
- Sterilní polypropylenové kónické zkumavky o objemu 15 ml a 50 ml: Corning (P/N: 430052 a P/N: 430290) nebo ekvivalentní
- Sterilní 2,0 ml mikrocentrifugační zkumavky: Sarstedt (P/N: 72.693.005) nebo ekvivalentní
- Vířivý mixér
- Stojany na zkumavky
- Rukavice na jedno použití bez pudru
- Kalibrované teploměry pro vodní lázeň a vyhřívací blok

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

ODBĚR, PŘEPRAVA A SKLADOVÁNÍ VZORKŮ

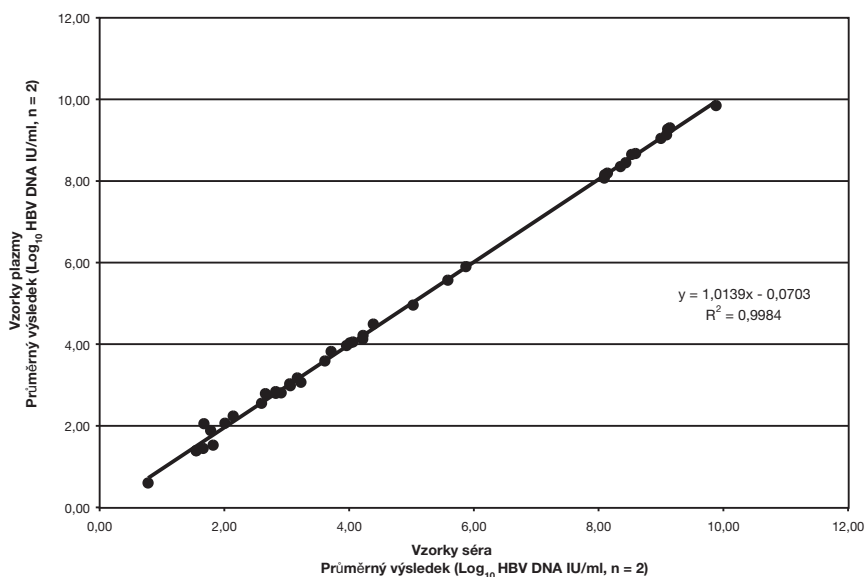
POZN.: Zacházejte se vzorky a kontrolami jako s potenciálně infekčním materiálem.

A. Odběr vzorku

Test COBAS® TaqMan® HBV je určen pouze pro použití s vzorky séra nebo plazmy. Krev by se měla odebírat do separačních zkumavek na sérum BD SST (Serum Separator Tubes) nebo do zkumavek za použití EDTA (vršek levandulové barvy) jako antikoagulantu.

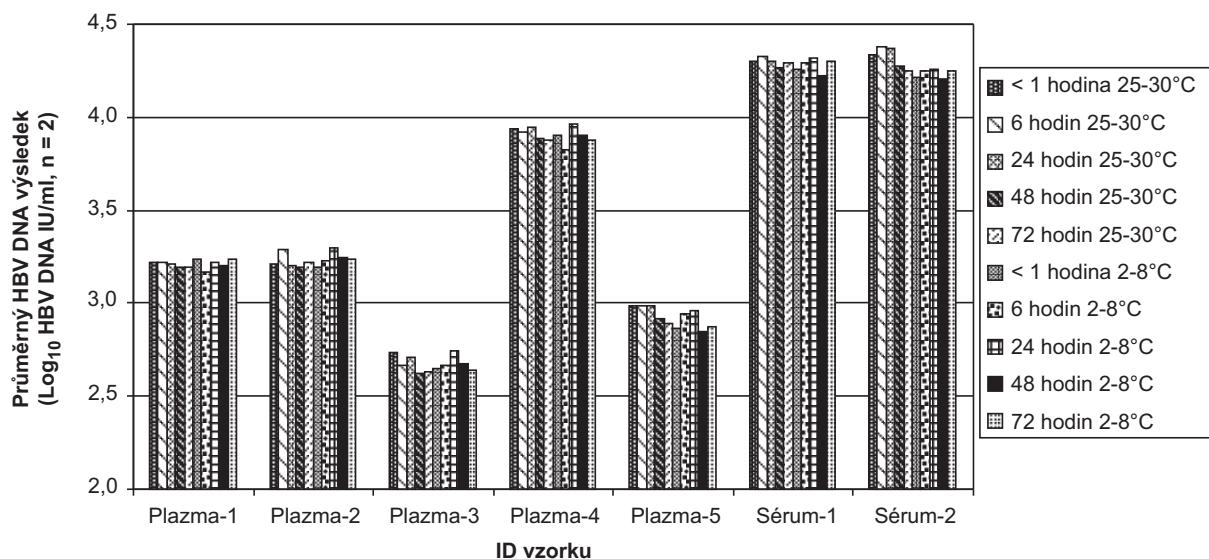
Plnou krev uchovávejte při teplotě 2–25 °C maximálně 1 den. Použití EDTA plazmy nebo séra vede k výsledkům testu, které jsou přibližně ekvivalentní. Obrázek 4 ukazuje vliv typu matrix na výsledky HBV DNA pro vzorky pacienta.

Obrázek 4
Srovnání typů vzorku EDTA plazmy a séra



Sérum nebo plazma z plné krve separujte do 1 dne od odběru, a to odstředováním při 800–1600 x g po dobu 20 minut za pokojové teploty. Sérum nebo plazma převedte do sterilní polypropylenové zkumavky. Údaje ze studií zabývajících se cykly odběru vzorku ukazuje obr. 5.

Obrázek 5
Stabilita HBV v plné krvi s EDTA antikoagulantem nebo ve zkumavkách pro separaci séra před separací do plazmy nebo séra



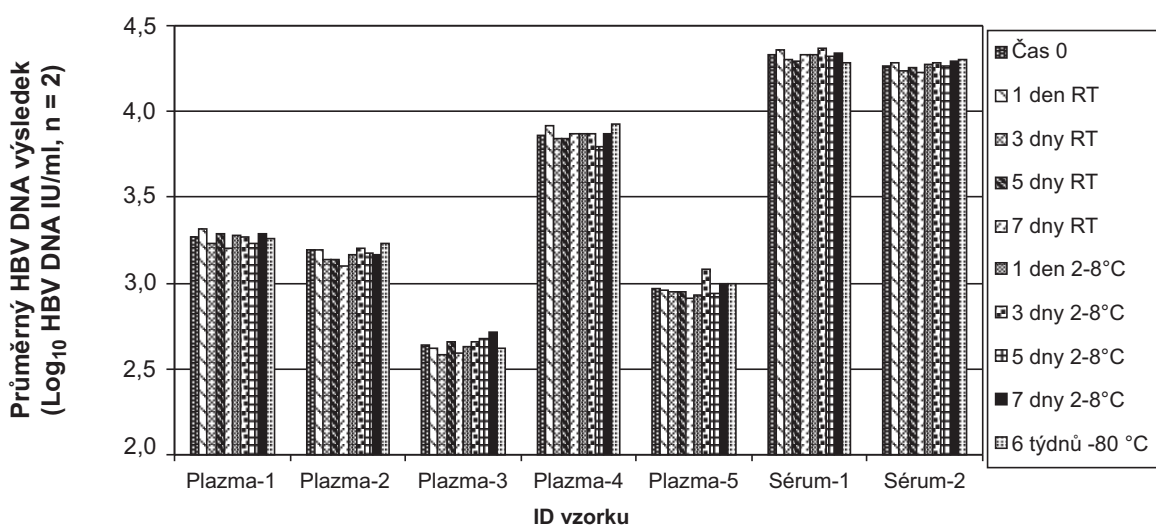
B. Přeprava vzorků

Při přepravě plné krve, séra nebo plazmy je třeba dodržovat celostátní resp. místní předpisy o dopravě etiologických agens³². Plná krev se přepravuje za teplot 2–25 °C a musí se zpracovat do 1 dne 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

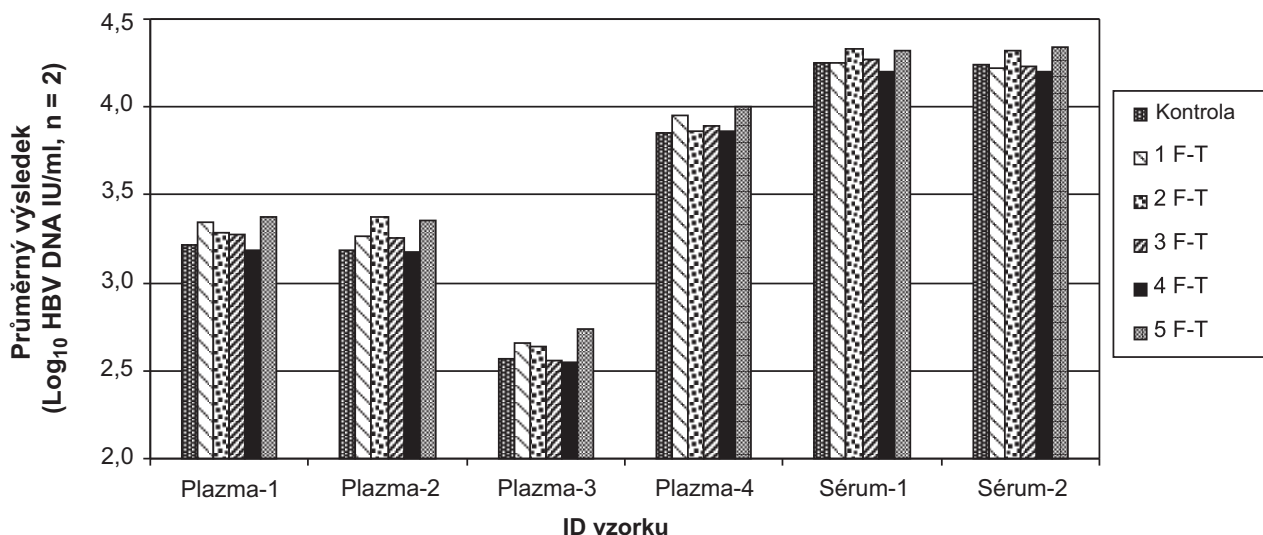
Vzorky séra nebo plazmy mohou být skladovány při pokojové teplotě po dobu až 3 dnů, při teplotě 2–8 °C po dobu až 7 dnů nebo zmrazené na teplotu -20 °C do -80 °C po šest týdnů. Doporučuje se vzorky uchovávat v alikvotních podílech po 800–900 µl ve sterilních polypropylenových zkumavkách o objemu 2,0 ml se šroubovacím uzávěrem (například Sarstedt P/N: 72.694.006). Údaje ze studií zabývajících se cykly skladování vzorku ukazuje obr. 6.

Obrázek 6
HBV stabilita v EDTA plazmě nebo séru



Vzorky séra a plazmy mohou být zmrazeny a rozmrazeny maximálně pětkrát bez ztráty HBV DNA. Údaje ze studií zabývajících se cykly zmrazení-rozmrazení ukazuje obr. 7.

Obrázek 7
HBV výsledky až po pěti cyklech zmrazení a rozmrazení



NÁVOD K POUŽITÍ

POZN.: Detailní provozní pokyny, tisk výsledků a interpretace příznaků, komentáře a chybová hlášení naleznete v příručce uživatele k analyzátoru COBAS® TaqMan® 48 pro použití s aplikační příručkou pro software AMPLILINK, verze 3.2 a 3.3 a buď (1) s aplikační příručkou pro software AMPLILINK, verze 3.2 pro použití se zařízením COBAS® AmpliPrep, analyzátořem COBAS® TaqMan®, analyzátořem COBAS® TaqMan® 48 a analyzátořem COBAS® AMPLICOR® nebo (2) aplikační příručkou pro software AMPLILINK, verze 3.3 pro použití se zařízením COBAS® AmpliPrep, analyzátořem COBAS® TaqMan®, analyzátořem COBAS® TaqMan® 48, analyzátořem COBAS® AMPLICOR® a zařízením cobas p 630.

POZN.: Všechna amplifikační a detekční činidla musí být před použitím při pokojové teplotě. Vyjměte z teploty 2–8 °C minimálně 30 minut před použitím.

POZN.: Vzorky séra nebo plazmy musí být před použitím temperovány po dobu 15–30 minut na teplotu okolí.

POZN.: Kde je tak uvedeno, používají se pipetory s hroty s aerosolovou bariérou nebo s pozitivním posunem. Věnujte maximální pozornost zabránění kontaminace.

Množství pro jedno měření:

Každá souprava obsahuje dostatečné množství činidla na čtyři 12-testová měření, která mohou probíhat zvlášť nebo současně. Jeden replikát, každý z **CTM (–) C**, **HBV L(+)**C**** a **HBV H(+)**C****, musí být zahrnut do každého běhu testu s až 24 vzorky a kontrolami (viz část "Kontrola kvality"). Amplifikační a detekční činidla jsou balena v 24-testových lahvičkách na dvě použití. Pro co nejefektivnější využití je vhodné zpracovávat činidla, vzorky i kontroly v dávkách, jež jsou násobky 12.

Příprava vzorků a kontrol

POZN.: Používáte-li zmrazené vzorky séra nebo plazmy, ponechte je při pokojové teplotě, dokud kompletně nerozmraznou a před použitím je nechte 5–10 sekund vířit.

POZN.: Umožněte, aby činidla před dalším postupem dosáhla teploty okolí. Předehřejte vyhřívací blok(y) na teplotu 70 °C (± 2 °C) a vodní lázeň na teplotu 50 °C (± 2 °C) předtím, než započnete purifikační reakce.

A. Příprava činidel

POZN.: Připravte lytický/vazebný pracovní roztok až poté, co byla teplota všech vzorků a kontrol vyrovnána na okolní teplotu za dobu 15–30 minut.

1. Připravte pufr pro odstranění inhibitorů pipetováním 20 ml 96–100 % ethanolu do pufru pro odstranění inhibitorů (IRB). Promíchejte 5-10-ti násobným obrácením. Toto zajistí dostatek rekonstituovaného pufru pro odstranění inhibitoru na 48 testů.

- Připravte promývací pufr pipetováním 80 ml 96–100 % ethanolu do promývacího pufru (**WASH**). Promíchejte 5–10-ti násobným obrácením. Toto zajistí dostatek rekonstituovaného promývacího pufru na 48 testů.
- Předehejte eluční pufr (**ELB**) na teplotu 70 °C (± 2 °C) v mikrocentrifugační zkumavce se šroubovacím uzávěrem o objemu 2,0 ml. Je možné použít více zkumavek. Eluční objem na vzorek je 75 μ l. Předehejte objem uvedený v tabulce níže dle počtu testů.

Činidlo	Počet replikátů	
	12	24
Eluční pufr (ml)	2,0	4,0

- Pipetujte objem isopropanolu uvedený v tabulce níže dle počtu testů do čisté sterilní zkumavky.

Činidlo	Počet replikátů	
	12	24
Isopropanol (ml)	5,0	10,0

- Pipetujte 0,5 ml elučního pufru (**ELB**) do nosičové RNA (**CAR**). Vyměňte uzávěr, otočte lahvičkou a pak jí míchejte, dokud se veškerá nosičová RNA nerozpustí. Rekonstituovaná nosičová RNA je dostačující pro 24 testů. Nepoužitý objem rekonstituované nosičové RNA může být uchováván při teplotě -15 až -25 °C po dobu maximálně 30 dní nebo do doby použitelnosti, dle toho, která doba je kratší.
- Pipetujte 5,0 ml elučního pufru (**ELB**) do proteinázy K (**PK**). Vyměňte uzávěr, otočte lahvičkou a pak jí míchejte vířením, dokud se veškerá proteináza K nerozpustí. Rekonstituovaná proteináza K je dostačující pro 24 testů. Nepoužitý objem rekonstituované proteinázy K může být uchováván při teplotě -15 až -25 °C po dobu maximálně 30 dní nebo do doby použitelnosti, dle toho, která doba je kratší.
- Připravte lytický/vazebný pracovní roztok následujícím způsobem pipetováním objemů uvedených v následující tabulce dle počtu vzorků a kontrol, které mají být zpracovány.

Činidla	Počet replikátů	
	12	24
Lytický/vazebný pufr (ml)	7,0	14,0
Nosičová RNA (μl)	140	280
HBV QS (μl)	39	78
Proteináza K (ml)	1,4	2,8

POZN.: Objem HBV QS je specifický pro test COBAS® TaqMan® HBV.

POZN.: Pokud je třeba použít zmrazenou rekonstituovanou nosičovou RNA nebo proteinázu K, rozpusťte je při pokojové teplotě a před použitím je několikrát obraťte.

- Přidejte uvedený objem lytického/vazebného pufru do čisté sterilní zkumavky o objemu 50 ml.
- Přidejte uvedený objem rekonstituované nosičové RNA do zkumavky obsahující lytický/vazebný pufr.
- Vířením míchejte **HBV QS** po dobu 3–5 sekund a přidejte uvedený objem **HBV QS** do zkumavky obsahující lytický/vazebný pufr a rekonstituovanou nosičovou RNA.
- Zkumavku uzavřete a dobře promíchejte převrácením 10–15-krát. **NEMÍCHEJTE vířením** – víření vytváří v roztoku bubliny.
- Přidejte uvedený objem rekonstituované proteinázy K do zkumavky obsahující lytický/vazebný pufr.
- Zkumavku uzavřete a dobře promíchejte převrácením 10–15-krát. **NEMÍCHEJTE vířením** – víření vytváří v roztoku bubliny. Začněte rozdělovat lytický/vazebný pracovní roztok okamžitě po přidání a míchání proteinázy K s lytickým/vazebným pufr.

Nepoužitý lytický/vazebný pufr (**LYS**) může být uchováván při teplotě 15 až 25 °C po dobu maximálně 30 dní nebo do doby použitelnosti, dle toho, která doba je kratší. Nespotřebovaný lytický/vazebný pracovní roztok je třeba znehodnotit.

B. Příprava vzorku a kontroly

POZN.: Pro tuto proceduru jsou doporučovány nastavitelné pipety se špičkami odolnými vůči aerosolům.

POZN.: V krocích 1, 14, 16, 19 a 22 může být použita opakovací pipeta s vhodnou velikostí sterilní kombinované špičky. Je však třeba dávat velký pozor, aby se předešlo spláchnutí činidel a zkřížené kontaminaci.

POZN.: Dávejte si pozor, aby během celého postupu nedošlo k rozstříknutí lytického/vazebného pracovního roztoku, vzorku, kontroly a izopropanolu na nalepovací oblast mezi jamku a víčko na okraji každé jamky.

POZN.: Používejte rukavice, které obsluze dobře padnou. Často měňte rukavice, zvláště po manipulaci s pozitivními kontrolami a otevření plných zkumavek z lytického stojanu. Nikdy se nedotýkejte vnitřní části víček (např. při otvírání nebo zavírání).

POZN.: Při manipulaci se soupravami kontrol a klinickými vzorky vložte negativní kontrolu před zpracováním soupravy pozitivních kontrol.

1. Pipetujte 625 µl lytického/vazebného pracovního roztoku do každé jamky v lytickém stojanu (I, transparentní). Zabraňte pokapání nalepovací oblasti mezi jamkou a víčkem na okraji každé jamky. Jemně zatlačte na víčka tak, aby přikrývala jamky. Nepoužívejte zamykací mechanismus.
2. Při postupném otevření vždy jen jedné jamky opatrně pipetujte 500 µl vzorku nebo kontroly do odpovídající jamky. Zabraňte pokapání nalepovací oblasti mezi jamkou a víčkem na okraji každé jamky. Po přidání každého vzorku nebo kontroly přitlačte víčko. Začněte u kyvného závěsu a jemně přitlačte směrem dolů. Pokračujte v jemném tlaku přes střed víčka a zabezpečením zamykacího mechanismu pevně uzavřete jamku.
3. Poté, co byly přidány všechny vzorky a kontroly, promíchejte naplněný lytický stojan vířením po dobu přibližně 10 sekund. Nemíchejte příliš prudce. Vizually si ověřte, že byly všechny jamky dobře vířením promíchány.
4. Opatrně umístěte lytické stojany do vodní lázně předehřáté na 50 °C (± 2 °C), tak aby nedošlo k postříkání. Inkubujte lytický stojan 10 minut. Během inkubace by měl být lytický stojan ponořený, ale nesmí plavat. Ujistěte se, že horní část lytického stojanu mezi jamkami zůstane během inkubace suchá. Po vynětí z vodní lázně pečlivě osušte horní i spodní část lytického stojanu.
5. Centrifugujte lytický stojan po dobu 10–20 sekund při nastavení 4600 x g v mikrotitrační destičkové centrifuzi. Centrifuga nemusí dosáhnout nastavenou rychlost. Zrakem zkontrolujte hladinu kapaliny v každé jamce, zda nedošlo k žádnému úniku. Jestliže zjistíte únik, nepokračujte.
6. Vždy v jednom okamžiku mějte otevřenou jen jednu jamku. Jemným tlakem na kyvný závěs uvolněte zamykací mechanismus, zvedněte víčko jamky a do každé jamky napipetujte 250 µl isopropanolu. Po každém přidání přitlačte víčko. Začněte u kyvného závěsu a jemně přitlačte směrem dolů. Pokračujte v jemném tlaku přes střed víčka a zabezpečením zamykacího mechanismu pevně uzavřete jamku.

POZN.: Objem isopropanolu je specifický pro každý test COBAS® TaqMan®.

7. Zrakem zkontrolujte, zda jsou všechny stojany pevně uzavřené. Míchejte vzorky převrácením stojanu třikrát a následným vířením stojanu po dobu přibližně 10 sekund. Nemíchejte příliš prudce. Vizually si ověřte, že byly všechny jamky dobře vířením promíchány.
8. Centrifugujte lytický stojan po dobu 10–20 sekund při nastavení 4600 x g v mikrotitrační destičkové centrifuzi. Centrifuga nemusí dosáhnout nastavenou rychlost. Zrakem zkontrolujte hladinu kapaliny v každé jamce, zda nedošlo k žádnému úniku. Jestliže zjistíte únik, nepokračujte.
9. Vždy v jednom okamžiku mějte otevřenou jen jednu jamku. Jemným tlakem na kyvný závěs uvolněte zamykací mechanismus, zvedněte víčko jamky a do odpovídajících jamek na stojanu filtrační zkumavky (II, žlutý) s připevněným odpadním stojanem (bílý) přeneste 750 µl směsi vzorku nebo kontroly. Po přidání každé směsi vzorku nebo kontroly přitlačte víčko. Začněte u kyvného závěsu a jemně přitlačte směrem dolů. Pokračujte v jemném tlaku přes střed víčka a zabezpečením zamykacího mechanismu pevně uzavřete jamku.
10. Po přidání všech vzorků nebo kontrol centrifugujte soustavu stojanu filtrační zkumavky po dobu 2 minut při 4600 x g v mikrotitrační destičkové centrifuzi. Zrakem zkontrolujte hladinu kapaliny v každé jamce, zda nedošlo k žádnému úniku. Jestliže zjistíte únik, nepokračujte.
11. Vždy v jednom okamžiku mějte otevřenou jen jednu jamku. Jemným tlakem na kyvný závěs uvolněte zamykací mechanismus, zvedněte víčko jamky a do odpovídajících jamek na stojanu filtrační zkumavky přeneste zbývající směs vzorku nebo kontroly. Po přidání každé směsi vzorku nebo kontroly uzavřete víčko jamky. Začněte u kyvného závěsu a jemně přitlačte směrem dolů. Pokračujte v jemném tlaku přes střed víčka a zabezpečte zamykací mechanismus. Lytický stojan odpovídajícím způsobem zlikvidujte.
12. Centrifugujte soustavu stojanu filtračních zkumavek po dobu 2 minut při 4600 x g v mikrotitrační destičkové centrifuzi. Zrakem zkontrolujte hladinu kapaliny v každé jamce, zda nedošlo k žádnému úniku. Jestliže zjistíte únik, nepokračujte.

13. Vyměňte stojan filtrační zkumavky z odpadního stojanu stisknutím obou uzavíracích spojení na horní straně stojanu filtračních zkumavek. Znehodnoťte odpadní stojan. Vyměňte za nový odpadní stojan a zasadte stojan filtračních zkumavek do odpadního stojanu.
14. Otevřete všechna víčka stojanu filtrační zkumavky a pipetujte 400 µl pufru pro odstranění inhibitorů (IRB) po stěně každé jamky. **Nedotýkejte se stran jamky.** Po přidání pufru pro odstranění inhibitorů do všech jamek přitlačte víčko. Začněte u kyvného závěsu a jemně přitlačte směrem dolů. Pokračujte v jemném tlaku přes střed víčka a zabezpečením zamykacího mechanismu pevně uzavřete víčka.
15. Centrifugujte soustavu stojanu filtračních zkumavek po dobu 2 minut při 4600 x g v mikrotitrační destičkové centrifuze. Zrakem zkontrolujte hladinu kapaliny v každé jamce, zda nedošlo k žádnému úniku. Jestliže zjistíte únik, nepokračujte.
16. Otevřete všechna víčka stojanu filtrační zkumavky a pipetujte 700 µl promývacího pufru (WASH) po stěně každé jamky. **Nedotýkejte se stran jamky.** Po přidání promývacího pufru do všech jamek přitlačte víčko. Začněte u kyvného závěsu a jemně přitlačte směrem dolů. Pokračujte v jemném tlaku přes střed víčka a zabezpečením zamykacího mechanismu pevně uzavřete víčka.
17. Centrifugujte soustavu stojanu filtračních zkumavek po dobu 2 minut při 4600 x g v mikrotitrační destičkové centrifuze. Zrakem zkontrolujte hladinu kapaliny v každé jamce, zda nedošlo k žádnému úniku. Jestliže zjistíte únik, nepokračujte.
18. Vyměňte stojan filtrační zkumavky z odpadního stojanu stisknutím obou uzavíracích spojení na horní straně stojanu filtračních zkumavek. Znehodnoťte odpadní stojan. Vyměňte za nový odpadní stojan a zasadte stojan filtračních zkumavek do odpadního stojanu.
19. Otevřete všechna víčka stojanu filtrační zkumavky a pipetujte 700 µl promývacího pufru po stěně každé jamky. **Nedotýkejte se stran jamky.** Po přidání promývacího pufru do všech jamek přitlačte víčko. Začněte u kyvného závěsu a jemně přitlačte směrem dolů. Pokračujte v jemném tlaku přes střed víčka a zabezpečením zamykacího mechanismu pevně uzavřete víčka.
20. Centrifugujte soustavu stojanu filtračních zkumavek po dobu 3 minut při 4600 x g v mikrotitrační destičkové centrifuze. Zrakem zkontrolujte hladinu kapaliny v každé jamce, zda nedošlo k žádnému úniku. Jestliže zjistíte únik, nepokračujte.
21. Vyměňte stojan filtrační zkumavky z odpadního stojanu stisknutím obou uzavíracích spojení na horní straně stojanu filtračních zkumavek. Umístěte stojan filtrační zkumavky do elučního stojanu (IIIA, modrý) a zasadte stojan filtrační zkumavky do elučního stojanu. Znehodnoťte odpadní stojan odpovídajícím způsobem.
22. Otevřete všechna víčka stojanu filtrační zkumavky a pipetujte 75 µl předehřátého elučního pufru (ELB) **do středu každého filtru, aniž byste se ho dotkli.**

POZN.: Nepřidávejte eluční pufr dávkováním po stěně jamky.

Po přidání elučního pufru do všech jamek přitlačte víčko. Začněte u kyvného závěsu a jemně přitlačte směrem dolů. Pokračujte v jemném tlaku přes střed víčka a zabezpečením zamykacího mechanismu pevně uzavřete jamku.

23. Eluční stojan inkubujte při pokojové teplotě po dobu minimálně 3 minut po přidání elučního pufru do poslední jamky. Začněte u kyvného závěsu a jemně přitlačte víčko směrem dolů. Pokračujte v jemném tlaku přes střed víčka a zabezpečením zamykacího mechanismu pevně uzavřete jamku.
24. Centrifugujte soustavu stojanu filtračních zkumavek po dobu 3 minut při 4600 x g v mikrotitrační destičkové centrifuze. Zrakem zkontrolujte hladinu kapaliny v každé jamce, zda nedošlo k žádnému úniku. Jestliže zjistíte únik, nepokračujte.
25. Vyměňte stojan filtračních zkumavek z elučního stojanu stisknutím obou uzavíracích spojení na horní straně stojanu filtrační zkumavky. Znehodnoťte stojan filtračních zkumavek odpovídajícím způsobem.
26. Umístěte krycí stojan (IIIB, modrý) do elučního stojanu (IIIA, modrý). Silně stiskněte a uzavřete spojení na elučním stojanu. Přitlačte víčko. Začněte u kyvného závěsu a jemně přitlačte směrem dolů. Pokračujte v jemném tlaku přes střed víčka a zabezpečením zamykacího mechanismu pevně uzavřete všechna víčka.
27. Zpracované vzorky a kontroly jsou používány přímo pro PCR. Použijte 50 µl zpracovaných vzorků a kontrol pro amplifikaci. Přidejte zpracované vzorky a kontroly k pracovnímu Master Mix do 3 hodin od ukončení přípravy vzorku a kontroly. Pokud není možné použít zpracované vzorky a kontroly do 3 hodin od přípravy, mohou být uskladněny při teplotě 2–8°C po dobu maximálně 24 hodin v zakrytém elučním stojanu nebo zmrazeny při teplotě -20°C po dobu 1 týdne ve sterilních polypropylenových zkumavkách se šroubovacím uzávěrem o objemu 2,0 ml (například Sarstedt P/N: 72.694.006). Amplifikujte zpracované vzorky a kontroly po dobu 3 hodin přidáním vzorků a kontrol do pracovního Master Mix.

Amplifikace a detekce

POZN.: K-nosiče/nosič K-zásobníku a držák K-nosiče/držák nosiče K-zásobníku by měly být otřeny tkaninou nepouštějící vlas navlhčenou do 70% roztoku isopropanolu.

C. Příprava činidel

POZN.: Vzorky a kontroly zpracované pomocí činidel COBAS® TaqMan® HBV Master Mix (HBV MMX), „Pracovní Master Mix“ (pracovní MMX) a Pracovní Master Mix Plus jsou citlivé na světlo. Chraňte tato činidla před světlem.

POZN.: COBAS® TaqMan® HBV Master Mix (HBV MMX) a COBAS® TaqMan® roztok manganu (CTM Mn²⁺) musí být temperovány na okolní teplotu po dobu minimálně 30 minut před přípravou pracovního Master Mix.

POZN.: Po dokončení přípravy vzorku a kontroly připravte pracovní MMX.

POZN.: Pracovní MMX musí být použit do 2 hodin od přípravy.

POZN.: Jakmile jsou zpracované vzorky a kontroly přidány do Pracovního Master Mix, musí být amplifikace započata do 3 hodin.

1. Temperujte jednu lahvičku HBV MMX a jednu lahvičku CTM Mn²⁺ na teplotu okolí po dobu minimálně 30 minut.
2. Umístěte K-nosič nebo nosič K-zásobníků do držáku K-nosiče/držák nosiče K-zásobníku.
3. Vložte nové K-zkumavky nebo nový K-zásobník do K-nosiče/nosiče K-zásobníku bez toho, abyste se dotkli stran K-zkumavek.

POZN.: Má-li být zpracováno méně než 24 zkumavek, musí být obsazeny pozice 1, 2, 5, 20, 23 a 24 pro vyvážení K-nosiče v termocykleru. Při použití K-zásobníku není nutné vyvažovat termocykler.

4. Otevřete K-zkumavky pomocí zařízení pro manipulaci s víčky K-zkumavek. Umístěte víčka do parkovací pozice držáku K-zkumavek.
5. Připravte pracovní MMX dle následujícího návodu:

Na 24 testů přidejte 191 µl CTM Mn²⁺ do jedné lahvičky s HBV MMX. Lahvičku zavřete a dobře promíchejte převrácením 10x. Víření k promísení pracovního MMX nepoužívejte. Pracovní MMX chraňte před světlem a spotřebujte do 2 hodin.

Na 12 testů odeberte 660 µl HBV MMX a umístěte do zkumavky o objemu 2 ml. Přidejte 90 µl CTM Mn²⁺ do zkumavky o objemu 2 ml obsahující HBV MMX, zkumavku zavíčkujte a dobře promíchejte otočením 10x. Pracovní MMX chraňte před světlem a spotřebujte do 2 hodin. Uskladněte zbývající nepoužitý HBV MMX a CTM Mn²⁺ v originálních lahvičkách při teplotě 2–8 °C. Po otevření jsou HBV MMX a CTM Mn²⁺ stabilní po dobu 30 dnů při teplotě 2–8 °C nebo do uplynutí doby použitelnosti, dle toho, která je kratší.

POZN.: Objem CTM Mn²⁺ je specifický pro test COBAS® TaqMan® HBV.

6. Odpičetujte 50 µl pracovního MMX do každé K-zkumavky nebo jamky K-zásobníku.

POZN.: Pokud byly zpracované vzorky a kontroly před amplifikací uloženy ve zmrazeném stavu, nechte je před krokem 7 nejprve za pokojové teploty rozmrazit.

7. Z každého zpracovaného vzorku a kontroly odměřte 50 µl do příslušné K-zkumavky nebo jamek K-zásobníku obsahující pracovní MMX; použijte k tomu mikropipetor se špičkou s aerosolovou bariérou nebo s pozitivním posuvem. Jemně promíchejte každý vzorek nebo kontrolu nahoru a dolů třikrát pomocí mikropipetoru, který nevytváří bubliny.
8. Opakujte krok 7 pro každý zpracovaný vzorek a kontrolu, dokud nebude vše přeneseno do K-zkumavek nebo jamek K-zásobníku. Pro každý vzorek a kontrolu použijte novou špičku. Proveďte vizuální kontrolu přítomnosti bublinek a dle potřeby je odstraňte. Uzavřete K-zkumavky nebo K-zásobník pomocí zařízení pro manipulaci s víčky K-zkumavek/K-zásobníků. Vizuálně si ověřte, že byly přidány odpovídající objemy.
9. S amplifikací je třeba začít do 3 hodin od okamžiku, kdy byly zpracované vzorky a kontroly odměřeny do K-zkumavek/K-zásobníku s obsahem pracovního MMX.

D. Plnění a provoz analyzátoru COBAS® TaqMan® 48

1. Zapněte počítač pracovní stanice a přihlaste se k Windows XP za použití odpovídajícího uživatelského jména a hesla.
2. Zapněte analyzátor COBAS® TaqMan® 48. Ověřte, zda se přístroj inicializuje a je připraven pro použití. Jsou-li K-nosiče nebo nosiče K-zásobníků z předchozích měření nadále umístěny v některém z termocyklerů, odstraňte je pomocí přemísťovače K-nosičů.
3. Spusťte software AMPLILINK na počítači. Přihlaste se pomocí odpovídajícího uživatelského jména a hesla.
4. Pro vytvoření příkazů pro K-nosiče nebo nosiče K-zásobníku pro analyzované vzorky klikněte na ikonu **Orders**. Vyberte záložku **Sample**, pak klikněte na tlačítko **New** a zadejte číslo objednávky pro vzorek pomocí klávesnice nebo snímače čárového kódu. Zvolte Definici testu pro test COBAS® TaqMan® HBV. Opakujte pro každý vzorek. Klikněte myší na tlačítko **Save**.

POZN.: Má-li být zpracováno méně než 24 zkumavek, musí být obsazeny pozice 1, 2, 5, 20, 23 a 24 pro vyvážení K-nosiče v termocykleru.

5. Zadejte informace o kontrole kvality výběrem tlačítka **Quality Control** v okně **Orders**. Klikněte na tlačítko **New** a pomocí klávesnice nebo snímače čárového kódu zadejte informaci z **karty hodnot kontrol testu COBAS® TaqMan® HBV** dodávané se soupravou. Zadejte číslo šarže testu COBAS® TaqMan® HBV, datum expirace, rozmezí Low (+) a High (+) kontroly a také kalibrační koeficienty specifické pro šarži v navržených prostorech. Klikněte na **OK**.
6. Přiřadte číslo K-nosiče/K-zásobníku k danému cyklu kliknutím na záložku **K-Carrier** v okně **Orders**. V okně **K-Carrier** klikněte na **New**. V buňce vpravo od **K-Carrier ID** zadejte číslo K-nosiče/K-zásobníku z čárového kódu na K-nosiči/K-zásobníku pomocí klávesnice nebo snímače čárového kódu. Jestliže používáte K-zásobník, zaškrtněte zaškrtačkové políčko **K-Tray** v části **K-Carrier ID**. Vyberte definici testu pro test COBAS® TaqMan® HBV z panelu testů v dolní části okna.

POZN.: Výsledky z předchozího měření se stejným ID K-nosiče musí být akceptovány.

7. V listu **Worklist** vyberte první řadu ve sloupci Type (T). Označte toto pole, abyste se dostali do rozbalovací nabídky a pak vyberte požadovaný typ kontroly. Pak klikněte dvakrát na pole ID vzorku pro stejnou řadu. Okno **LookUp Control** bude zobrazeno se všemi dostupnými kontrolami. Jakmile je kontrola vybrána, odpovídající kalibrační a kontrolní hodnoty budou zobrazeny v dolním pravém informačním panelu. Opakujte tento proces pro všechny požadované kontroly.
8. Pro zadání vzorků do **Worklist** klikněte dvakrát na první pozici (řadu) pro zadání vzorku. Tím se zobrazí okno **Lookup Sample** obsahující přiřazené objednávky pro vzorek. Použijte klávesy **Shift + Arrow** pro označení více než jednoho čísla objednávky. Zkontrolujte, zda definici testu COBAS® TaqMan® HBV byly přiřazeny všechny příkazy.
9. Klikněte na **Save** pro uložení přiřazení příkazu K-nosiče/nosiče K-zásobníku.

POZN.: Má-li být v cyklu zpracováno méně než 24 zkumavek, musí být obsazeny pozice 1, 2, 5, 20, 23 a 24 pro vyvážení K-nosiče v termocykleru. Při použití K-zásobníku není nutné vyvažovat termocykler.

E. Amplifikace a detekce

1. Vyberte ikonu **Systems** na záložce **System** a kliknutím na **Open** otevřete termocykler. Jakmile se kryt termocykleru zcela otevře a objeví se nápis **Ready to Load** v okně **Systems**, zvedněte a přidržte víko termocykleru otevřené. Pomocí přemísťovače K-nosiče/přemísťovače nosiče K-zásobníku přemístěte naplněný K-nosič/nosič K-zásobníku obsahující uzavřené K-zkumavky/K-zásobník s pracovním Master Mixem, vzorky a kontrolami do termocykleru. Zavřete víko termocykleru.
2. Klikněte na **Start** v okně **Systems** pod ikonou TC pro uzavření krytu termocykleru a spusťte běh analýzy.
3. Amplifikaci a detekci provádí analyzátor COBAS® TaqMan® 48 automaticky.

VÝSLEDKY

POZN.: Pokyny k tisku výsledků a k interpretaci příznaků a poznámek naleznete v provozní příručce k analyzátoru COBAS® TaqMan® 48.

Kalkulace výsledku

Analyzátor COBAS® TaqMan® 48 automaticky stanovuje titr HBV DNA ve vzorcích a kontrolách. **Titř HBV DNA je vyjádřen v mezinárodních jednotkách (IU)/ml.** Konverzní faktor mezi HBV kopiemi/ml a HBV mezinárodních jednotek/ml je 5,82 kopií/IU použitím WHO HBV mezinárodního standardu pro NAT testování 97/746²⁹.

Analyzátor COBAS® TaqMan® 48:

- Stanovuje prahovou hodnotu cyklu (Ct) pro HBV DNA a kvantifikační standard HBV DNA.
- Stanovuje titr HBV DNA na základě hodnot Ct pro HBV DNA a kvantifikační standard HBV DNA a kalibračních koeficientech specifických pro danou šarži.
- Určuje, že vypočtená hodnota titru v IU/ml pro HBV L(+)C a HBV H(+)C spadá do vymezeného rozmezí.

Validace běhu – AMPLILINK, verze 3.2

Zkontrolujte výsledkové okno AMPLILINK nebo výtisk na přítomnost příznaků a komentářů, abyste se ujistili, že je běh měření platný.

Běh je platný, pokud se neobjeví žádné příznaky pro kontroly COBAS® TaqMan® HBV.

Běh není platný, pokud se u kontrol COBAS® TaqMan® HBV objeví některý z následujících příznaků:

Negativní kontrola:

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

HBV Nízce pozitivní kontrola:

Příznak	Výsledek	Interpretace
__L_LPCINVALID	< 6.00E+00 IU/mL	Kontrola pod rozsahem testu
	Target Not Detected	Kontrola pod rozsahem testu
	Numerický titr, X.XXE+XX IU/mL	Kontrola mimo rozsah testu
	> 1.10E+08 IU/mL	Kontrola nad rozsahem testu
	Invalid	Neplatný výsledek

HBV Vysoce pozitivní kontrola:

Příznak	Výsledek	Interpretace
__H_HPCINVALID	< 6.00E+00 IU/mL	Kontrola pod rozsahem testu
	Target Not Detected	Kontrola pod rozsahem testu
	Numerický titr, X.XXE+XX IU/mL	Kontrola mimo rozsah testu
	> 1.10E+08 IU/mL	Kontrola nad rozsahem testu
	Invalid	Neplatný výsledek

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

Validace běhu – AMPLILINK, verze 3.3

Zkontrolujte výsledkové okno AMPLILINK nebo výtisk na přítomnost příznaků a komentářů, abyste se ujistili, že je běh měření platný.

Běh je platný, pokud se neobjeví žádné příznaky pro kontroly COBAS® TaqMan® HBV.

Běh není platný, pokud se u kontrol COBAS® TaqMan® HBV objeví některé z následujících příznaků:

Negativní kontrola:

Příznak	Výsledek	Interpretace
NC_INVALID	Invalid	Neplatný výsledek nebo "platný" výsledek, který nebyl negativní pro cílový HBV

HBV Nízce pozitivní kontrola:

Příznak	Výsledek	Interpretace
LPC_INVALID	Invalid	Neplatný výsledek nebo kontrola mimo rozsah

HBV Vysoce pozitivní kontrola:

Příznak	Výsledek	Interpretace
HPC_INVALID	Invalid	Neplatný výsledek nebo kontrola mimo rozsah

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

Interpretace výsledků:

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

⇒ Platný běh může zahrnovat platné i neplatné výsledky vzorků podle toho, zda se u jednotlivých vzorků objeví záložky resp. komentáře nebo ne.

Výsledky vzorků jsou interpretovány následujícím způsobem:

Výsledek titru	Interpretace
Target Not Detected	Ct hodnota pro HBV je nad hranicí testu nebo nebyla žádná Ct hodnota pro HBV získána. Výsledky nahlaste jako „HBV DNA nedetekována“.
< 6.00E+00 IU/mL	Vypočtená hodnota IU/ml je pod detekční hranicí testu. Výsledky uvádějte jako „HBV DNA detekována, méně než 6 HBV DNA IU/mL“.
≥ 6.00E+00 IU/mL a < 2.90E+01 IU/mL	Vypočítané výsledky v IU/ml jsou pod dolní hranicí lineárního rozmezí testu. Tyto výsledky mají velký stupeň variability, a proto nemohou být považovány za přesné. Tyto výsledky by měly být interpretovány s opatrností.
≥ 2.90E+01 IU/mL a ≤ 1.10E+08 IU/mL	Vypočítané výsledky větší než nebo rovny 29 IU/ml a menší než nebo rovny 1,10E+08 IU/ml jsou v lineárním rozmezí analýzy.
> 1.10E+08 IU/mL	Vypočtená hodnota IU/ml leží nad rozsahem testu. Výsledky uvádějte jako "vyšší než 1,10E+08 HBV DNA IU/ml". Jsou-li žádané kvantitativní výsledky, měl by být originální vzorek rozředěn HBV-negativní lidskou plazmou nebo sérem v závislosti na matrix originálního vzorku a test by měl být zopakován. Vynásobte uvedený výsledek dilučním faktorem.

POZN.: Vzorky nad rozsahem testu, které vykazují neplatný výsledek s příznakem „QS_INVALID“, nesmí být vykázány jako > 1,10E+08 IU/mL. Jsou-li žádané kvantitativní výsledky, měl by být originální vzorek rozředěn HBV-negativní lidskou plazmou nebo sérem v závislosti na matrix originálního vzorku a test by měl být zopakován. Vynásobte uvedený výsledek dilučním faktorem.

KONTROLA KVALITY

Jeden replikát každé COBAS® TaqMan® negativní kontroly, COBAS® TaqMan® HBV Low (+) kontroly a COBAS® TaqMan® HBV High (+) kontroly musí být zahrnut do každého běhu testu až 24 vzorků a kontrol. 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 doby, než dokáží test provádět s vysokou jistotou správně. Neexistují požadavky týkající se pozice kontrol na K-nosiči/K-zásobníku. Projděte si, co přístroj vytiskl, a na příznacích a poznámkách si ověřte, že je měření platné.

Negativní kontrola

CTM (-) C musí vést k výsledku "**Target Not Detected**", tzn. Ct hodnota pro HBV DNA byla nad hranici analýzy nebo žádná Ct hodnota pro HBV DNA nebyla získána, ale platná Ct hodnota byla získána pro kvantifikační standard HBV DNA. Jestliže **CTM (-) C** toto kritérium nespĺňuje, je celé měření neplatné. Celý postup zopakujte (příprava vzorků a kontrol, amplifikace a detekce). Je-li **CTM (-) C** trvale neplatná, kontaktujte vaši místní kancelář Roche pro technickou pomoc.

Pozitivní kontroly

Přiřazené rozmezí pro **HBV L(+)**C a **HBV H(+)**C je specifické pro každou šarži kontroly a je dodáváno na kartě *COBAS® TaqMan® HBV Test Controls Value Card* se soupravou. Tato rozmezí jsou zadána do Data Station softwaru AMPLILINK.

Množství HBV DNA v IU/ml pro **HBV L(+)**C a **HBV H(+)**C musí spadat do rozmezí uvedeného na kartě *COBAS® TaqMan® HBV Test Controls Value Card* dodávaného se soupravou. Jestliže jedna nebo obě pozitivní kontroly nespĺňují toto kritérium, je celé měření neplatné. Celý postup zopakujte (příprava vzorků a kontrol, amplifikace a detekce). Jestliže vypočtený titer HBV DNA pro jednu nebo obě pozitivní kontroly je trvale mimo přiřazené rozmezí, obraťte se o technickou pomoc na místní zastoupení firmy Roche.

BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ PŘI PRÁCI

1. Jak je tomu při každém testovacím postupu, je pro správné fungování tohoto testu zásadním požadavkem dodržovat principy správné laboratorní praxe. Vzhledem k vysoké analytické senzitivitě tohoto testu je třeba věnovat mimořádnou péči tomu, aby se zachovala čistota činidel soupravy a amplifikačních směsí. U všech činidel je třeba čistotu bedlivě sledovat. Jakmile je podezření na znečištění, je třeba činidlo zlikvidovat.

PROCEDURÁLNÍ OMEZENÍ

1. Tento test je validován pro používání s lidským sérem nebo plazmou odebranou do EDTA jako antikoagulantu. Pokud by byly testovány jiné typů vzorků, mohly by být výsledky nesprávné, falešně negativní nebo falešně pozitivní.
2. K získání spolehlivých výsledků je třeba dodržovat patřičné postupy odběru, transportu, skladování a zpracování vzorků.
3. Díky přítomnosti enzymu AmpErase v COBAS® TaqMan® HBV Master Mix 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 produktem by měli pracovat pouze pracovníci znalí technik PCR.
5. Tento produkt se může používat pouze ve spojení s analyzátozem COBAS® TaqMan® 48.
6. Detekce HBV DNA závisí na tom, kolik virových částic je ve vzorku přítomno, na což mají vliv metody odběru vzorku a status pacienta (např. věk, přítomnost symptomů a/ nebo stádium infekce).
7. I když vzácně, mutace ve vysoce konzervovaných oblastech virového genomu pokryté primery testu a/nebo sondou mohou vést k podhodnocení množství nebo selhání detekce viru.
8. Díky podstatným rozdílům mezi technologiemi se doporučuje, aby uživatelé před změnou technologie na jinou provedli korelační metodické studie ve vlastní laboratoři a kvantifikovali rozdíly mezi technologiemi.

RUŠIVÉ LÁTKY

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

V případě následujících sloučenin nebylo prokázáno, že interferují s kvantifikací HBV DNA tímto testem.

Inhibitory nukleotidové DNA polymerázy Adefovir dipivoxil Tenofovir disoproxil fumarát	Nukleozidové inhibitory reverzní transkriptázy a DNA polymerázy Lamivudin Zidovudin Zalcitabin Stavudin Abacavir
Inhibitory HIV proteázy Indinavir Ritonavir Nelfinavir Saquinavir Amprenavir Lopinavir/Ritonavir	Nenukleotidové inhibitory HIV reverzní transkriptázy Nevirapin Efavirenz
Imunomodulátory Interferon alfa-2a Interferon alfa-2b	Inhibitory HIV fúze Enfuvirtid
Sloučeniny pro léčbu CMV Gancyklovir Valganciclovir hydrochlorid Acyklovir Valacyclovir hydrochlorid	

VYHODNOCENÍ LABORATORNÍCH VÝSLEDKŮ

Popis studie

Mez detekce testu COBAS® TaqMan® HBV byla stanovena analýzou sérií ředění klinických vzorků HBV (genotyp A a D) v HBV-negativní lidské EDTA plazmě a séru. Přesnost a linearita testu COBAS® TaqMan® HBV byla stanovena analýzou série ředění klinických HBV vzorků (genotyp A a D) pouze v HBV-negativní lidské EDTA plazmě. Koncentrace HBV v klinických vzorcích uvedená v kopiích/ml byla stanovena testem COBAS® AMPLICOR® HBV MONITOR pro ředění v rozmezí tohoto testu a pak vynásobena dilučním faktorem. Koncentrace ředění byla převedena na IU/ml použitím konverzního faktoru mezi WHO mezinárodními jednotkami HBV DNA/ml a kopiemi/ml stanovenými pomocí testu COBAS® AMPLICOR® HBV MONITOR a testu COBAS® TaqMan® HBV.

A. Mez detekce

Studie popsané níže ukazují, že test COBAS® TaqMan® HBV může detekovat HBV DNA v EDTA plazmě a séru při koncentracích minimálně 5,9 IU/ml s mírou pozitivity větší než 95%. Koncentrace HBV DNA v EDTA plazmě a séru, která může být detekována s mírou pozitivity vyšší než 95% stanovené analýzou Probit je 4,8 IU/ml, resp. 6,7 IU/ml.

Tabulka 1
Mez detekce v EDTA plazmě testu COBAS® TaqMan® HBV

Nominální vstup (HBV DNA IU/ml)	Počet replikátů	Počet pozitivních	Míra pozitivity
12,9	120	120	100%
8,6	120	118	98%
6,0	120	119	99%
3,4	120	105	88%
1,7	120	99	83%
0,9	120	67	56%
0,4	120	57	48%
Probit 95% úspěšnost detekce	4,8 IU/ml [95% meze spolehlivosti 3,1 -9,9 IU/ml]		

Tabulka 2
Mez detekce v séru testu COBAS® TaqMan® HBV

Nominální vstup (HBV DNA IU/ml)	Počet replikátů	Počet pozitivních	Míra pozitivity
12,9	120	120	100%
8,6	117	110	94%
6,0	114	111	97%
3,4	120	103	86%
1,7	114	73	64%
0,9	120	47	39%
0,4	120	28	23%
Probit 95% úspěšnost detekce	6,7 IU/ml [95% meze spolehlivosti 4,7 - 11,1 IU/ml]		

B. Přesnost

Přesnost v rámci testu, mezi testy a celková přesnost byly hodnoceny v souladu s metodami definovanými v doporučených postupech CLSI EP5-A, "Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices"³³. Tento postup umožňuje stanovení přesnosti v rámci testu a celkové přesnosti provedením jedné vícedenní studie s více operátory. Denně po dobu 15 dnů bylo prováděno měření zahrnující 3 identicky opakované analýzy (replikáty) každého vzorku. Každý vzorek prošel celou procedurou testu COBAS® TaqMan® HBV, zahrnující přípravu vzorku, amplifikaci a detekci. Zde uváděná přesnost tedy zahrnuje všechny aspekty testovacího postupu. Studie byla provedena pro tři šarže činidel testu COBAS® TaqMan® HBV a kombinované výsledky jsou uvedeny v tabulce 3 (HBV DNA IU/ml) a tabulce 4 (HBV DNA log₁₀ IU/ml).

Tabulka 3
Přesnost testu COBAS® TaqMan® HBV (v IU/ml)

Vzorek	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Průměrný HBV DNA Titr (IU/ml)	1,07E8	5,33E7	1,04E7	8,52E5	9,28E4	1,21E4	1200	111	49	14
CV v rámci testu	19%	10%	12%	7%	14%	16%	14%	22%	27%	50%
CV mezi běhy testu	11%	14%	12%	14%	16%	18%	18%	26%	17%	22%
Celkový CV	23%	17%	17%	16%	22%	24%	22%	34%	32%	54%
Celkový počet Replikáty	132	134	134	135	135	134	135	135	135	135

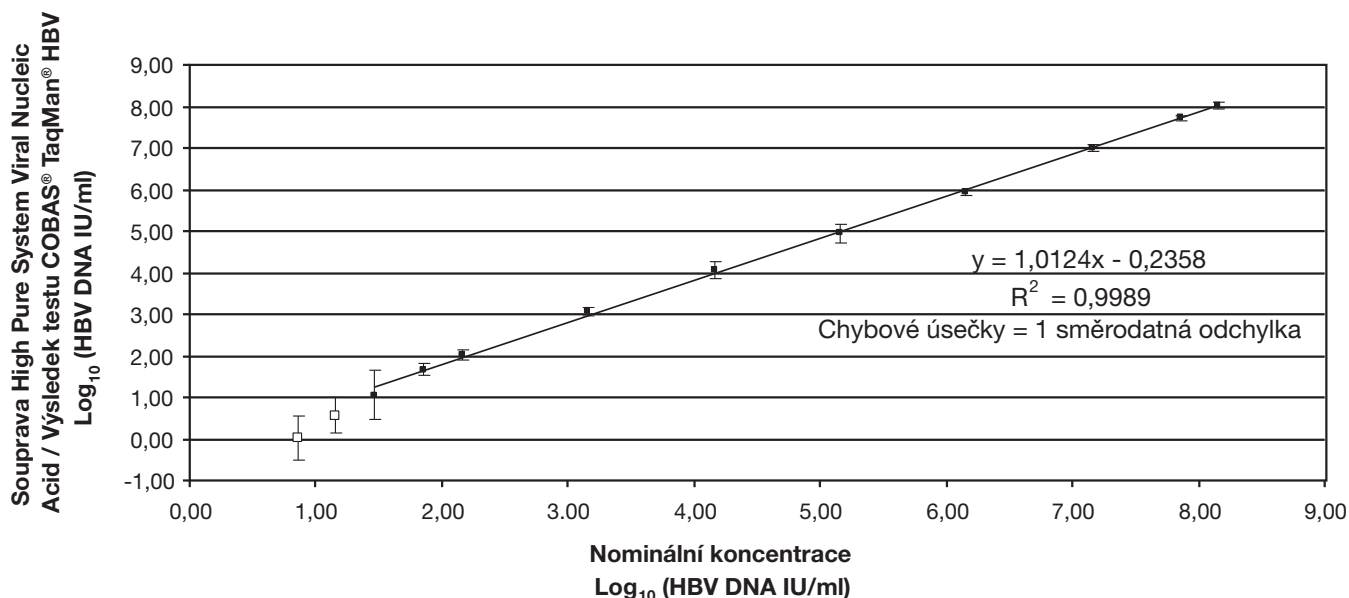
Tabulka 4
Přesnost testu COBAS® TaqMan® HBV (v log₁₀ IU/ml)

Vzorek	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Průměrný HBV DNA titr (Log ₁₀ IU/ml)	8,02	7,72	7,01	5,92	4,94	4,06	3,07	2,03	1,67	1,05
Směrodatná odchylka v rámci testu	0,07	0,04	0,05	0,03	0,21	0,18	0,06	0,09	0,11	0,59
Směrodatná odchylka mezi běhy	0,05	0,06	0,05	0,06	0,07	0,07	0,08	0,10	0,07	0,00
Celková směrodatná odchylka	0,08	0,07	0,07	0,07	0,22	0,19	0,10	0,13	0,13	0,59

C. Lineární rozmezí

Jak ukazuje obrázek 8, bylo zjištěno, že test COBAS® TaqMan® HBV dává lineární odpověď od 29 (Log₁₀ = 1,46) HBV DNA IU/ml do minimálně 1,10E8 (Log₁₀ = 8,02) HBV DNA IU/ml. Studie bylo provedena za použití tří šarží činidel testu COBAS® TaqMan® HBV se 131–135 replikáty na jednu úroveň.

Obrázek 8
Linearita testu COBAS® TaqMan® HBV



D. Inkluzivita

Pro HBV bylo navrženo sedm kategorií genotypu na základě divergence nukleotidů v rámci genomu větší než 8%^{34,35}. Tyto genotypy jsou označeny velkými písmeny abecedy od A do G. Genotypy HBV mají charakteristickou geografickou distribuci³⁶.

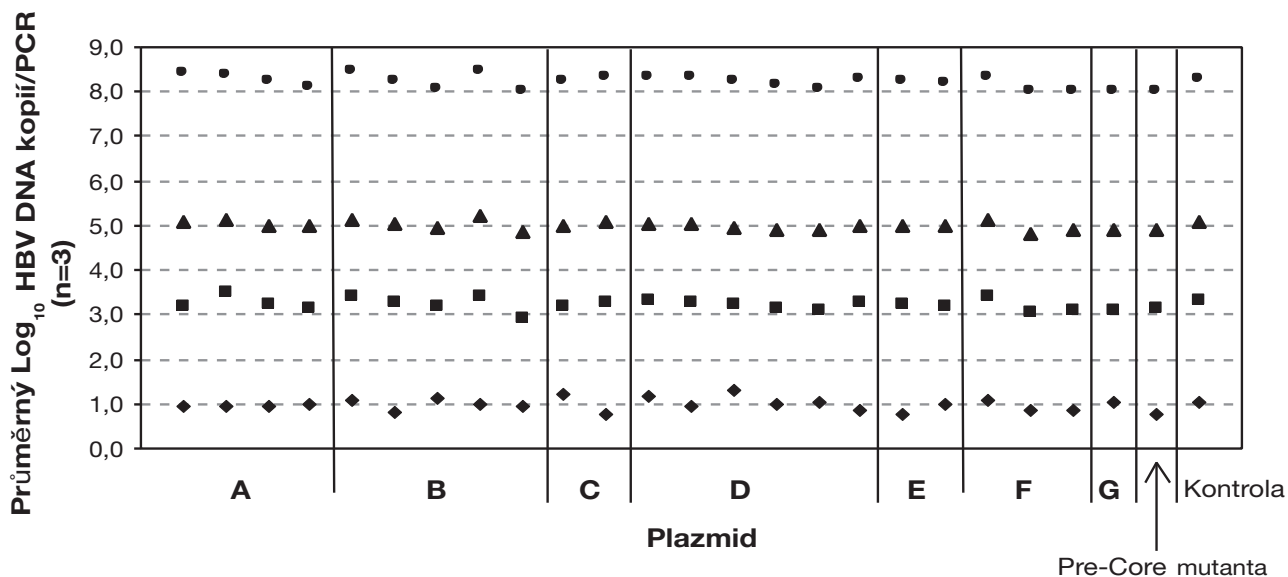
Výkonnost testu COBAS® TaqMan® HBV na HBV genotypy byla hodnocena analýzou 22 purifikovaných, linearizovaných a kvantifikovaných plazmidových DNA obsahujících reprezentativní sekvenční z HBV genotypů A až G (viz tabulka 5). Dále pak byl testován plazmid představující běžnou pre-Core mutaci G:A u nukleotidové pozice 1896. Každá plazmidová DNA byla ředěna na koncentraci 15, 1500, 1,5E5 a 1,5E8 kopií/PCR. Každé ředění bylo koamplifikováno s kvantifikačním standardem (QS) DNA a analyzováno trojitě pomocí testu COBAS® TaqMan® HBV. Titry pro všechny plazmidy byly srovnány s titry kontrolních plazmidových DNA (pc).

Test COBAS® TaqMan® HBV dal ekvivalentní výsledky pro všech 23 plazmidových DNA (viz obrázek 9); čísla kopie pro všechny genotypy a pre-Core mutace byly v dobrém vzájemném souladu a v souladu s kontrolní plazmidovou DNA.

Tabulka 5
Test COBAS® TaqMan® HBV
Testování inkluzivity - Testovaná typovaná plazmidová DNA

Označení plazmidu	Genotyp	Původ mateřského vzorku
p8423-c1	A	Indie
p1115-c1	A	Burundi
p3952-c1	A	Kamerun
p4199-c2	A	Norsko
p1764-c1	B	Čína
p1767-c1	B	Čína
p3958-c1	B	Východní Asie
p830-c1	B	Společenské ostrovy
p3982-c1	B	Vietnam
p1786-c1	C	Čína
p11549-1	C	Bangladéš
p3872-c1	D	Irán
p1103-c1	D	Tunis
p3953-c2	D	Severní Afrika
p18-c1	D	Švédsko
p30893-5	D	Švédsko
p4244-c1	D	Dánsko
p3217-c1	E	Senegal
p3963-c2	E	Nigérie
p9203-c1	F	Kolumbie
p479-c1	F	Venezuela
p1009-c1	F	Španělsko
p00042975-4	G	Spojené státy americké
pIT1896	Pre-Core	Itálie

Obrázek 9
Výkonnost testu COBAS® TaqMan® HBV na
HBV genotypch A až G a Pre-Core mutantu



E. Klinická specifická

Klinická specifická testu COBAS® TaqMan® HBV byla stanovena analýzou HBV-negativního séra a plazmy s EDTA od dárců krve. Bylo testováno celkové množství 220 vzorků (110 vzorků EDTA plazmy a 110 vzorků séra) které nereagovaly na HBsAg a anti-HBc. Všechny vzorky byly negativní pro HBV DNA. Z těchto výsledků vyplývá klinická specifická testu COBAS® TaqMan® HBV ve výši 100%.

F. Analytická specifická

Analytická specifická testu COBAS® TaqMan® HBV byla hodnocena přidáním kultivovaného viru do HBV-negativní lidské EDTA plazmy nebo analýzou vzorků od infikovaných pacientů (uvedeno v tabulce 6). Žádný z testovaných non-HBV DNA nebo RNA virů nebyl pozitivní na HBV DNA.

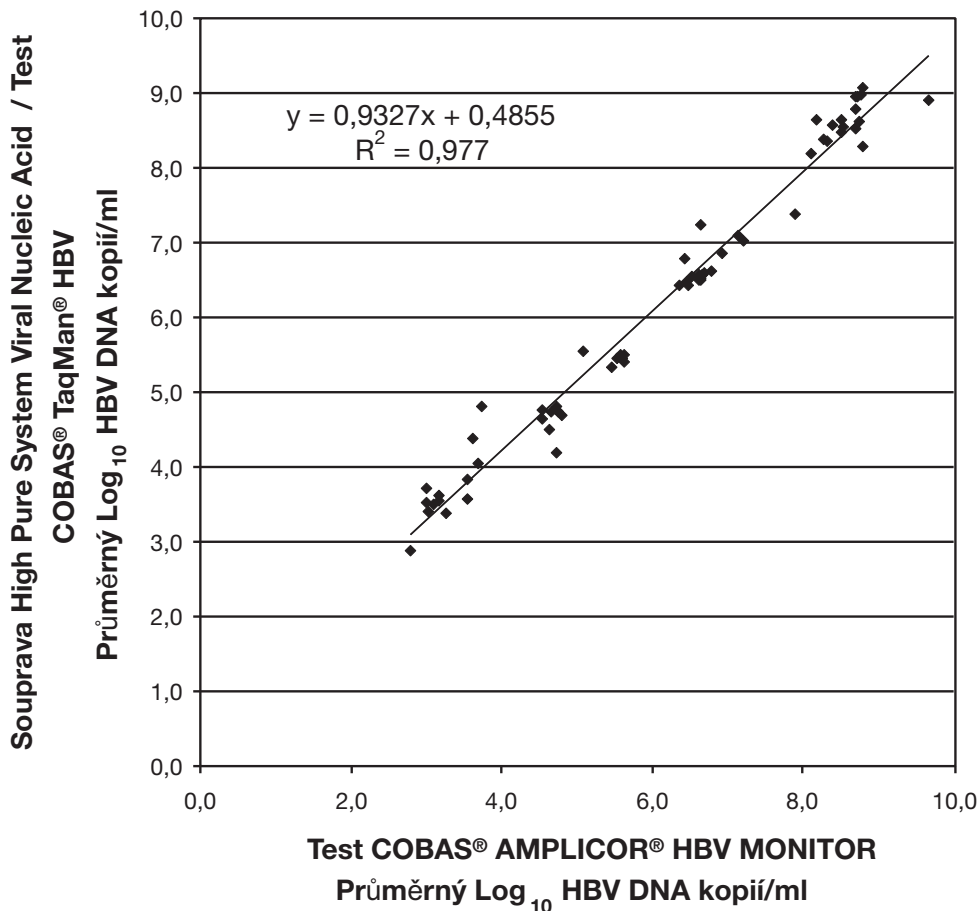
Tabulka 6
Analytická specifická vzorků

Virus přidán do plazmy	Vzorky z infikovaných pacientů (n)
Adenovirus typ 7	Pacienti infikovaní cytomegalovirem (2)
Cytomegalovirus AD-169	Pacienti infikovaní virem Epstein-Barr (2)
Epstein-Barrové virus (RAJI buňky Burkittova lymfomu)	Pacienti infikovaní virem hepatitis A (2)
Hepatitis A virus PA 21	Pacienti infikovaní virem hepatitis C genotypu 4 (1)
Herpes simplex typ 1, MacIntyre	Pacienti infikovaní virem hepatitis C genotypu 6a (1)
Herpes simplex typ 2, MS	Pacienti infikovaní virem HIV-1 (2)
HTLV-1 buňky	
Virus A chřipky A/Hong Kong/8/68	
Virus B chřipky B/R75	
Varicella-zoster Ellen	
Virus Západního Nilu	

G. Výkonnost ve srovnání s testem COBAS® AMPLICOR® HBV MONITOR

Výkonnost testu COBAS® TaqMan® HBV a testu COBAS® AMPLICOR® HBV MONITOR byla srovnána analýzou vzorků séra a plazmy od HBV infikovaných pacientů. Vzorky byly získány od Teragenix (Fort Lauderdale, FL) a Serologicals Corporation (Norcross, GA). Celkově bylo analyzováno 65 vzorků duplikátně v obou testech a byly srovnávány průměrné výsledky. Vzorky dávající výsledky nad lineárním rozsahem testu byly ředěny před analýzou a výsledky byly násobeny dilučním faktorem pro získání titru původního vzorku. Tity v IU/ml získané testem COBAS® TaqMan® HBV byly převedeny na kopie/ml vynásobením konverzním faktorem 5,82 HBV DNA kopií/IU. Lineární regresní analýza byla provedena u těch vzorků, které obsahovaly minimálně 500 kopií/ml v obou testech. Výsledky získané pomocí testu COBAS® TaqMan® HBV a testu COBAS® AMPLICOR® HBV MONITOR měly vysokou korelaci, jak ukazuje obrázek 10.

Obrázek 10
Korelace testu COBAS® TaqMan® HBV
a testu COBAS® AMPLICOR® HBV MONITOR u vzorků plazmy a séra
od pacientů infikovaných HBV



LITERATURA

1. Lee, W. 1997. Hepatitis B Virus Infection. *New England Journal of Medicine*. **337**:1733-1745.
2. Beasley, R.P. 1988. Hepatitis B virus - the major etiology of hepatocellular carcinoma. *Cancer*. **61**:1942-1956.
3. 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.
4. Zuckerman, A.J. and Lavanchy, D. 1999. Treatment options for chronic hepatitis: antivirals look promising. *British Medical Journal*. **319**:799-800.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. Hoofnagle, J.H. 1990. Alfa-interferon therapy of chronic hepatitis B. Current status and recommendations. *Hepatology*. **11**:S100-S107.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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.

23. 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.
24. 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.
25. Puchhammer-Stöckl, E., Mandl, C.W., Kletzmayer, 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.
26. 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.
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. Richmond, J.Y. and McKinney, R.W. eds. 1999. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. HHS Publication Number (CDC) 93-8395.
31. 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.
32. International Air Transport Association. Dangerous Goods Regulations, 41.st Edition. 2000. 704 pp.
33. CLSI. Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices; Approved Guidelines. CLSI Document EP5-A Wayne, PA:CLSI, 1999.
34. Okamoto, H., Tsuda, F., Sakugawa, H., Sastrosowigno, R.I., Imai, M., Miyakawa, Y. and Mayumi, M. 1988. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *Journal of General Virology* **69**:2575-2583.
35. Norder, H., Hammas, B., Löfdahl, S., Couroucé, A.M. and Magnius, L.O. 1992. Comparison of the amino acid sequences of hepatitis B surface antigen and genomic classification of the corresponding hepatitis B virus strains. *Journal of General Virology* **73**:1201-1208.
36. Norder, H., Hammas, B., Lee, S.-D., Bile, K., Couroucé, A.M., Mushahwar, I.K. and Magnius, L.O. 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 2/2011	<p>Části ČINIDLA, PŘÍPRAVA VZORKU A KONTROLY a PŘÍPRAVA ČINIDEL byly aktualizovány odstraněním odkazu na použití svorek.</p> <p>Části PŘÍPRAVA VZORKU A KONTROLY a PŘÍPRAVA ČINIDEL byly aktualizovány zařazením podrobných pokynů pro uzavření a otevření soustavy lytického stojanu a soustavy stojanu filtrační zkumavky.</p> <p>Části POTŘEBNÝ MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ DODÁVKY, PŘÍPRAVA VZORKU A KONTROLY, PŘÍPRAVA ČINIDEL, PLNĚNÍ A PROVOZ ANALYZÁTORU COBAS® TAQMAN® 48, AMPLIFIKACE A DETEKCE a KONTROLA KVALITY byly aktualizovány zařazením čísel dílů K-zásobníku a nosiče K-zásobníku a zařazením návodu k použití.</p> <p>Pokud máte jakékoliv dotazy, kontaktujte prosím místního zástupce společnosti Roche.</p>
Doc Rev. 6.0 3/2010	<p>Část ČINIDLA: Přidáno varování pro 0,1% konzervant ProClin 300.</p> <p>Pokud máte jakékoliv dotazy, kontaktujte prosím místního zástupce společnosti Roche.</p>



Souprava High Pure System Viral Nucleic Acid vyrobená pro:
Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ 08876 USA
Člen Roche Group



Test COBAS® TaqMan® HBV vyrobený:
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
Jaguarié, Building 10
05321-010 São Paulo, SP Brazil

ROCHE, AMPLICOR, AMPERASE, AMPLILINK, TAQMAN, COBAS a HIGH PURE jsou obchodní známky společnosti Roche.

PROCLIN je registrovaná obchodní známka společnosti Rohm and Haas Company.

MICROSOFT a WINDOWS XP jsou obchodní známky společnosti Microsoft Corporation ve Spojených státech.

BD SST je obchodní známka společnosti Becton Dickinson and Company.

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

2/2011
Doc Rev. 7.0

(03584933001-08ENGL)
04958594041-06



Roche Diagnostics GmbH
D-68298 Mannheim



0088