

**COBAS AMPLICOR™ Hepatitis C Virus Test,
version 2.0**

HCV

PRO DIAGNOSTICKÉ POUŽITÍ *IN VITRO*.

Objednací údaje	AMPLICOR® HCV Specimen Preparation Kit, version 2.0	HCV PREP	96 Tests	P/N: 21111086 123 ART: 11 1108 6 US: 83126
	AMPLICOR HCV Controls Kit, version 2.0	HCV CTL	8 Sets	P/N: 21111175 123 ART: 11 1117 5 US: 83131
	AMPLICOR HCV Amplification Kit, version 2.0	HCV AMP	96 Tests	P/N: 21111094 123 ART: 11 1109 4 US: 83127
	COBAS AMPLICOR HCV Detection Kit, version 2.0	HCV DK	100 Tests	P/N: 21111132 123 ART: 11 1113 2 US: 83130
	COBAS AMPLICOR Detection Reagents Kit	DK	100 Tests	P/N: 20757470 122 ART: 07 5747 0 US: 83276
	COBAS AMPLICOR Conjugate Detection Reagent	CN4	200 Tests	P/N: 20764213 123 ART: 07 6421 3 US: 83305
	COBAS AMPLICOR Wash Buffer	WB	500 Tests	P/N: 20759899 123 ART: 07 5989 9 US: 83314
	<i>Následující souprava se dá použít k detekci HCV Internal Control amplifikované pomocí amplifikační soupravy AMPLICOR HCV, version 2.0. Detekce HCV Internal Control je doporučovaná uživatelskou variantou.</i>			
	COBAS AMPLICOR Internal Control Detection Kit	IC	100 Tests	P/N: 20757608 122 ART: 07 5760 8 US: 83281

Účel

Test na virus hepatitidy C (HCV) COBAS AMPLICOR version 2.0 (v2.0) je kvalitativní test *in vitro* pro detekci RNA viru hepatitidy C v klinických vzorcích na analyzátoru COBAS AMPLICOR™. Přítomnost HCV RNA prokazuje současnou infekci virem HCV u pacientů s klinickými resp. biochemickými projevy jaterní choroby. Test vychází z reverzní transkripce této RNA za tvorby komplementární DNA (cDNA), amplifikace této cDNA polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) a hybridizace nukleové kyseliny k detekci HCV RNA v lidském séru nebo plazmě.

COBAS AMPLICOR HCV Test v2.0 není určen ke screeningovému vyšetřování krve nebo krevních derivátů na přítomnost viru hepatitidy C.

Souhrn a výklad testu

Předpokládá se, že virus hepatitidy C je hlavním etiologickým činitelem odpovědným za 90–95 % případů potransfuzní hepatitidy non-A a non-B^{1,2}. HCV je virus s jednořetězovou pozitivně orientovanou RNA s genomem obsahujícím zhruba 10 000 nukleotidů kódujících 3 000 aminokyselin¹. HCV se vyskytuje v krvi, a proto se může krví a krevními deriváty přenášet. Prevalence infekce virem HCV je vysoká u pacientů, kteří jsou příjemci transplantovaných orgánů, krevní transfuze nebo komerčních srážecích faktorů, u pacientů s perkutánní expozicí při nitrožilním zneužívání drog a u pacientů docházejících na ledvinovou dialýzu. Imunosérologicky zjištěná prevalence infekce virem HCV se pohybuje v rozmezí od 0,6 % v Kanadě do 1,8 % ve Spojených státech³.

Skutečnost, že se v organismu pacientů infikovaných virem HCV vyskytují proti němu protilátky, vedla k vývoji imunosérologických testů, které jsou pro tyto protilátky specifické^{4,5}. Zavedením těchto testů se již nyní snížil v celosvětovém měřítku výskyt potransfuzní hepatitidy. Existuje také doplňkové testování pomocí RIBA (rekombinantního imunoblotingu), kterým se dále vyhodnocují vzorky, jež jsou při testování na protilátky opakovaně reaktivní. Nedávno však proběhlo vyhodnocení, které ukázalo, že interpretace tohoto doplňkového testu závisí na pacientově rizikovém statusu. Například v nízkorizikové populaci dárců krve je testem na HCV RNA potvrzeno pouze 50 % vzorků reaktivních v testu RIBA^{6,7,8}. To znamená, že RIBA – pozitivní výsledek nepředstavuje skutečnou indikaci aktivní infekce virem HCV, protože vyléčení pacienti mohou zůstat anti-HCV pozitivní po řadu let⁵. Mimoto byly získány nejisté výsledky doplňkových testů jak u nedávno infikovaných osob, které se dosud nacházejí ve stadiu serokonverze, tak u osob infikovaných virem HCV chronicky^{9,10}.

Imunosérologické testování je mírou současné resp. předchozí expozice infekci virem HCV, nedokáže však mezi těmito dvěma skupinami rozlišit. Dále, v případech akutní infekce virem HCV se u některých osob nemusejí protilátky HCV vůbec vytvářet¹¹, takže se jejich současná infekce virem HCV nedá imunosérologicky diagnostikovat. Alternativně může doklady o stávající infekci poskytnout detekce HCV RNA pomocí testů na nukleovou kyselinu. Použitím testů na nukleovou kyselinu se dá viremie HCV detekovat ještě imunologickou serokonverzí^{12,13}. Jelikož je možno pomocí testů na nukleovou kyselinu detekovat HCV RNA přímo, tj. bez ohledu na pacientův imunologický status, jsou testy založené na nukleové kyselině velmi užitečné k detekci HCV RNA u imunologicky nejistých pacientů⁸.

Princip metody

Test na HCV COBAS AMPLICOR v2.0 sestává z pěti základních stupňů: příprava vzorku, reverzní transkripce příslušné RNA na komplementární DNA (cDNA)¹⁴; PCR amplifikace¹⁴ této cDNA pomocí HCV-specifických komplementárních primerů, hybridizace amplifikovaných produktů na specifické oligonukleotidové sondy a kolorimetrická detekce sondou vázaných amplifikovaných produktů.

Test COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0 umožňuje současnou reverzní transkripci a PCR amplifikaci RNA HCV a HCV Internal Control. Činidlo Master Mix obsahuje pár primerů specifických pro RNA jak HCV, tak HCV Internal Control. Detekce amplifikované DNA se provádí pomocí terčově specifických oligonukleotidových sond, jež umožňují nezávislou identifikaci amplikonu HCV a amplikonu HCV Internal Control.

Internal Control

U enzymatických amplifikačních procesů, jako je PCR, mohou inhibitory, které se někdy v klinickém vzorku nacházejí, snižovat účinnost amplifikace. Souprava COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0 byla doplněna o HCV Internal Control umožňující identifikovat zpracované vzorky, jež obsahují látky, které by mohly při PCR amplifikaci rušit. HCV Internal Control je RNA transkript s oblastmi vazby primeru identickými s těmi, jež jsou v terčové sekvenci HCV, randomizovanou interní sekvencí podobné délky a složení bází, jaké má terčová sekvence HCV, a s ojedinělou oblastí vazby sondy, kterou se HCV Internal Control odlišuje od terčového amplikonu. Tato charakteristika byla zvolena proto, aby se zajistila ekvivalentní amplifikace RNA HCV Internal Control a terčového HCV.

Příprava vzorku

HCV RNA se ze séra nebo plazmy izoluje lýzou virových částic pomocí chaotropního činidla a následným srážením RNA alkoholem. RNA se resuspenduje v ředidle vzorku. Do vzorku se spolu s činidlem (Lysis Reagent) zavádí RNA HCV Internal Control, která v každém jednotlivě zpracovávaném vzorku slouží jako kontrola extrakce, amplifikace a detekce.

Reverzní transkripce a PCR amplifikace

Volba terče

Volba terčové sekvence RNA pro HCV závisí na vytipování takových oblastí v genomu HCV, kde se mezi jednotlivými genotypy HCV sekvence v maximální míře zachovává^{15,16,17}. To znamená, že pro schopnost testu detekovat všechny genotypy má zásadní důležitost správná volba primerů i sondy (viz část „Hodnocení neklinických funkčních parametrů, Studie inkuzivity genotypů HCV“). Bylo zjištěno, že mezi známými genotypy HCV se sekvence RNA v nejvyšší míře zachovává v 5'-UTR (untranslated region) oblasti genomu HCV^{18,19}. V soupravě COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0 se k definování sekvence 244 nukleotidů ve vysoce konzervovaném 5'-UTR genomu HCV používají primery KY78 a KY80¹³. Sekvence sondy a sekvence primeru se nacházejí v nejlépe zachovaných doménách oblasti 5'-UTR¹⁸.

Reverzní transkripce

Reakce reverzní transkripce a amplifikace se provádí pomocí tepelně stálé DNA polymerázy rekombinantního enzymu *Thermus thermophilus* (*rTh* pol). Za přítomnosti dvojmocného manganu (Mn^{2+}) a za příznivých pufovacích podmínek vykazuje *rTh* pol aktivitu jak reverzní transkriptázy, tak DNA polymerázy¹⁴. Díky tomu může jak reverzní transkripce, tak PCR amplifikace probíhat v téže reakční směsi. Zpracovávané vzorky se přidávají do amplifikační směsi v amplifikačních zkumavkách (A-zkumavkách), v nichž probíhá jak reverzní transkripce, tak PCR amplifikace.

Downstream neboli antisense primer (KY78) je na 5' konci biotinylován; zatímco upstream čili sense primer (KY80) biotinylován není. Reakční směs se zahřeje, aby se downstream primer mohl napojit specificky na terčovou RNA HCV a na terčovou RNA HCV Internal Control. Za přítomnosti Mn^{2+} a nadbytku deoxynukleosid-trifosfátů (dNTPs), včetně trifosfátů deoxyadenosinu, deoxyguanosinu, deoxycytidinu a deoxyuridinu (namísto thymidinu) prodlužuje *rTth* pol napojený primer a vytváří řetězec DNA (cDNA) komplementární vůči terčové RNA.

Amplifikace terče

Po reverzní transkripci RNA HCV terče a HCV Internal Control se reakční směs zahřeje, aby se RNA:cDNA hybrid denaturoval a exponovaly se sekvence primerového terče. Během ochlazování směsi se upstream primer (KY80) připojuje specificky k řetězci cDNA, *rTth* pol primer prodlužuje a syntetizuje se druhý řetězec DNA. Tím se ukončuje první cyklus PCR, který poskytuje dvouřetězcovou DNA kopii terčové oblasti RNA HCV a HCV Internal Control. Reakční směs se opět zahřeje k oddělení výsledné dvouřetězcové DNA a exponování sekvencí primerového terče. Během ochlazování se primery KY78 a KY80 napojují na terčovou DNA. *rTth* pol za přítomnosti Mn^{2+} a nadbytku dNTPs prodlužuje napojené primery podél terčových templátů a vytváří molekulu dvouřetězcové DNA s 244 páry bází, která se nazývá ampikon. COBAS AMPLICOR Analyzer tento po stup automaticky opakuje ve stanoveném počtu cyklů, přičemž v každém cyklu se množství ampikonové DNA efektivně zdvojnásobuje. Požadovaný počet cyklů se na přístroji COBAS AMPLICOR Analyzer předem naprogramuje. Amplifikace probíhá pouze v oblasti genomu HCV mezi primery, celý genom amplifikován není.

Selektivní amplifikace

Selektivní amplifikace terčové nukleové kyseliny z klinického vzorku se u soupravy COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0 dosahuje použitím enzymu AmpErase® (uracil-N-glykosyláza) a deoxyuridintrifosfátu (dUTP). Enzym AmpErase rozpozná a katalyzuje rozklad řetězců DNA obsahujících deoxyuridin²⁰, ale nikoli DNA obsahující deoxythymidin. Deoxyuridin se v přirozené DNA nevyskytuje, je však vždy přítomen v ampikonu díky tomu, že se jako jeden z dNTP v činidle Master Mix místo thymidintrifosfátu používá deoxyuridintrifosfát; proto je deoxyuridin obsažen pouze v ampikonu.

V důsledku přítomnosti deoxyuridinu je kontaminující ampikon citlivý vůči destrukci enzymem AmpErase před amplifikací terčové DNA. AmpErase, který je součástí činidla Master Mix, katalyzuje štěpení DNA obsahující deoxyuridin na deoxyuridinových zbytcích otevřením deoxyribozového řetězce v poloze C1. Když je řetězec ampikonové DNA v prvním tepelně cyklizačním kroku při alkalickém pH činidla Master Mix zahříván, štěpí se v poloze deoxyuridinu, čímž se DNA stává neamplifikovatelnou. Enzym AmpErase je při teplotách nad 55°C, tedy během kroků tepelného cyklování, neaktivní, takže terčový ampikon nerozkládá. Po amplifikaci je případný zbytkový enzym denaturován přidávkou denaturačního roztoku, čímž se zamezí degradaci případného terčového ampikonu. Je prokázáno, že enzym AmpErase v soupravě COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0 inaktivuje minimálně 10³ kopií deoxyuridin-obsahujícího HCV ampikonu na jednu PCR.

Hybridizační reakce

Po PCR amplifikaci nadávkuje přístroj COBAS AMPLICOR Analyzer do A-zkumavek automaticky denaturační roztok, aby se HCV amplikon a HCV Internal Control amplikon chemicky denaturovaly a vytvořily jednořetězcovou DNA. Alikvotní podíly denaturovaného amplikon se pak převedou do detekčních kelímků (D-kelímky). Do jednotlivých D-kelímků se přidá suspenze magnetických částic potažených oligonukleotidovou sondou specifickou pro HCV (KY150) nebo HCV Internal Control (SK535). Na terčově specifické oligonukleotidové sondy navázané na magnetické částice jsou hybridizovány biotinem značené amplikony HCV a HCV Internal Control. Touto hybridizací amplikonu na terčově specifickou sondu se zvyšuje celková specifičnost testu.

Detekční reakce

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

Činidla

AMPLICOR HCV HCV PREP 96 testů P/N: 21111086 123
Specimen Preparation Kit, version 2.0 ART: 11 1108 6
 Souprava pro přípravu vzorků HCV AMPLICOR, verze 2.0 US: 83126

HCV LYS, v2.0 8 x 6,9 ml
 (Činidlo pro lýzu HCV, verze 2.0)

PufTris-HCl
 68% Guanidinthiokyanát
 3% Dithiothreitol
 < 1% Glykogen

Xn  68% (w/w) Guanidinthiokyanát

Zdraví škodlivý

HCV DIL, v2.0 8 x 4,8 ml
 (Ředidlo na vzorky HCV, verze 2.0)

PufTris-HCl
 < 0,005% Poly rA RNA (syntetická)
 EDTA
 0,05% azid sodný

HCV IC, v2.0 (Vnitřní kontrola HCV, verze 2.0)		8 x 0,1 ml
<p>< 0,001% neinfekční RNA transkribovaná <i>in vitro</i> (mikrobiální) obsahující sekvence vázající HCV primer specifickou sondu vázající oblast < 0,005% Poly rA RNA (syntetická) EDTA 0,05% azid sodný</p>		
AMPLICOR HCV Controls Kit, version 2.0 Souprava kontrol HCV AMPLICOR, verze 2.0	HCV CTL	8 Sets P/N: 2111175 123 ART: 11 1117 5 US: 83131
NHP [Negativní plazma (lidská)]		8 x 0,6 ml
<p>Lidská plazma nereaktivní, používaná při testech licencovaných US FDA na protilátky proti HCV, protilátky proti HIV-1/2, antigen HIV p24 a HBsAg; HIV-1 RNA, HCV RNA a HBV DNA detekovatelné metodami PCR 0,1% ProClin® 300</p>		
HCV (-) C, v2.0 [Kontrola HCV(-), verze 2.0]		8 x 0,1 ml
<p>< 0,005% Poly rA RNA (syntetická) EDTA 0,05% azid sodný</p>		
HCV (+) C, v2.0 [Kontrola HCV(+), verze 2.0]		8 x 0,1 ml
<p>< 0,001% neinfekční RNA transkribovaná <i>in vitro</i> (mikrobiální) obsahující sekvence HCV < 0,005% Poly rA RNA (syntetická) EDTA 0,05% azid sodný</p>		
AMPLICOR HCV Amplification Kit, version 2.0 Amplifikační souprava HCV AMPLICOR, verze 2.0	HCV AMP	96 testů P/N: 21111094 123 ART: 11 1109 4 US: 83127
HCV MMX, v2.0 (Master Mix HCV, verze 2.0)		8 x 0,7 ml
<p>Bicinový pufr 16% DMSO Glycerol < 0,01% <i>rTth</i> DNA polymeráza (<i>rTth</i> pol, mikrobiální) Octan draselný < 0,001% dATP, dCTP, dGTP, dUTP < 0,005% primery KY78 a KY80 (jeden je biotinylován) < 0,01% AmpErase® (uracil-N-glykosyláza) enzym (mikrobiální) 0,05% azid sodný</p>		

HCV Mn²⁺, v2.0 8 x 0,1 ml
(Manganatý roztok HCV, verze 2.0)

< 2% Mangan
Kyselina octová
Amarantové barvivo
0,05% azid sodný


COBAS AMPLICOR HCV DK 100 testů P/N: 2111132 123
HCV Detection Kit, version 2.0 ART: 11 1113 2
Souprava pro detekci HCV COBAS AMPLICOR, verze 2.0 US: 83130

CX PS1, v2.0 1 x 100 testů
(Suspenze sondy HCV 1, verze 2.0)

MES pufr
< 0,4% suspenze paramagnetických částic Dynabeads®
potažených HCV-specifickou oligonukleotidovou sondou (KY150)
0,09% azid sodný

CX4, v2.0 1 x 100 testů
(Suspenze sondy HCV 2, verze 2.0)

Pufr s fosforečnanem sodným
< 0,2% solubilizátor
42,2% thiokyanát sodný


Xn  42,2% hm. thiokyanát sodný

Zdraví škodlivý

COBAS AMPLICOR DK 100 testů P/N: 20757470 122
Detection Reagents Kit ART: 07 5747 0
Souprava detekčních činidel COBAS AMPLICOR US: 83276

DN4 1 x 100 testů
(Denaturační roztok)

1,6% hydroxid sodný
EDTA
Thymolová modř

Xi  1,6% hm. hydroxid sodný

Dráždivý

CN4 1 x 100 testů
(Konjugát avidinu s křenovou peroxidázou)

Pufr Tris-HCl
< 0,001% konjugát avidinu s křenovou peroxidázou
Bovinní serumalbumin (savčí)
Emulsit 25 (Dai-ichi Kogyo Seiyaku Co., Ltd.)
0,1% fenol
1% ProClin 150

SB3 5 x 75 testů
(Substrát A)

Citrátový roztok
0,01% peroxid vodíku
0,1% ProClin 150

SB 5 x 5 ml
(Substrát B)

0,1% 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)
40% dimethylformamid (DMF)

T  40% hm. dimethylformamid (DMF)

Toxický

R: 61-20/21-36 Může poškodit plod. Při vdechování a styku s pokožkou je zdraví škodlivý. Dráždí oči.

S: 53-45 Vyhněte se expozici – před použitím si vyžádejte speciální pokyny. V případě nehody nebo cítíte-li se nedobře, vyhledejte okamžitě lékařskou pomoc (pokud možno ukažte štítek).

COBAS AMPLICOR CN4 200 testů P/N: 20764213 123
Conjugate Detection Reagent ART: 07 6421 3
Konjugované detekční činidlo COBAS AMPLICOR US: 83305

CN4 2 x 100 testů
(Konjugát avidinu s křenovou peroxidázou)

Pufř Tris-HCl
< 0,001% konjugát avidinu s křenovou peroxidázou
Bovinní serumalbumin (savčí)
Emulsit 25 (Dai-ichi Kogyo Seiyaku Co., Ltd.)
0,1% fenol
1% ProClin 150

COBAS AMPLICOR WB 500 testů P/N: 20759899 123
Wash Buffer ART: 07 5989 9
Promývací pufř COBAS AMPLICOR US: 83314

WB 2 x 250 testů
(10X-promývací koncentrát)

< 2% fosfátový pufř
< 9% chlorid sodný
EDTA
< 2% detergent
0,5% ProClin 300

Upozornění a bezpečnostní pokyny

Pro diagnostické použití *in vitro*.

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

Nepipetovat ústy.

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

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

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

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

Po vypršení lhůty použitelnosti již soupravu nepoužívejte.

Materiálové bezpečnostní listy si lze vyžádat u místního zastoupení firmy Roche.

Pracovní tok musí v laboratoři probíhat jednosměrně, počínaje od předamplifikačního prostoru směrem k poamplifikačnímu prostoru (amplifikace/detekce). Předamplifikační činnosti začínají přípravou činidel a postupují k přípravě vzorků. Látky a vybavení se musí přiřadit jednotlivým předamplifikačním činnostem a nesmějí se používat k jiným činnostem ani přenášet mezi jednotlivými vyhrazenými prostory. Ve všech prostorech je třeba nosit rukavice, které se před opuštěním prostoru vymění. Vybavení a materiály pro přípravu činidla se nesmějí používat k přípravě vzorků, ani pro pipetování nebo zpracování amplifikované DNA či jiných zdrojů terčové DNA. Poamplifikační materiály a vybavení musí vždy zůstat v poamplifikačním prostoru.

Se vzorky je třeba zacházet jako s infekčními a používat odpovídající laboratorní postupy, například jak jsou uvedeny v publikaci *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*²¹ nebo v dokumentu NCCLS M29-A²². 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 dostanete zředěním bělidla pro domácnost v poměru 1:10.

POZOR: Souprava obsahuje složku (**NHP**) odvozenou z lidské krve. Zdrojový materiál byl analyzován pomocí testů schválených US FDA a byl shledán nereaktivním vůči protilátkám proti HCV, protilátkám proti HIV-1/2, antigenu HIV p24 a povrchovému antigenu hepatitidy B (HBsAg). Testování negativní lidské plazmy metodami PCR neprokázalo žádné detekovatelné HIV-1 RNA, HCV RNA ani HBV DNA. Ovšem žádná známá testovací metoda nepředstavuje dokonalou záruku, že se deriváty z lidské krve nepřenesou žádné infekční látky. Proto je třeba považovat všechny materiál lidského původu za potenciálně infekční. S **NHP** je třeba zacházet jako s infekčním a při práci s ním je nutno uplatňovat bezpečné laboratorní postupy, například takové, jaké jsou uvedeny v publikaci *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*²¹ a v dokumentu NCCLS M29-A²². Všechny plochy důkladně očistěte a vydezinfikujte čerstvě připraveným 0,5% roztokem chlornanu sodného v deionizované nebo destilované vodě.

HCV IC, v2.0; HCV DIL, v2.0; HCV MMX, v2.0; HCV Mn²⁺, v2.0; HCV (-) C, v2.0; HCV (+) C, v2.0 a CX PS1, v2.0 obsahují azid sodný. Ten může reagovat s kovovým olovem nebo mědí instalačních trubek za tvorby vysoce výbušných kovových azidů. Budete-li tedy vylévat roztoky obsahující azid do laboratorní výlevky, spláchněte ji velkým objemem vody, aby se azid nemohl nikde usadit.

Při manipulaci s **HCV LYS, v2.0; HCV MMX, v2.0, CX4, v2.0, DN4, CN4, SB3, SB** nebo pracovním substrátem (směsí činidel **SB3** a **SB**) noste prostředky ochrany očí, laboratorní plášť a rukavice na jedno použití. Dbejte, aby se tyto materiály nedostaly do styku s pokožkou, očima nebo sliznicemi. Pokud ke styku dojde, okamžitě postiženou oblast omyjte velkým množstvím vody. Pokud byste to zanedbali, mohly by se vyvinout popáleniny. Jestliže se některé činidlo rozlije nebo rozsype, před vytřením dosucha je zřeďte vodou.

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

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

Dejte pozor, aby se **HCV LYS, v2.0**, který obsahuje guanidinthiokyanát, ani **CX4, v2.0**, který obsahuje thiokyanát sodný, nedostaly do styku s roztokem chlornanu sodného (tj. bělidla). Ze směsi by se mohl uvolňovat vysoce toxický plyn.

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

Požadavky na skladování a manipulaci

Reagencie nezmrazujte.

HCV LYS, v2.0, HCV DIL, v2.0 and **HCV IC, v2.0** uchovávejte při teplotě 2–8°C. Pokud jsou tato činidla neotevřená, jsou stabilní až do vypršení doby použitelnosti, jež je na nich uvedena. Po otevření je třeba nespoteřovanou část zlikvidovat.

V činidle **HCV LYS, v2.0** se během skladování při teplotě 2–8°C tvoří sraženina. Před použitím je zahřejte na teplotu 25–37°C a důkladně míchejte, aby se sraženina rozpustila. Ohřívejte **HCV LYS, v2.0** nejdéle 30 minut a potom kapalinou důkladně míchejte, dokud se krystalky nerozpustí. **Před použitím si každou lahvičkou HCV LYS, v2.0 prohlédněte proti bílému podkladu a sledujte, jestli nepozorujete žluté zabarvení nebo známky netěsnosti. Pokud žlutou barvu nebo známky netěsnosti zjistíte, lahvičku k testování nepoužívejte a vyžádejte si od místního zastoupení firmy Roche náhradu.** Po otevření je třeba nespoteřovanou část zlikvidovat. Pracovní roztok činidla pro lýzu (připravený přidáním **HCV IC, v2.0** k **HCV LYS, v2.0**) se uchovává za pokojové teploty a je třeba jej spotřebovat do 8 hodin od přípravy.

HCV MMX, v2.0 a **HCV Mn²⁺, v2.0** uchovávejte při teplotě 2–8°C. Činidla jsou stálá až do vypršení doby použitelnosti, jež je na nich uvedena. Po otevření je třeba nespoteřovanou část zlikvidovat. Pracovní Master Mix (připravený přidáním **HCV Mn²⁺, v2.0** k **HCV MMX, v2.0**) se uchovává při teplotě 2–8°C a musí se spotřebovat do 4 hodin od přípravy.

Uchovávejte **NHP, HCV (-) C, v2.0** a **HCV (+) C, v2.0** při teplotě 2–8°C. Činidla jsou stálá až do vypršení doby použitelnosti, jež je na nich uvedena. Po otevření je třeba nespoteřovanou část zlikvidovat.

Uchovávejte **CX PS1, v2.0** a **CX4, v2.0** při teplotě 2–8°C. Činidla jsou stálá až do vypršení doby použitelnosti, jež je na nich uvedena. Po smíšení **CX PS1, v2.0** s **CX4, v2.0** je pracovní činidlo stálé po dobu 30 dní při teplotách 2–8°C. Dá se použít maximálně na šest 12-hodinových přístrojových cyklů a mezi cykly se musí uchovávat při teplotě 2–8°C.

DN4 uchovávejte za teplot 2–25°C. **DN4** je stálý až do vypršení doby použitelnosti, jež je na něm uvedena. Po otevření je **DN4** při teplotě 2–8°C stálý 30 dní nebo do vypršení doby použitelnosti, podle toho, která doba je kratší. **DN4** se dá použít maximálně na šest 12-hodinových přístrojových cyklů a mezi cykly se musí uchovávat při teplotě 2–8°C.

CN4 uchovávejte při teplotě 2–8°C. **CN4** je stálý až do vypršení doby použitelnosti, jež je na něm uvedena. Po otevření je **CN4** při teplotě 2–8°C stálý 30 dní nebo do vypršení doby použitelnosti, podle toho, která doba je kratší. **CN4** se dá použít maximálně na šest 12-hodinových přístrojových cyklů a mezi cykly se musí uchovávat při teplotě 2–8°C.

SB3 a **SB** uchovávejte při teplotě 2–8°C. Pokud jsou tato činidla neotevřená, jsou stabilní až do vypršení doby použitelnosti, jež je na nich uvedena. Pracovní substrát je třeba připravovat denně smísením **SB3** s **SB**. Pracovní substrát je v přístroji COBAS AMPLICOR Analyzer stálý po 16 hodin. **SB3, SB** ani pracovní substrát nesmí přijít do styku s kovy ani s oxidačními činidly a nesmí se vystavovat přímému světlu.

WB uchovávejte při teplotě 2–25°C. Je stálý stálá až do vypršení doby použitelnosti, jež je na něm uvedena. Před zředěním **WB** prohlédněte a upozorujete-li sraženinu, kapalinu zahřejte na 30–37°C, aby se sraženina rozpustila. Pracovní promývací pufr (1X), připravený zředěním **WB** destilovanou nebo deionizovanou vodou v poměru 1:10, se uchovává při teplotě 2–25°C v zásobníku COBAS AMPLICOR Wash Pufr Reservoir; od doby přípravy je stálý 2 týdny.

Částečně spotřebovaná detekční činidla uchovávejte mezi prací s přístrojem při teplotě 2–8°C. Před vložením do přístroje COBAS AMPLICOR Analyzer zkontrolujte, zda otevřeným nebo pracovním činidlům neuplynula doba použitelnosti.

Dodané materiály

AMPLICOR HCV Specimen Preparation Kit, version 2.0 Souprava pro přípravu vzorků HCV AMPLICOR, verze 2.0	HCV PREP	P/N: 21111086 123 ART: 11 1108 6 US: 83126
--	-----------------	--

HCV LYS, v2.0
(Činidlo pro lýzu HCV, verze 2.0)

HCV DIL, v2.0
(Ředidlo na vzorky HCV, verze 2.0)

HCV IC, v2.0
(Vnitřní kontrola HCV, verze 2.0)

AMPLICOR HCV Controls Kit, version 2.0 Souprava kontrol HCV AMPLICOR, verze 2.0	HCV CTL	P/N: 21111175 123 ART: 11 1117 5 US: 83131
---	----------------	--

NHP
[Negativní plazma (lidská)]

HCV (-) C, v2.0
[Kontrola HCV(-), verze 2.0]

HCV (+) C, v2.0
[Kontrola HCV(+), verze 2.0]

AMPLICOR HCV Amplification Kit, version 2.0 Amplifikační souprava HCV AMPLICOR, verze 2.0	HCV AMP	P/N: 21111094 123 ART: 11 1109 4 US: 83127
---	----------------	--

HCV MMX, v2.0
(HCV Master Mix, version 2.0)

HCV Mn²⁺, v2.0
(HCV Manganese Solution, version 2.0)

COBAS AMPLICOR HCV Detection Kit, version 2.0 Souprava pro detekci HCV COBAS AMPLICOR, verze 2.0	HCV DK	P/N: 21111132 123 ART: 11 1113 2 US: 83130
---	---------------	--

CX PS1, v2.0
(HCV Probe Suspension 1, version 2.0)

CX4, v2.0
(HCV Probe Suspension 2, version 2.0)

COBAS AMPLICOR DK P/N: 20757470 122
Detection Reagents Kit ART: 07 5747 0
Souprava detekčních činidel COBAS AMPLICOR US: 83276

DN4
(Denaturační roztok)

CN4
(Konjugát avidinu s křenovou peroxidázou)

SB3
(Substrát A)

SB
(Substrát B)

COBAS AMPLICOR CN4 P/N: 20764213 123
Conjugate Detection Reagent ART: 07 6421 3
Konjugované detekční činidlo COBAS AMPLICOR US: 83305

CN4
(Konjugát avidinu s křenovou peroxidázou)

COBAS AMPLICOR WB P/N: 20759899 123
Wash Buffer ART: 07 5989 9
Promývací pufr COBAS AMPLICOR US: 83314

WB
(10X-promývací koncentrát)

Potřebné materiály, jež nejsou součástí dodávky

Preamplifikace – prostor pro přípravu činidel

- COBAS AMPLICOR A-kruh osazený 12 A-zkumavkami (ART: 10 4563 6)
- COBAS AMPLICOR držák A-kruhu
- Plastový zatavitelný vak
- Eppendorf Multipette® s rezervoárem Combitip® 1,25 ml (sterilní, balení po jednom)
- Pipetory (objem 50 µl a 100 µl)* s aerosolovou bariérou nebo RNázy prostými špičkami s pozitivním posuvem
- Rukavice na jedno použití bez prášku

Preamplifikace – prostor pro přípravu vzorku a kontroly

- 1,5 ml polypropylenové zkumavky se šroubovacím uzávěrem sterilní, nesilikonované, konické (Sarstedt 72.692.005 nebo ekvivalent)**
- Stojany na zkumavky (Sarstedt 93.1428 nebo ekvivalent)
- 95% ethanol analytické čistoty pro mikrobiologii nebo histologii (čerstvě zředěný na 70% destilovanou nebo deionizovanou vodou)
- Izopropylalkohol čistoty p.a.
- Sterilní transferové pipety s jemnou špičkou pro RNázy
- Sterilní polystyrenové sérologické pipety na jedno použití (5 ml, 10 ml a 25 ml)

- Pipetory (objem 20 µl, 50 µl, 100 µl, 200 µl, 400 µl, 600 µl a 1000 µl)* s aerosolovou bariérou nebo špičkami s pozitivním posuvem prostými RNázy
- Mikrocentrifuga (max. RCF 16.000 x g, min. RCF 12.500 x g); Eppendorf 5415C, HERMLE Z230M, nebo ekvivalent
- Vířivý mixer
- 60°C ± 2°C s horkovzdušným ohřevem
- Rukavice na jedno použití bez prášku

Poamplifikace – prostor amplifikace/detekce

- COBAS AMPLICOR Analyzer a tiskárna
- *Operator's Manual* k přístroji COBAS AMPLICOR Analyzer
- COBAS AMPLICOR Hepatitis C Virus Test, v2.0 Method Manual
- Stojany s D-keřímkou (ART: 10 4564 4)
- Destilovaná nebo deionizovaná voda
- Sérologické pipety 5 ml
- Rukavice na jedno použití bez prášku

* Pipetory musejí mít přesnost 3 % jmenovitého objemu. Kde je tak uvedeno, musí být použita aerosolová bariéra nebo špičky s pozitivním posuvem prosté RNázy, aby se zabránilo vzájemné kontaminaci vzorku a amplikonu.

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

Odběr, přeprava a skladování vzorků

Pozn.: *Se všemi vzorky je třeba zacházet jako s infekčními.*

Odběr vzorků Souprava COBAS AMPLICOR Hepatitis C Virus Test, v2.0 se používá pouze na vzorky séra nebo plazmy. Krev se odebírá do zkumavek SST® (Serum Separation Tubes) nebo do sterilních zkumavek za použití EDTA (vršek levandulové barvy) nebo ACD (vršek žluté barvy) jako antikoagulantu. **Vzorky antikoagulované heparinem jsou pro tento test nevhodné.** Celou krev uchovávejte při teplotě 2–25°C maximálně 6 hodin.

Sérum nebo plazmu z krve separujte do 6 hodin od odběru, a to odstředováním při 1500 x g po dobu 20 minut za pokojové teploty, a převed'te je do sterilní polypropylenové zkumavky.

Přeprava vzorků Při přepravě celé krve, séra nebo plazmy je třeba dodržovat celostátní resp. místní předpisy o dopravě etiologických látek.²³ Celá krev se přepravuje při teplotách 2–25°C a musí se zpracovat do 6 hodin od odběru. Sérum nebo plazma se může přepravovat při teplotě 2–8°C nebo ve zmrazeném stavu při teplotě –70°C nebo nižší a musí se zpracovat v mezích uvedených níže.

Skladování vzorků Vzorky séra nebo plazmy se mohou uchovávat při teplotě 2–8°C po dobu až 72 hodin nebo ve zmrazeném stavu při teplotě –70°C nebo nižší. Doporučuje se vzorky uchovávat v alikvotních podílech po 250–300 µl ve sterilních polypropylenových zkumavkách o objemu 1,5 ml se šroubovacím uzávěrem (například Sarstedt 72.692.105). Vzorky séra nebo plazmy je možno zmrazit a rozmrazit maximálně dvakrát.

Návod k použití

- Pozn.:** *Podrobný provozní návod viz v příručce Operator's Manual k přístroji COBAS AMPLICOR Analyzer.*
- Pozn.:** *Všechna činidla musejí mít před použitím teplotu okolí. Před započítím testu se vizuálně přesvědčte, že je objem činidel dostatečný.*
- Pozn.:** *Vzorky séra a plazmy musejí mít před použitím teplotu okolí.*
- Pozn.:** *Kde je tak uvedeno, používejte pipetory s aerosolovou bariérou nebo se špičkami s pozitivním posuvem. Dávejte obzvláštní pozor, abyste zajistili selektivní amplifikaci.*
- Pozn.:** *Vzorky i kontrolní preparát se musí uchovávat ve zkumavkách se šroubovacím uzávěrem, aby nemohly vystříknout a aby nemohlo dojít ke vzájemné (křížové) kontaminaci vzorků a kontrol. Zkumavky s nasazovacím uzávěrem nepoužívejte.*
- Množství pro jedno měření** Každá souprava obsahující dostatečné množství činidla na osm 12-testových měření, která mohou probíhat zvlášť nebo současně. Při každém měření musí být minimálně po jednom replikátu AMPLICOR HCV (–) Control a AMPLICOR HCV (+) Control (viz část „Kontrola jakosti“).
- Činidla pro přípravu vzorku a amplifikaci jsou balena v 12-testových lahvičkách na jedno použití. HCV (–) a HCV (+) Controls jsou baleny v lékovkách na jedno použití. Pro co nejefektivnější využití je vhodné zpracovávat činidla, vzorky i kontroly v dávkách, jež jsou násobky dvanácti.
- Pracovní tok** COBAS AMPLICOR Hepatitis C Virus Test, v2.0 se dá provést během jednoho nebo dvou dnů. Pokud se má test provést během jednoho pracovního dne, postupuje se podle pokynů v částech *Příprava činidel, Příprava vzorků a kontrol a Reverzní transkripce, Amplifikace a detekce* v tomto pořadí. Testování lze také rozložit na dva dny tak, že se první den začne s postupy *Příprava vzorků a kontrol* a druhý den se pokračuje s *Přípravou činidel a Reverzní transkripcí, Amplifikací a Detekcí*, nebo se první den začne s *Přípravou vzorků a kontrol, Reverzní transkripcí a Amplifikací* a druhý den se pokračuje s *Detekcí*.
- Pokud se první den provádí zpracování vzorků a kontrol a druhý den reverzní transkripce, amplifikace a detekce, postupuje se podle částí *Příprava vzorků a kontrol* (kroky 1 až 15) a zpracované vzorky a kontroly se uloží, jak je uvedeno v kroku 15. Druhý den se začne s *Přípravou činidel*, pak se zpracované vzorky a kontroly při pokojové teplotě rozmrazí a pokračuje se částmi *Příprava vzorků a kontrol*, krok 16, přes *Reverzní transkripcí, Amplifikaci až po Detekci*.
- Chceme-li první den provést zpracování vzorků a kontrol, reverzní transkripci a amplifikaci, absolvujeme všechny kroky částí *Příprava činidel a Příprava vzorků a kontrol*. Naprogramujeme přístroj COBAS AMPLICOR Analyzer v paralelním režimu a provedeme amplifikační stupně (podrobné pokyny viz v příručce *Operator's Manual* k přístroji COBAS AMPLICOR Analyzer). Denaturovaný amplikon uchováme přes noc při teplotě 2–8°C a druhý den pokračujeme detekcí.

Příprava činidel

Provádí se: Preamplifikace – prostor pro přípravu činidel

1. Stanovte potřebný počet A-kruhů pro testování pacientova vzorku a kontroly. Uložte A-kruh(y) do držáku(ů).
2. Připravte pracovní Master Mix odměřením 100 µl **HCV Mn²⁺, v2.0** do jedné lékovky **HCV MMX, v2.0**. *Objem Master Mix není třeba měřit. Odměřte 100 µl HCV Mn²⁺, v2.0 do celé lékovky HCV MMX, v2.0.* Zkumavku opět uzavřete a dobře promíchejte tak, že ji 10–15 -krát obrátíte dnem vzhůru. Víření k promísení pracovního Master Mix nepoužívejte. Růžové barvivo v **HCV Mn²⁺, v2.0** slouží k vizuálnímu ověření, že byl **HCV Mn²⁺, v2.0** k **HCV MMX, v2.0** přidán. Zbytek **HCV Mn²⁺, v2.0** zlikvidujte. Pracovní Master Mix je třeba uchovávat při teplotách 2–8°C a musí se spotřebovat do 4 hodin od přípravy.
3. Do každé A-zkumavky odměřte 50 µl pracovního Master Mix za použití opakovacího pipetoru nebo pipetoru s aerosolovou bariérou nebo se špičkou s pozitivním posuvem. Tentokrát čepičky A-zkumavek nezavírejte.
4. A-kruh(y) s pracovním Master Mix vložte do těsně uzavíratelného plastového vaku a vak bezpečně těsně uzavřete. Přemístěte A-kruh(y) s pracovním Master Mix do prostoru Preamplifikace – příprava vzorku a kontroly a uložte je tam při teplotě 2–8°C do doby, než bude příprava vzorku a kontroly hotova. Pracovní Master Mix v A-zkumavkách zatavených v plastovém vaku je při teplotě 2–8°C stálý po dobu 4 hodin.

Příprava vzorku a kontroly

Provádí se v: Preamplifikace – prostor pro přípravu vzorku a kontroly

Pozn.:

K amplifikace zpracovaných vzorků a kontrol proved'te nejprve kroky uvedené v části „Příprava činidel“. Nechte zpracované vzorky a kontroly při pokojové teplotě rozmrazit a pokračujte s „Přípravou vzorku a kontroly“, krok 16.

Pozn.:

Před použitím prohlédněte každou lahvičkou s HCV LYS, v2.0 proti bílému pozadí a sledujte, jestli nezpozorujete žluté zabarvení nebo známky netěsnosti. Pokud žlutou barvu nebo známky netěsnosti zjistíte, lahvičku k testování nepoužívejte. Vyžádejte si od místního zastoupení firmy Roche náhradu.

Pozn.:

V HCV LYS, v2.0 se při skladování při teplotě 2–8°C tvoří sraženina. Před použitím kapalinu zahřívajte po dobu maximálně 30 minut při teplotě 25–37°C a důkladně promíchejte, aby se sraženina rozpustila.

1. Připravte 70% ethanol. Na 12 testů smíchejte 11,0 ml 95% ethanolu se 4,0 ml deionizované nebo destilované vody.
2. Označte po jedné 1,5 ml zkumavce se šroubovacím uzávěrem pro každý vzorek od pacienta a další dvě zkumavky označte „HCV (–) C“ a „HCV (+) C“.
3. Připravte pracovní Lysis Reagent. Před použitím promíchejte **HCV IC, v2.0** vířením po dobu 5–10 sekund. Na každou dávku až 12 vzorků a kontrol odměřte do jedné lahvičky **HCV LYS, v2.0** 100 µl **HCV IC, v2.0** a dobře promíchejte. Objem **HCV LYS, v2.0** není třeba odměřit.

Pozn.:

HCV IC, v2.0 se musí k HCV LYS, v2.0 přidat i tehdy, když se HCV Internal Control detekovat nebude. Zbývající HCV IC, v2.0 zlikvidujte. Pracovní Lysis Reagent je při pokojové teplotě stálý po dobu 8 hodin.

Pozn.:

Používáte-li vzorky zmražené, rozmrazte je při pokojové teplotě a vířením po dobu 3 až 5 sekund je promíchejte. Zkumavkou se vzorkem zakružte, abyste sebrali vzorek i ze dna zkumavky. Dejte pozor, abyste si při manipulaci se vzorky nekontaminovali rukavice.

4. Do každé označené zkumavky odměřte 400 µl pracovního Lysis Reagent a zkumavky uzavřete.
5. Připravte si kontroly tímto způsobem:
 - Vířením po dobu minimálně 5–10 sekund **NHP, HCV (–) C, v2.0** a **HCV (+) C, v2.0** promíchejte.
 - Do obou kontrolních zkumavek odměřte po 200 µl **NHP**, zkumavky uzavřete a nechte minimálně 3–5 sekund vířit.
 - Do zkumavky označené „HCV (–) C“, obsahující pracovní Lysis Reagent a **NHP**, odměřte 20 µl **HCV (–) C, v2.0**. Zkumavku uzavřete a minimálně 3–5-sekundovým vířením promíchejte.
 - Do zkumavky označené „HCV (+) C“, obsahující pracovní Lysis Reagent a **NHP**, odměřte 20 µl **HCV (+) C, v2.0**, zkumavku uzavřete a minimálně 3–5-sekundovým vířením promíchejte.
6. Do příslušně označené zkumavky obsahující pracovní Lysis Reagent odměřte 200 µl vzorku od pacienta. Zkumavky uzavřete a minimálně 3–5-sekundovým vířením promíchejte.
7. Zkumavky se vzorkem a kontrolou inkubujte 10 minut v horkovzdušném zařízení při teplotě 60°C ± 2°C Minimálně 10-sekundovým vířením promíchejte.
8. Sejměte ze zkumavek uzávěry a do každé přidejte 600 µl 100% izopropylalkoholu (při pokojové teplotě). Zkumavky opět uzavřete a nechte minimálně 3–5 sekund vířit. Všechny zkumavky 2 minuty při pokojové teplotě inkubujte.
9. Na zkumavkách si udělejte orientační značky a vložte zkumavky do mikrocentrifugy orientační značkou ven, takže se pelety podle nich srovnají. Vzorky a kontroly centrifugujte při pokojové teplotě maximální rychlostí (12 500–16 000 x g) pod dobu 15 minut.
10. Pomocí nové transfer-pipety na jedno použití s jemnou špičkou opatrně z každé zkumavky stáhněte a zlikvidujte supernatant; přitom dávejte pozor, abyste neporušili peletu (nemusí být vidět!) kapaliny, kolik je bez porušení pelety možné. Supernatant odebírejte pomalu, tak aby mohla kapalina ze stěn zkumavky kompletně stéci. Vakuové odsávání nepoužívejte.
11. Do každé zkumavky odměřte 1,0 ml 70% ethanolu (při pokojové teplotě), zkumavky opět uzavřete a dejte minimálně na 3–5 sekund vířit.
12. Vložte zkumavky do mikrocentrifugy orientačními značkami ven a centrifugujte při pokojové teplotě maximální rychlostí (12 500–16 000 x g) po dobu 5 minut.
13. Pomocí nové transfer-pipety na jedno použití s jemnou špičkou opatrně z každé zkumavky stáhněte a zlikvidujte supernatant, aniž byste přitom porušili peletu; ta by měla být v tomto kroku dobře vidět. Supernatantu odstraňte co nejvíce.

14. Zkumavky opět uzavřete a po dobu 3-5 sekund maximální rychlostí centrifugujte. Za použití pipetoru o kapacitě 200 µl s novou špičkou pro každou zkumavku opatrně odstraňte supernatant, aniž byste porušili peletu; ta by měla být v tomto kroku dobře vidět. Supernatantu odstraňte co nejvíce. **Zbytkový ethanol může amplifikaci inhibovat.**
15. Do každé zkumavky odměřte 200 µl **HCV DIL, v2.0**. Pomocí pipetoru o kapacitě 200 µl se špičkou s aerosolovou bariérou odlomte v maximální míře peletu a zkumavku opět uzavřete. Nechte po dobu 10 sekund intenzivně vířit. Může tam zůstat určité množství nerozpustné hmoty. Zpracované vzorky a kontroly amplifikujte do 3 hodin od přípravy, nebo je můžete po dobu nepřesahující jeden měsíc uchovávat ve zmraženém stavu při teplotě -70°C , přičemž zmrazit a rozmrazit se mohou nanejvýš dvakrát. Kdybyste je zmrazili a rozmrazili víckrát, mohlo by dojít ke ztrátě signálu HCV nebo HCV Internal Control.

Pozn.:

Pokud byly zpracované vzorky a kontroly uchovávány před amplifikací ve zmraženém stavu, rozmrazte je za pokojové teploty a před postoupením k bodu 16 je dejte na dobu 5 sekund vířit.

16. Od každého zpracovaného vzorku od pacienta a kontroly odměřte 50 µl do příslušné A-zkumavky obsahující pracovní Master Mix; použijte k tomu mikropipetor s aerosolovou bariérou nebo se špičkou s pozitivním posuvem. Pro každý vzorek a kontrolu použijte novou špičku. Dejte pozor, abyste nepřevodli žádnou vysráženou látku, který se možná nepřevedl zpět do roztoku. A-zkumavky uzavřete.
17. Zaznamenejte pozice kontrol a vzorků v A-kruzích. S amplifikací je třeba začít do 45 minut okamžiku, kdy byly zpracované vzorky a kontroly odměřeny do A-zkumavek obsahujících pracovní Master Mix. Připravené vzorky a kontroly v A-kruzích přemístěte do prostoru Amplifikace/detekce. Zbytek zpracovaného vzorku je možno zmrazit a po dobu až jednoho měsíce uchovávat při teplotě -70°C nebo nižší. Zpracovaný vzorek se může zmrazit a rozmrazit maximálně dvakrát. Kdyby se zmrazil a rozmrazil vícekrát, mohlo by dojít ke ztrátám HCV RNA.

Reverzní transkripce, amplifikace a detekce

Provádí se v: Poamplifikace – prostor amplifikace/detekce

Provádějte každodenní údržbu přístroje, jak je uvedeno v příručce *Operator's Manual* k přístroji COBAS AMPLICOR Analyzer; sem spadají tyto činnosti:

- Otřete inicializační podstavec vlhkým hadříkem nepouštějícím vlas a osušte
- Otřete špičku zařízení pro manipulaci s D-kelímky vlhkým hadříkem nepouštějícím vlas a osušte
- Zkontrolujte rezervoár s promývacím kufrem a v případě potřeby doplňte
- Pracovní promývací pufr (1X) připravíte následujícím postupem. Prohlédněte **WB** a zpozorujete-li sraženinu, zahřejte kapalinu na teplotu $30-37^{\circ}\text{C}$, aby se sraženina rozpustila. Přidejte jeden objem **WB** k 9 objemům destilované nebo deionizované vody a dobře promíchejte. V rezervoáru promývacího pufru (1X) by měly být pufru vždy minimálně 3–4 litry.
- Vyprázdňte dopadní nádobu
- Systém naprimujte
- Během primingu zkontrolujte stříkačky a trubičky
- Během primingu zkontrolujte transferové špičky

Před každým postupem

- Zkontrolujte odpadní nádobu a případně ji vyprázdněte
- Zkontrolujte rezervoár na promývací pufr a případně pufr doplňte
- Vyměňte stojany s použitými D-kelímky
- Systém naprimujte

Plnění přístroje a provoz zařízení

1. Zkontrolujte v přístroji COBAS AMPLICOR Analyzer množství činidel. Připravte si dostatek kazet, abyste s nimi vystačili.
2. Vířením **CX PS1, v2.0** dokonale promíchejte. Do jedné kazety s **CX4, v2.0** odměřte 2,5 ml **CX PS1, v2.0**. a kazetu uložte do příslušného stojanu, specifického pro daný test. Použitou k lékovku od **CX PS1, v2.0** zlikvidujte. Na kazetě s **CX4, v2.0** poznačte datum přípravy činidla.
3. Při detekci HCV Internal Control dokonale **IC PS1** vířením promíchejte. Do jedné kazety s **IC4** odměřte 2,5 ml **IC PS1** a kazetu uložte do příslušného stojanu, specifického pro daný test. Použitou k lékovku od **IC PS1** zlikvidujte. Na kazetě s **IC4** poznačte datum přípravy činidla.
4. Připravte pracovní substrát tak, že do jedné kazety s **SB3** odpipetujete 5 ml **SB**. K promísení pipetujte nahoru a dolů. Prázdnou lékovku od **SB** zlikvidujte. Na kazetě s **SB3** poznačte datum přípravy.
5. Pracovní substrát uložte do příslušného (generického) stojanu.
6. Kazety s **DN4** a **CN4** postavte do příslušných (generických) stojanů. Na kazetách poznačte datum, kdy byly otevřeny.
7. Stojany na činidla identifikujete jako generické nebo specifické pro daný test pomocí klávesnice nebo snímače čárových kódů, jak je popsáno v příručce (*Operator's Manual*) k přístroji COBAS AMPLICOR Analyzer, nebo pomocí software AMPLILINK®, jak je popsáno v příručce (*Operator's Manual*) k tomuto software.
8. Nakonfigurujte stojany na činidla tak, že do analyzátoru vložíte pozice činidel a čísla šarží, a to buď pomocí klávesnice či snímače čárových kódů, jak je popsáno v příručce (*Operator's Manual*) k přístroji COBAS AMPLICOR Analyzer, nebo pomocí software AMPLILINK, jak je popsáno v příručce (*Operator's Manual*) k tomuto software.
9. Uložte stojany na činidla na analyzátor buď pomocí klávesnice či snímače čárových kódů, jak je popsáno v příručce (*Operator's Manual*) k přístroji COBAS AMPLICOR Analyzer, nebo pomocí software AMPLILINK, jak je popsáno v příručce (*Operator's Manual*) k tomuto software. Dbejte, aby byla každá kazeta s činidlem ve své přiřazené pozici a aby ve stojanu těsně seděla.
10. Stojan na D-kelímky uložte na plošinu pro D-kelímky. Pro každou detekční reakci je zapotřebí jeden D-kelímeček a pro každou kazetu s pracovním substrátem jsou zapotřebí dva D-kelímky, aby přístroj COBAS AMPLICOR Analyzer mohl provést slepý pokus.
11. A-kruh(y) uložte do segmentu(ů) tepelného cyklizátoru přístroje COBAS AMPLICOR Analyzer.

12. Uložte A-kruh(y) do analyzátoru, a to buď pomocí klávesnice či snímače čárových kódů, jak je popsáno v příručce (*Operator's Manual*) k přístroji COBAS AMPLICOR Analyzer, nebo pomocí software AMPLILINK, jak je popsáno v příručce (*Operator's Manual*) k tomuto software.
13. Sestavte pro A-kruhy pracovní seznam (Worklist), jak je popsáno v příručce (*Operator's Manual*) k přístroji COBAS AMPLICOR Analyzer.
14. Kryt segmentu(ů) tepelného cyklizátoru těsně uzavřete.
15. Uveďte přístroj COBAS AMPLICOR Analyzer do chodu, jak je popsáno v jeho příručce (*Operator's Manual*).
16. Vyčkejte, dokud analyzátor neohlásí, že kontrola uložení proběhla úspěšně.

Pozn.:

V každé A-zkumavce umožňuje přístroj COBAS AMPLICOR Analyzer provést až 6 samostatných detekcí. Analyzátor si sám vypočítá potřebná množství jednotlivých činidel a na počátku každého měření zkontroluje, jestli jich má pro požadovaný test dostatek.

17. Reverzní transkripci, amplifikaci a detekci provádí přístroj COBAS AMPLICOR Analyzer automaticky. Výsledky jsou vyjádřeny jako absorbance u 660 nm a jako pozitivní, negativní nebo neprůkazné.

Výsledky

Interpretace výsledků S detekcí Internal Control

Pozn.: *Pokud jde o tisk výsledků a interpretaci příznaků (flags) a poznámek, viz provozní příručku (Operator's Manual) k přístroji COBAS AMPLICOR Analyzer.*

1. Projděte si, co přístroj k danému měření vytiskl, a na příznacích (FLG) a poznámkách si ověřte, že je měření platné. Pokud platné není, musíte celý postup, tj. přípravu vzorku, amplifikaci a detekci, zopakovat.
2. Jestliže je měření platné, lze výsledky vzorků interpretovat takto:

HCV A ₆₆₀ Výsledek		HCV IC A ₆₆₀ Výsledek		Interpretace
A ₆₆₀	Příznak COBAS	A ₆₆₀	Příznak COBAS	
< 0,15	NEGATIVE	≥ 0,15	POZITIVE	HCV RNA nezjištěna. Negativní výsledek nevylučuje infekci virem HCV, protože výsledek závisí na správném odběru vzorku, absenci inhibitorů, dostatku RNA pro detekci.
< 0,15	NEGATIVE	< 0,15	NEGATIVE	Inhibitorní vzorek. Pokud by byla HCV RNA přítomna, byla by nezjistitelná. pracujte jiný alikvotní podíl původního vzorku a test zopakujte. Inhibitory jsou často labilní a vzorek, který byl původně inhibitorní, už při opakovaném testu inhibován být nemusí. Pokud již původní vzorek k dispozici není, je třeba odebrat vzorek nový.
≥ 1,0	POZITIVE	JAKÉKOLIV	JAKÉKOLIV	HCV RNA zjištěna. Vzorek je na přítomnost HCV pozitivní.
≥ 0,15 < 1,0	GZ 0,15–0,99	JAKÉKOLIV	JAKÉKOLIV	Nejednoznačné. Výsledky jsou pro přítomnost HCV RNA neprůkazné. Celý test je třeba stejným způsobem zopakovat s novým alikvotním podílem pacientova vzorku. Vzorky, jejichž jeden nebo oba opakované výsledky jsou ≥ 0,15 A ₆₆₀ , se považují za HCV RNA pozitivní. Vzorky, jejichž oba duplicitně zopakované testy jsou < 0,15 A ₆₆₀ , se považují za HCV RNA negativní, pokud jsou oba výsledky IC ≥ 0,15 A ₆₆₀ .

Bez detekce Internal Control

1. Projděte si, co přístroj k danému měření vytiskl, a na příznacích (FLG) a poznámkách si ověřte, že je měření platné. Pokud platné není, musíte celý postup, tj. přípravu vzorku, amplifikaci a detekci, zopakovat.
2. Jestliže je měření platné, lze výsledky vzorků interpretovat takto:

Výsledek na HCV		Interpretace
A ₆₆₀	Příznak COBAS	
< 0,15	NEGATIVE	HCV RNA nezjištěna. Negativní výsledek infekci virem HCV nevylučuje, protože výsledek závisí na správném odběru vzorku, absenci inhibitorů, a dostatku RNA k detekci.
≥ 1,0	POZITIVE	HCV RNA zjištěna. Vzorek je na přítomnost viru HCV pozitivní.
≥ 0,15, < 1,0	GZ 0,15–0,99	Nejednoznačné. Výsledky jsou pro přítomnost HCV RNA neprůkazné. Celý test je třeba stejným způsobem zopakovat s novým alikvotním podílem pacientova vzorku. Vzorek, kde výsledky jednoho nebo obou opakovaných testů jsou ≥ 0,15 A ₆₆₀ , je třeba považovat za pozitivní na HCV RNA. Vzorek, kde jsou oba výsledky obou opakovaných testů < 0,15 A ₆₆₀ , jsou považovány za negativní na HCV RNA.

Kontrola kvality

V každém testu musí být zařazeno minimálně po jednom replikátu AMPLICOR HCV (–) Control a AMPLICOR HCV (+) Control. Jak je tomu při každém novém laboratorním postupu, noví pracovníci obsluhy by měli zvážit, jestli by nebylo dobře při každém testování použít ještě další kontroly až do doby, než dokáží test provádět s vysokou jistotou správně. Mimoto je třeba během přípravy vzorků přidat ke každému vzorku také Internal Control. Konečná detekce na přístroji COBAS AMPLICOR Analyzer je uživatelovou volbou. Na pozici kontrol v A-kruhu/kruzích nejsou kladeny žádné požadavky.

Projděte si, co přístroj vytiskl, a na příznacích a poznámkách si ověřte, že je měření platné. Pokud jde o tisk a interpretaci příznaků a poznámek, viz provozní příručku (*Operator's Manual*) I přístroji COBAS AMPLICOR Analyzer.

Testování dalších kontrol může být vyžadováno směrnicemi nebo požadavky místních či celostátních předpisů nebo akreditačních organizací.

Negativní kontrola

AMPLICOR HCV (–) Control má poskytovat hodnotu A₆₆₀ nižší než 0,1. Pokud je absorbance AMPLICOR HCV (–) Control A₆₆₀ rovna nebo vyšší než 0,1, je celé měření neplatné. Je třeba zopakovat celý postup, tj. přípravu vzorků a kontrol, reverzní transkripci, amplifikaci a detekci. Jestliže je takto absorbance AMPLICOR HCV (–) Control A₆₆₀ vyšší než 0,1 soustavně, spojte se s místním zastoupením firmy Roche a vyžádejte si technickou pomoc.

Pozitivní kontrola

AMPLICOR HCV (+) Control má mít hodnotu A₆₆₀ rovnou nebo vyšší než 1,0. Pokud AMPLICOR HCV (+) Control vykazuje absorbanci A₆₆₀ nižší než 1,0, je celé měření neplatné. Je třeba zopakovat celý postup, tj. přípravu vzorků a kontrol, reverzní transkripci, amplifikaci a detekci. Jestliže je takto absorbance AMPLICOR HCV (+) Control nižší než 1,0 soustavně, spojte se s místním zastoupením firmy Roche a vyžádejte si technickou pomoc.

Nač je třeba při postupu dbát

Pracovní tok musí v laboratoři probíhat jednosměrně, počínaje od předamplifikačního prostoru směrem k poamplifikačnímu prostoru (amplifikace/detekce). Předamplifikační činnosti začínají přípravou činidel a postupují k přípravě vzorků. Látky a vybavení se musí přiřadit jednotlivým předamplifikačním činnostem a nesmějí se používat k jiným činnostem ani přenášet mezi jednotlivými vyhrazenými prostory. Ve všech prostorech je třeba nosit rukavice, které se před opuštěním prostoru vymění. Vybavení a materiály pro přípravu činidla se nesmějí používat k přípravě vzorků, ani pro pipetování nebo zpracování amplifikované DNA či jiných zdrojů terčové DNA. Poamplifikační materiály a vybavení musí vždy zůstat v poamplifikačním prostoru.

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

Omezení

Tento test je validován pouze pro používání s lidským sérem nebo plazmou odebranými do antikoagulantů EDTA nebo ACD. Pokud by byly testovány jiné typy vzorků, mohly by být výsledky falešně negativní nebo falešně pozitivní.

Heparin inhibuje PCR, a proto se vzorky s heparinem jako antikoagulantem při testu COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0 nesmějí používat.

K tomu, aby byly výsledky spolehlivé, musejí být dodržovány správné postupy odběru vzorků, jejich přepravy, skladování a zpracování.

Detekce HCV závisí na tom, kolik virových částic je ve vzorku přítomno, na což mají vliv metody odběru vzorku, status pacienta (věk, symptomy) a popřípadě stádium infekce.

V důsledku inhibice polymerázy mohou být výsledky falešně negativní. Souprava COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0 byla doplněna o HCV Internal Control umožňující identifikovat zpracované vzorky, jež obsahují látky, které by mohly při PCR amplifikaci rušit.

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

Vliv kryoglobulinů na COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0 hodnocen nebyl. U vzorků, o nichž je známo, že obsahují vysoké koncentrace kryoglobulinů, je třeba negativní výsledky na HCV RNA interpretovat obezřetně.

Vliv léků proti bakteriálním a plísňovým infekcím na COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0 zjišťován nebyl.

Jako je tomu u každého diagnostického testu, je třeba výsledky z COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0 interpretovat s uvážením všech klinických zjištění a laboratorních nálezů.

S produktem by měli pracovat pouze pracovníci znalí technik PCR.

Produkt se dá používat pouze ve spojení s přístrojem COBAS AMPLICOR Analyzer.

Hodnocení neklinických funkčních parametrů

Analytická citlivost

Použití mezinárodního standardu WHO pro HCV RNA, kód 96/790, ke stanovení meze detekce testu COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0 pro sérum a plazmu s EDTA.

Citlivost testu COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0 byla stanovena analýzou mezinárodního standardu WHO pro HCV RNA, kód NIBSC 96/790. Mezinárodní standard WHO pro HCV RNA 96/790 byl získán mezinárodní spoluprací, kterou koordinovaly britský Národní ústav pro biologické standardy a kontroly (National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC) a nizozemská Ústřední laboratoř transfuzní služby Červeného kříže (CLB). Jedná se o vzorek HCV genotypu 1 obsahující 10⁵ mezinárodních jednotek (IU)/ml.

Zředěné vzorky mezinárodního standardu WHO pro HCV RNA, kód NIBSC 96/790, byly získány zředěním rehydratovaného standardu v HCV-negativní lidské plazmě a HCV-negativním lidském séru na koncentrace 100, 75, 60 a 50 IU/ml na základě přiřazené hodnoty 10⁵ IU/ml. Čtyři pracovníci prováděli vždy po pět dnů 6 opakovaných (replikovaných) analýz koncentrace 75, 60 and 50 IU/ml a čtyři opakované (replikované) analýzy koncentrace 100 IU/ml v plazmě i v séru (celkem po řadě 120 a 80 analýz). Mez detekce byla stanovena jako nejnižší koncentrace HCV poskytující při testu COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0 četnost pozitivní detekce 95 % nebo vyšší. Koncentrace poskytující četnost detekce 95 % činila v případě plazmy s EDTA 50 IU/ml a v případě séra 60 IU/ml. Analýzou Probit činila 95 % mez detekce 43 IU/ml pro plazmu s EDTA a 53 IU/ml pro sérum. Meze detekce v plazmě s EDTA a séru jsou uvedeny v tabulkách 1 a 2.

Tabulka 1
Mez detekce mezinárodního standardu WHO
pro HCV RNA v EDTA plazmě

HCV RNA (IU/ml)	Počet identických opakování (n)	HCV RNA-pozitivních (n)	HCV RNA-pozitivních (%)	*Meze spolehlivosti
100	80	80	100%	95,5 – 100%
75	120	118	98,3%	94,1 – 99,8%
60	120	118	98,3%	94,1 – 99,8%
50	119**	115	96,6%	91,6 – 99,1%

* Exaktní 95% binomické meze spolehlivosti

** Jeden replikát byl HCV a IC negativní

Tabulka 2
Mez detekce mezinárodního standardu WHO pro HCV RNA v séru

HCV RNA (IU/ml)	Počet identických opakování (n)	HCV RNA- pozitivních (n)	HCV RNA- pozitivních (%)	*Meze spolehlivosti
100	80	79	98,8%	93,2 – 100%
75	120	117	97,5%	92,9 – 99,5%
60	120	117	97,5%	92,9 – 99,5%
50	120	112	93,3%	87,3 – 97,1%

* Exaktní 95% binomické meze spolehlivosti

Hodnocení genotypů HCV

Relativní citlivost testu COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0 vůči hlavním genotypům HCV byla stanovena analýzou klinických vzorků (n = 8) od osob infikovaných virem HCV. Testované vzorky zahrnovaly jak běžnější (1a, 1b, 2a, 2b, 3a), tak méně běžné (4a, 5a, 6a) genotypy a subtypy HCV zjištěné ve Spojených státech.³ Podle výchozích koncentrací HCV RNA byly vzorky pro stanovení citlivosti řaděny negativní lidskou plazmou na konečnou koncentraci přibližně (rozmezí ± 2 SD) 100, 75 a 50 IU/ml. Výsledky dosažené s testem COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0 poskytují ekvivalentní detekci (100% detekční četnost) HCV RNA při koncentracích poblíž meze detekce 100 IU/ml (rozmezí 2 SD = 48–208 IU/ml) bez ohledu na genotyp.

Panelová studie serokonverze HCV

Nejranější doba detekce infekce virem HCV pomocí testu COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0 byla porovnána s tradičními sérologickými testy za použití komerčně dostupných panelů serokonverze HCV (n = 9). Každý panel serokonverze HCV reprezentuje dobře charakterizovanou sérii longitudinálně odebraných vzorků od jedné osoby před vývojem anti-HCV a po něm. Každý panelový vzorek byl soupravou COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0 testován ve třech opakováních a alikvotní podíl byl zaslán do Laboratory Corporation of America pro testování na protilátky HCV pomocí testu Abbott 2.0 a ověřovací testování pomocí testu RIBA 3.0. K první detekci HCV RNA v panelech testovaných soupravou COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0 docházelo v průměru 32 dny před první detekcí protilátek HCV, což znamená, že představuje ranější marker pro detekci infekce virem HCV než tradiční sérologické testy.

Analytická specifičnost

Studie inkluzivity genotypů HCV

Specifičnost testu COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0 pro HCV RNA byla zkoušena za použití klinických vzorků reprezentujících hlavní genotypy HCV. Byl testován panel klinických vzorků (n = 87), který zahrnoval 6 genotypů reprezentujících 15 podtypů HCV zjištěných ve Spojených státech³ (1a, 1b, 2a, 2b, 2c, 2d, 3a, 3b, 4a, 4c, 4f, 4g, 4h, 5a a 6a). Všechny klinické vzorky byly v testu COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0 na HCV RNA pozitivní (viz tab. 3).

Tabulka 3
Inkluzivita genotypů HCV

	Genotyp HCV	Počet testovaných vzorků (n)	HCV RNA-positivních n (% správných.)
1	1a	9	9 (100)
2	1b	9	9 (100)
3	2a	12	12 (100)
4	2b	14	14 (100)
5	2c	4	9 (100)
6	2d	1	1 (100)
7	3a	17	17 (100)
8	3b	1	1 (100)
9	4a	3	3 (100)
10	4c	5	5 (100)
11	4f	1	1 (100)
12	4g	1	1 (100)
13	4h	2	2 (100)
14	5a	4	4 (100)
15	6a	4	4 (100)
	CELKEM	87	87 (100%)

Studie non-HCV-virové hepatitidy

Specifičnost testu COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0 pro HCV RNA byla hodnocena testováním na možnou křížovou reaktivitu vzorků s běžnou virovou hepatidou non-C (HBV a HAV). Testem COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0 byly analyzovány vzorky od osob se zvýšenou hladinou HAV-IgM (n = 10), jeden izolovaný vzorek HAV (n = 1) a vzorky s HBsAg (n = 10) a jeden HBV DNA plazmidový vzorek (n = 1) a všechny byly HCV RNA-negativní. COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0 je tedy pro detekci HCV RNA specifický a na běžné viry hepatitidy HAV a HBV nereaguje falešně pozitivními výsledky.

Exkluzivita mikroorganismů

Specifičnost testu COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0 byla hodnocena zkoušením na možnou křížovou reaktivitu na patogenní mikroorganismy a na potenciální kontaminanty z normální epidermální mikroflóry, jež by mohly být ve vzorcích přítomny. Byly testovány vzorky (celkem n = 29) obsahující virové izoláty (n = 25) nebo bakteriální izoláty (n = 4). Všechny vzorky zkoušené testem COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0 byly na HCV RNA negativní (viz tab. 4). Tyto výsledky prokazují, že je COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0 pro HCV RNA specifický a s řadou virů či bakterií, které mohou být ve vzorku přítomny, křížově nereaguje.

Tabulka 4
Analytická specifičnost: Exkluzivita mikroorganismů

	Popis izolátu/vzorku	Počet vzorků (n)	HCV RNA- pozitivních (n)	IC- pozitivních (n)
1	Adenovirus (typy 2, 3 a 7)	3	0	3
2	Enteroviry (včetněechoviru 1 a coxsackieviru B1)	2	0	2
3	Herpes viry [včetněherpes simplex viru (typy 1 a 2), lidského herpes viru (typy 6 a 7), cytomegaloviru (AD-169, Davis a Towne) a varicella zoster viru]	12	0	12
4	HIV-1 (subtypy A-F)	6	0	6
5	HTLV (I a II)	2	0	2
6	Propionibacterium acnes	1	0	1
7	Stafyloky (aureus a epidermis)	3	0	3
	Celkem	29	0	29

Interference

Endogenní látky

K posouzení možného rušivého vlivu endogenních látek byl soupravou COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0 analyzován soubor různých vzorků obsahujících je (hemoglobin, albumin, triglyceridy, imunoglobuliny a bilirubin) ve zvýšené koncentraci. Vzorky se zvýšenými hladinami (rozmezí viz v tab. 5) hemoglobinu (n = 12), albuminu (n = 10), triglyceridů (n = 13), bilirubinu (n = 11) a imunoglobulinů (n = 11) byly hodnoceny v čistém stavu (bez nástřiku HCV) a s nástřikem HCV v blízkosti meze detekce soupravy COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0 (100 IU/ml).

Tabulka 5
Koncentrační rozmezí endogenních látek pro hodnocení jejich rušivého vlivu

Látka ve zvýšené koncentraci	Vysoké normální hladiny (mg/dl)	Testovací hladina CCLS (mg/dl) (pro srovnání)	Rozmezí testovaných koncentrací (mg/dl)
Albumin	5000	6000	4630 – 6100
Bilirubin	0,2	40	1,1 – 60
Hemoglobin	2,5	500	12,2 – 5000
Triglyceridy	190	3000	364 – 3000
Imunoglobuliny	1200	6000	1860 – 8610

Testy všech vzorků byly provedeny trojmo. K hodnocení vzorků poskytujících neobvyklé (diskrepanční) výsledky testu na HCV RNA bylo použito metody HCV alternate primer pair testing. Všechny vzorky s nástřikem HCV (100 IU/ml) byly v testu COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0 na HCV RNA pozitivní, což ukazuje, že zvýšené koncentrace těchto endogenních látek důkaz HCV RNA neruší ani v blízkosti meze detekce. (bez nástřiku HCV) se zvýšenou hladinou endogenních látek byly v testu na HCV RNA soupravou COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0 negativní; jedinou výjimku představovaly dva vzorky se zvýšeným obsahem bilirubinu.

HCV RNA pozitivita u vzorků se zvýšeným bilirubinem byla následně potvrzena testováním za použití metody alternate primer pair testing, používané v případě diskrepancí. U vzorků obsahujících slabě zvýšené až zvýšené hladiny albuminu, bilirubinu, hemoglobinu, triglyceridů a imunoglobulinů nedává souprava COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0 ani falešně pozitivní, ani falešně negativní výsledky.

Exogenní léky

Potenciální rušivý vliv na COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0 byl také zkoumán u léků používaných při výskytu HCV, HIV, HBV a CMV. K tomuto účelu byl každý lék přidáván do HCV RNA-pozitivní (100 IU/ml, poblíž meze detekce) nebo HCV RNA-negativní lidské plazmy ve třech koncentracích (viz tab. 6): bez přídavku (0X C_{max}), v maximální koncentraci v plazmě (1X C_{max}) a v trojnásobku maximální koncentrace v plazmě (3X C_{max}).

Tabulka 6

Souhrn exogenních léků testovaných s ohledem na jejich možný rušivý vliv

#	Obchodní název Název	Generický název Název	Výrobce	1X C _{max}	3X C _{max}	jednotka
1	CRIXIVAN®	Indinavirsulfát	Merck & Co., Inc.	8,98	26,94	µg/ml
2	CYTOVENE®	Ganciclovir	Hoffmann-La Roche	1,18	3,54	µg/ml
3	Epivir®/HBV®	Lamivudin, 3TC	GlaxoSmithKline	1,5	4,5	µg/ml
4	FORTOVASE®	Saquinavir	Hoffmann-La Roche	2,477	7,431	µg/ml
5	HIVID®	Zalcitabin, ddC	Hoffmann-La Roche	25,2	75,6	ng/ml
6	INFERGEN®	Interferon alfacon-1	AMGEN Inc.	0,3	0,9	ng/ml
7	INTRON® A	Interferon alfa-2b	Schering-Plough Corp.	273	819	IU/ml
8	INTRON®A/ REBETOL®	Interferon alfa-2b/ribavirin	Schering-Plough Corp.	3,68	11,04	µg/ml
9	NORVIR®	Ritonavir	Abbott Laboratories	11,2	33,6	µg/ml
10	Paxil®	Paroxetin HCl	GlaxoSmithKline	61,7	185,1	ng/ml
11	PEGASYS®	Peginterferon alfa-2a	Hoffmann-La Roche	18	54	ng/ml
12	PROZAC®	Fluoxetine HCl	Eli Lilly & Co.	302	906	ng/ml
13	RESCRIPTOR®	Delavirdin mesylát	Agouron Pharmaceuticals Inc.	19,3	57,9	µg/ml
14	Retrovir®	Zidovudin	GlaxoSmithKline	1,06	3,18	µg/ml
15	ROFERON®A	Interferon alfa-2a	Hoffmann-La Roche	2,58	7,74	ng/ml
16	Symmetrel®	Amantadin HCl	Endo Pharmaceuticals Inc.	0,51	1,53	µg/ml
17	VIDEX®	Didanosin, ddi	Bristol-Myers Squibb Co.	2,32	6,96	µg/ml
18	VIRACEPT®	Nelfinavir-mesylát	Agouron Pharmaceuticals Inc.	4	12	µg/ml
19	VIRAMUNE®	Nevirapin	Roxane Laboratories, Inc.	4,5	13,5	µg/ml
20	ZADAXIN®	Thymosin alfa 1	SciClone	100	300	ng/ml
21	ZERIT®	Stavudin, d4T	Bristol-Myers Squibb Co.	4,15	12,45	µg/ml
22	ZOLOFT®	Sertralin HCl	Pfizer Inc.	190,2	570,6	ng/ml

Každá analýza byla provedena trojmo. Léky testované v rámci této studie nedávaly výsledky ani falešně negativní, ani falešně pozitivní. Při všech koncentracích léků byly všechny HCV-pozitivní vzorky při použití soupravy COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0 pozitivní na HCV RNA a všechny HCV-negativní vzorky byly negativní na HCV RNA. Léky testované v rámci této studie tedy nenarušují schopnost soupravy COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0 detekovat HCV RNA. souprava COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0 je tedy možno používat i k testování vzorků od pacientů podrobujících se léčbě za užívání celé řady léčivých přípravků proti infekci virem HCV a infekcím průvodním.

Průvodní infekce k HCV

Potenciální rušivý vliv na COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0 byl také zkoumán u vzorků od pacientů s průvodními infekcemi k HCV (HAV, HBV a HIV). Byly testovány tyto vzorky sérologicky pozitivní na HCV/virovou koinfekci: HBV/HCV (n = 8), HIV/HCV (n = 10), HIV/HBV/HCV (n = 5) a HAV/HBV/HCV (n = 2). Každý vzorek byl analyzován trojmo a k hodnocení vzorků, jejichž výsledky testu na HCV RNA neodpovídaly výsledkům sérologickým, byla použita metoda HCV alternate primer pair testing. Čtyři HCV-seropozitivní vzorky byly v testu COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0 HCV RNA negativní: jednalo se o jeden vzorek HBV/HCV, jeden vzorek HIV/HBV/HCV a dva vzorky HAV/HBV/HCV. Výsledky s Internal Control u těchto vzorků byly pozitivní, což ukazuje, že PCR reakce inhibovány nejsou, a výsledky testu ležely v mezích specifikací. U všech čtyř vzorků byly výsledky ze všech tří střídavých primerových párů také negativní, což poukazuje na nepřítomnost HCV RNA. Koinfekce viry HAV, HBV, resp. HIV v HCV-seropozitivním vzorku tedy schopnost soupravy COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0 detekovat HCV RNA nenarušuje. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 7.

Tabulka 7
Rušivý vliv průvodních infekcí k HCV

Vzorek s průvodní infekcí	Počet vzorků (n)	HCR RNA-pozitivních (n)	IC-platných (n)	
1	HBV/HCV	8	7*	8
2	HIV/HCV	10	10	10
3	HIV/HBV/HCV	5	4*	5
4	HAV/HBV/HCV	2	0*	2
Celkem		25	21	25

**Čtyři vzorky, jež byly v testu soupravou COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0 na HCV RNA negativní, byly na HCV RNA také negativní při testování metodou alternate primer pair testing (testování v případě diskrepance).*

Klinické hodnocení

Cíle a metody klinické studie Ve čtyřech hepatologických centrech v různých zeměpisných oblastech Spojených států byla provedena perspektivní multicentrická klinická studie za účelem zhodnocení klinické použitelnosti soupravy COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0 k diagnostice aktivní infekce virem HCV u pacientů s biochemickými, klinickými nebo histologickými doklady jaterní choroby. Funkčnost testu byla posouzena porovnáním se dvěma standardy: (1) anti-HCV sérologií a (2) kombinací anti-HCV sérologie, hladiny ALT v séru a histologie jater.

Byly hodnoceny dvě populace pacientů:

1. „Obecná skupina“. Pacienti vyšetřovaní na infekci virem HCV nebo jaterní chorobu, kteří předtím na infekci virem HCV léčení nebyli a nepodstoupili transplantaci jater.

2. „Již dříve léčená skupina“. Pacienti, kteří byli již dříve léčení na infekci virem HCV a nepodstoupili transplantaci jater. Ze studie byli vyloučeni pacienti, kteří podstoupili v době 6 měsíců před vstupním vyšetřením antivirovou terapii.

Lékař, který pacienta posuzoval, zaznamenal na základě anamnézy, tělesného vyšetření a laboratorních výsledků z doby před zařazením do studie jeho klinickou diagnózu (sem spadala například chronická infekce virem HCV, alkoholická jaterní choroba, primární biliární cirrhóza apod.). V řadě případů měl lékař přístup k výsledkům z anti-HCV sérologie v době vstupního vyšetření, výsledky HCV RNA však byly zaskrypy. U všech pacientů byly provedeny testy na alanin transaminázu (ALT) v séru. V případech, kdy bylo v minulosti provedeno histologické vyšetření jater, byly vyžádány kopie histologických nálezů.

Byly odebrány vzorky séra resp. plazmy s EDTA a soupravou COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0 byly testovány na HCV RNA a metodou enzymové imunoanalýzy na protilátky HCV (anti-HCV EIA). Všechny vzorky, které byly opakovaně anti-HCV EIA reaktivní, byly také testovány metodou rekombinantní imunoblot analýzy (RIBA). Testy RIBA byly provedeny u EIA-pozitivních vzorků, nikoli však u vzorků EIA-negativních. Při interpretaci výsledků anti-HCV EIA a RIBA bylo postupováno podle pokynů na příbalových letáčích výrobce. Výsledky ze zkoušek soupravou COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0 byly interpretovány podle pokynů v metodické příručce

Výsledky zkoušení soupravou COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0 a výsledky z anti-HCV EIA a RIBA sérologie byly vzájemně porovnány. U podsouboru pacientů, u kterých byl k dispozici jaterní histologický nález, byl výsledek testu COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0 dále hodnocen porovnáním s anti-HCV sérologií, hladinou alanin-transaminázy (ALT) v séru a jaterním histologickým nálezem.

Výsledky klinické studie Od 848 pacientů zařazených do studie bylo získáno 1038 vzorků. Průměrný věk těchto pacientů byl 46 let, podíl mužů činil 54,5 % a podíl kavkazské (bělošské) rasy byl 71,8 %. Důvodem, proč na hepatologickou kliniku docházeli, byla předchozí diagnóza viru HCV (40,2 %), vyhodnocení HCV (34,7 %) a posouzení jaterní choroby (25,8 %).

Průměrná hladina ALT u pacientů zařazených do studie byla 95,5 IU/ml (rozmezí 7668 IU/ml). Histologický nález byl k dispozici u 51,7% pacientů. Podíl pacientů, kteří již byli v minulosti na HCV léčení, ale léčba byla ukončena před dobou delší než 6 měsíců před zařazením do studie, činil 18,2%. Klinickou diagnózou v době zařazení do studie byla chronická infekce virem HCV (72,9 %), autoimunitní hepatitida (2,2 %), alkoholická jaterní choroba (5,5 %), chronická infekce virem hepatitidy B (4,4 %), primární biliární cirrhóza (5,3 %) nebo jiná (13,7 %). Počet vzorků hodnocených v rámci studie, jejich typ a skladovací podmínky jsou shrnuty v tabulce 8.

Tabulka 8
Výsledky testu COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0: Počet, typ a skladovací podmínky vzorků
hodnocených na klinických pracovištích zapojených do studie

Typ vzorku	Pracovištěč. 1	Pracovištěč. 2	Pracovištěč. 3	Pracovištěč. 4	Celkem
Sérum (-20°C až -80°C)	101	321	228	158	808
Sérum (2°C až 8°C)	35	0	35	0	70
Plazma s EDTA (-20°C až -80°C)	0	0	35	125	160
Součty	136	321	298	283	1038

Výsledky v klinických podmínkách v porovnání s anti-HCV sérologií
Sérologie

Výsledky testu COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0 v porovnání s anti-HCV sérologií byly na všech čtyřech pracovištích podobné. údaje za všechna čtyři pracoviště jsou shrnuty v tab. 9, kde jsou uvedeny výsledky pro sérum a plazmu s EDTA za obě skupiny pacientů obecnou skupinu i skupinu již dříve léčenou. Tato data jsou shrnuta pro všechna pracoviště jsou obsaženy v tabulce 9. Tato tabulka obsahuje výsledky pro sérum a plazmu s EDTA u obecné skupiny pacientů a u skupiny pacientů již dříve léčených.

Tabulka 9
Výsledky testu OBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0 v séru and plazmě s EDTA v porovnání s anti-HCV sérologií u obecné skupiny pacientů a u skupiny pacientů již dříve léčených

Serologické výsledky	Sérum			Plazma s EDTA		
	PCR-pozitivních: (n vzorků)	PCR-negativních: (n vzorků)	Podíl souhlasících s výsledkem EIA (%) (95% IS)*	PCR-pozitivních: (n vzorků)	PCR-negativních: (n vzorků)	Podíl souhlasících s výsledkem EIA (%) (95% IS)*
Obecná skupina pacientů						
EIA+/RIBA +	437	21	95,4 (93,08; 97,14)	89	5	94,7 (88,02; 98,25)
EIA+/RIBA IND	16	10	61,5 (40,57; 79,77)	2	2	50,0 (6,76; 93,24)
EIA+/RIBA -	0	1	0,0 (0,0; 97,50)	0	0	
EIA -	3 [‡]	217	98,6 (96,07; 99,72)	1	24	96,0 (79,65; 99,90)
Skupina pacientů již dříve ve léčených						
EIA+/RIBA +	148	11	93,1 (87,96; 96,50)	31	6	83,8 (67,99; 93,81)
EIA+/RIBA IND	3	0	100,0 (29,24; 100,0)	0	0	
EIA+/RIBA -	0	0		0	0	
EIA -	0	0		0	0	

* Meze spolehlivosti získané exaktní binomickou metodou

‡ Jeden další vzorek ve studii poskytoval nejednoznačný výsledek, který se při duplicitním retestu PCR ukázal jako pozitivní (opakovaný výsledek 1 = negativní, opakovaný výsledek 2 = nejednoznačný).

Mezi RIBA-potvrzenými EIA-pozitivními pacienty v obou skupinách byla HCV RNA detekována u většiny (84–95 %) vzorků s oběma matricemi. U pacientů v obecné skupině byla HCV RNA detekována v 62 % vzorků séra a 50 % vzorků plazmy s EDTA a u žádného z dříve léčených pacientů, s neurčitou sérologií RIBA. Všichni EIA-negativní pacienti patřili do obecné skupiny a většina těchto vzorků byla HCV RNA negativních (99 % vzorků séra a 96 % vzorků plazmy s EDTA). To znamená, že mezi výsledky COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0 a výsledky anti-HCV sérologie jak v obecné skupině, tak ve skupině dříve léčených pacientů byla dobrá shoda.

**Klinické výsledky
v porovnání
se sérologickými,
biochemickými
a histologickými nálezy**

Výsledky zkoušek COBAS AMPLICOR test byly dále hodnoceny porovnáním s anti-HCV sérologií, hladinou alanin-transaminázy (ALT). Výsledky zkoušek COBAS AMPLICOR test byly dále hodnoceny porovnáním s anti-HCV sérologií, hladinou alanin-transaminázy (ALT) a histologií jater. Údaje z porovnání výsledků COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0 se sérologickými, biochemickými a histologickými nálezy jsou uvedeny v tab. 10.

Tabulka 10
Výsledky zkoušek COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0 v séru a plazmě s EDTA v porovnání se sérologickými, biochemickými a histologickými nálezy - obecná skupina

Sérologické výsledky	Sérum			Plazma s EDTA		
	PCR-pozitivních: (n při padů)	PCR-negativních: (n při padů)	Podíl souhlasících s výsledkem EIA (%) (95% IS)*	PCR-pozitivních: (n při padů)	PCR-negativních: (n při padů)	Podíl souhlasících s výsledkem EIA (%) (95% IS)*
Zvýšený ALT a histologický nálezh hepatitidy						
EIA+/RIBA +	162	2	98,8 (95,67; 99,85)	21	0	100,0 (83,89; 100,0)
EIA+/RIBA IND	4	0	100,0 (39,76; 100,0)	1	0	100,0 (2,50; 100,0)
EIA+/RIBA –	0	0		0	0	
EIA –	0	16	100,0 (79,41; 100,0)	0	1	100,0 (2,50; 100,0)
Normální ALT a histologický nálezh hepatitidy						
EIA+/RIBA +	57	0	100,0 (93,73; 100,0)	10	0	100,0 (69,15; 100,0)
EIA+/RIBA IND	1	0	100,0 (2,50; 100,0)	0	0	
EIA+/RIBA –	0	0		0	0	
EIA –	0	9	100,0 (66,37; 100,0)	0	0	
Zvýšený ALT bez nálezu hepatitidy při histologickém vyšetření						
EIA+/RIBA +	3	1	75,0 (19,41; 99,37)	1	0	100,0 (2,50; 100,0)
EIA+/RIBA IND	0	0		0	0	
EIA+/RIBA –	0	0		0	0	
EIA –	1	28	96,6 (82,24; 99,91)	0	0	
Normální ALT bez nálezu hepatitidy při histologickém vyšetření						
EIA+/RIBA +	1	2	33,3 (0,84; 90,57)	0	0	
EIA+/RIBA IND	1	0	100,0 (2,50; 100,0)	0	0	
EIA+/RIBA –	0	0		0	0	
EIA –	1	32	97,0 (84,24; 99,92)	0	1	100,0 (2,50; 100,0)

* Meze spolehlivosti získané exaktní binomickou metodou

Mezi pacienty obecné skupiny se zvýšenou hladinou ALT a histologickým nálezem hepatitidy, kteří měli pozitivní anti-HCV EIA i RIBA, byla HCV RNA detekována v 98,8 % sérových vzorků a 100 % vzorků plazmy s EDTA. HCV RNA byla detekována u 100 % EIA-pozitivních a RIBA-nejistých vzorků séra a plazmy s EDTA. HCV RNA nebyla zjištěna v séru ani v plazmě s EDTA u 100 % EIA-negativních pacientů v této kategorii. U těchto EIA-negativních pacientů, i když měli histologický nález hepatitidy, nebyly projevy v souladu s HCV, nýbrž poukazovaly na autoimunitní hepatitidu, onemocnění virem hepatitidy B nebo nespecifický zánět jater.

Mezi pacienty obecné skupiny s normální hladinou ALT a histologickým dokladem hepatitidy byla v RIBA-potvrzených EIA-pozitivních případech HCV RNA detekována ve 100 % vzorků séra a plazmy s EDTA. HCV RNA nebyla v séru detekována v žádném z EIA-negativních případů; vzorky plazmy s EDTA od pacientů v této kategorii žádné neexistovaly. HCV RNA byla detekována v séru v jednom EIA-pozitivním případě, kde byla RIBA nejednoznačná. Histologické projevy hepatitidy u EIA-negativních případů také poukazovaly na jiná onemocnění než na infekci virem HCV.

U pacientů se zvýšenou hladinou ALT bez nálezu hepatitidy v histologii jater byla v EIA-pozitivních, RIBA-potvrzených případech HCV RNA detekována v 75 % vzorků séra a 100 % vzorků plazmy s EDTA. EIA byla negativní ve většině (29/33, tedy 88 %) případů v této kategorii, kde jaterní choroba (tj. zvýšený ALT) byla způsobena jinou příčinou než hepatitidou. U těchto EIA-negativních případů nebyla HCV RNA zjištěna v 96,6 % vzorků séra; vzorky plazmy s EDTA u této kategorie pacientů žádné neexistovaly. V této kategorii nebyly žádné EIA-pozitivní, RIBA-nejednoznačné případy.

U pacientů s normální hladinou ALT, u kterých nebyly žádné doklady hepatitidy v histologii jater, byla většina případů anti-HCV EIA-negativních. V této kategorii byly tři RIBA-potvrzené EIA-pozitivní případy. U žádných z nich nebyl k dispozici vzorek plazmy s EDTA a v séru byla HCV RNA detekována v jednom (33,3 %) z těchto případů. Nebyla detekována u 97,0 % EIA-negativních pacientů v této kategorii, u nichž byl k dispozici vzorek séra. Histologie sice v těchto případech prokazovala jaterní chorobu, ale projevy nepoukazovaly na hepatitidu. V onom jednom sérovém vzorku, který byl EIA-pozitivní a kde RIBA byla nejednoznačná, byla HCV RNA detekována.

Údaje porovnávací výsledky zkoušky COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0 se sérologickými, biochemickými a histologickými nálezy u skupiny pacientů již dříve léčených podává tabulka 11.

Tabulka 11
Výsledky zkoušek COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0
ve vzorcích séra a plazmy s EDTA v porovnání se sérologickými,
biochemickými a histologickými nálezy - skupina pacientů již dříve léčených

Serologické výsledky	Sérum			Plazma s EDTA		
	PCR-pozitivních: (n při padů)	PCR-negativních: (n při padů)	Podíl souhlasících s výsledkem EIA (%) (95% IS)*	PCR-pozitivních: (n při padů)	PCR-negativních: (n při padů)	Podíl souhlasících s výsledkem EIA (%) (95% IS)*
Zvýšený ALT a histologický nálezh hepatitidy						
EIA+/RIBA +	82	2	97,6 (91,66; 99,71)	16	1	94,1 (71,31; 99,85)
EIA+/RIBA IND	3	0	100,0 (2,50; 100,0)	0	0	
EIA+/RIBA –	0	0		0	0	
EIA –	0	0		0	0	
Normální ALT a histologický nálezh hepatitidy						
EIA+/RIBA +	22	4	84,6 (65,13; 95,64)	3	2	60,0 (14,66; 94,73)
EIA+/RIBA IND	0	0		0	0	
EIA+/RIBA –	0	0		0	0	
EIA –	0	0		0	0	
Zvýšený ALT bez nálezu hepatitidy při histologickém vyšetření						
EIA+/RIBA +	2	1	66,7 (9,43; 99,16)	1	0	100,0 (2,50; 100,0)
EIA+/RIBA IND	0	0		0	0	
EIA+/RIBA –	0	0		0	0	
EIA –	0	0		0	0	
Normální ALT bez nálezu hepatitidy při histologickém vyšetření						
EIA+/RIBA +	2	0	100,0 (15,81; 100,0)	1	0	100,0 (2,50; 100,0)
EIA+/RIBA IND	0	0		0	0	
EIA+/RIBA –	0	0		0	0	
EIA –	0	0		0	0	

* Meze spolehlivosti získané exaktní binomickou metodou

Žádný z pacientů ve skupině osob již dříve léčených nebyl EIA-negativní; všechny vzorky od pacientů této kategorie byly anti-HCV EIA-pozitivní.

Mezi pacienty již dříve léčenými, kteří měli zvýšenou hladinu ALT a doklady hepatitidy v histologii jater, byla v RIBA-potvrzených EIA-pozitivních případech HCV RNA detekována v 97,6 % vzorků séra a 94,1 % vzorků plazmy s EDTA. HCV RNA byla také detekována ve všech třech (100 %) EIA-pozitivních vzorcích séra, u kterých byl test RIBA nejednoznačný.

Mezi dříve léčenými pacienty s normální hladinou ALT a doklady hepatitidy v histologii jater byla v RIBA-potvrzených EIA-pozitivních případech HCV RNA detekována v 84,6 % vzorků séra a 60 % vzorků plazmy s EDTA. U pacientů se zvýšenou hladinou ALT a bez histologických dokladů hepatitidy byla v RIBA-potvrzených EIA-pozitivních případech HCV RNA detekována v 66,7 % vzorků séra a 100 % vzorků plazmy z EDTA.

HCV RNA byla detekována ve 100 % RIBA-potvrzených EIA-pozitivních vzorcích séra i plazmy s EDTA od pacientů s normální hladinou ALT a bez histologických dokladů hepatitidy.

Shrnutí a závěry

Vyhodnocení testu na HCV COBAS AMPLICOR, v2.0 prokázalo, že tento test u obecné skupiny pacientů i u skupiny pacientů již dříve léčených vysoce koreluje s anti-HCV sérologií; to se týká jak séra, tak plazmy s EDTA.

Vysoký soulad vykázal COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0 také v porovnání se sérologickými, biochemickými a histologickými nálezy jak v obecné skupině pacientů, tak ve skupině pacientů již dříve léčených, a to jak ve vzorcích séra, tak ve vzorcích plazmy s EDTA.

Celkové výsledky studie prokazují, že COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0 je klinicky využitelný u pacientů vyšetřovaných na infekci virem HCV nebo na jaterní chorobu. Testy jsou užitečné při potvrzování diagnózy aktivní infekce virem HCV.

Reprodukovatelnost

K vyhodnocení reprodukovatelnosti výsledků testů COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0 byly studovány panely po šesti vzorcích, jeden připravený ve zmrazeném séru a druhý ve zmrazené plazmě s EDTA. Byly připraveny čtyři HCV-positivní vzorky, a to zředěním tří klinických vzorků HCV genotypu 1 tak, že nominální koncentrace HCV RNA byly 50, 75, 100 a 200 IU/ml. Zbývající dva vzorky neobsahovaly žádné zjizitelné množství HCV RNA. Reprodukovatelnost byla vyhodnocována napříč pracovišti, dny a šaržemi činidel. Každou matici testovali vždy dva pracovníci na třech pracovištích (ve dvou klinických referenčních laboratořích a v jedné laboratoři Roche Molecular Systems). Každý pracovník provedl pětidenní testování tří šarží činidel. K posouzení výsledků v rámci jednoho dne byly při každém měření testovány tři alikvotní podíly každého vzorku.

Studie poskytla 3209 výsledků, které jsou shrnuty pro vzorky séra v tabulce 12 a pro vzorky plazmy s EDTA v tabulce 13. Negativní výsledky byly získány u 100 % z oněch > 500 HCV RNA-negativních vzorků každé matrice, pro celkové výsledky i pro každou studovanou proměnnou (tab. 12.A, 12.C, 13.A a 13.C). Studie prokázala u HCV RNA-negativních vzorků dokonalou reprodukovatelnost kvalitativních výsledků.

Reprodukovatelnost u vzorků obsahujících HCV RNA byla také hodnocena porovnáním četností pozitivních výsledků pro proměnné v rámci studie (tab. 12.B a 13.B). U každé koncentrace HCV RNA se všechny intervaly spolehlivosti u každé proměnné v rámci studie překrývaly (viz druhou poznámku pod čarou v tab. 12 a 13). Pozorované rozdíly mezi kterýmikoliv četnostmi pozitivních výsledků v rámci proměnné pro danou koncentraci HCV RNA jsou tedy zřejmě náhodné. Tyto výsledky prokazují reprodukovatelnost i u vzorků obsahujících HCV RNA.

Je zde několik zajímavých trendů. U vzorků séra s nejvyšší koncentrací HCV RNA (200 IU/ml) bylo rozmezí četností pozitivních výsledků 99–100 % mezi pracovišti a mezi šaržemi a 98–100 % mezi jednotlivými dny; to jsou u vzorků séra nejužší rozmezí četností pozitivních výsledků (nejvyšší reprodukovatelnost). U vzorků séra s 50 IU/ml bylo rozmezí četností pozitivních výsledků mezi jednotlivými pracovišti 85–89 %, mezi různými šaržemi 78–91 % a mezi jednotlivými dny 80–93%. Obě posledně uvedená rozmezí představují nejširší rozmezí četností pozitivních výsledků (nejnižší reprodukovatelnost) ze všech vzorků a jedná se o nejnižší koncentraci HCV RNA. Podobně se s koncentrací HCV RNA mění reprodukovatelnost i u vzorků plazmy s EDTA.

U každé koncentrace HCV RNA v séru je rozmezí četností pozitivních výsledků mezi různými pracovišti méně široké (což poukazuje na vyšší reprodukovatelnost) než mezi různými šaržemi nebo mezi jednotlivými dny.

Tyto údaje prokazují reprodukovatelnost výsledků analýzy COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0 napříč šaržemi činidel, pracovišti, dny i matricemi vzorku.

**Poznámky
k nejednoznačným
(GZ) výsledkům**

Vzorky pro studii reprodukovatelnosti, které poskytly nejednoznačný (GZ) výsledek, nebyly opakovaně testovány (podle části „Interpretace výsledků“), takže pro ně nebyl získán žádný konečný výsledek. Dá se rozumně předpokládat, že pokud by byl opakovaný test býval proveden, četnost pozitivních výsledků by byla vzrostla. Vyloučením nejednoznačných výsledků bylo například 95 % prahu pozitivních výsledků dosaženo u séra i u plazmy s EDTA při 50 IU/ml, čili 1,8 log₁₀ IU/ml. Tato zjištění jsou podobná těm, která získáme, provedeme-li stejný výpočet u údajů ze studie meze detekce se standardem WHO (viz část „Analytická citlivost“).

COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0 obvykle poskytoval ≥ 95 % pozitivních výsledků u nižších koncentrací HCV testovaného genotypu ve vzorcích plazmy s EDTA než v séru (tab. 1, 2, 12 a 13); mezimaticové rozdíly však byly malé (= 0,3 log₁₀ IU/ml) a zřejmě nemají vliv na indikaci pro použití (viz části „Zamýšlené použití“ a „Klinické hodnocení“).

Tabulka 12
Reprodukovatelnost: Vzorky séra
A. Celkové četnosti výsledků

HCV RNA		No. testováno*	Výsledky testu COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0				
			Nejednoznačná zóna (0,15 ≤ A ₆₆₀ ≤ 1,0)		Pozitivní zóna (A ₆₆₀ ≥ 1,0)		
IU/ml	(log ₁₀ IU)/ml		No.	%	No.	%*	CI **
200	2,3	267	1	0,4 %	266	99,6 %	98–100 %
100	2,0	268	7	3 %	257	96 %	93–98 %
75	1,9	266	12	5 %	249	94 %	90–96 %
50	1,7	269	32	12 %	233	87 %	82–91 %
			Nejednoznačná zóna		Negativní zóna (A ₆₆₀ < 0,15)		
0	–	531	0		531	100%	99–100 %

**B. Proměnné v rámci studie: Četnosti pozitivních výsledků ($A_{660} = 1,0$)*
u vzorků obsahujících HCV RNA**

HCV RNA/ml IU	\log_{10} IU	Mezi pracovišti			Mezi šaržemi			Mezi jednotlivými dny		
		Místo	Počet/testov. počet	%	Lot	Počet/testov. počet	%	Den	Počet/testov. počet	%
200	2,3	A	86/87	99 %	1	90/90	100 %	1	54/54	100 %
		B	90/90	100 %	2	87/88	99 %	2	54/54	100 %
		C	90/90	100 %	3	89/89	100 %	3	53/53	100 %
								4	55/55	100 %
								5	50/51	98 %
100	2,0	A	83/88	94 %	1	84/89	94 %	1	50/53	94 %
		B	88/90	98 %	2	88/90	98 %	2	51/54	94 %
		C	86/90	96 %	3	85/89	96 %	3	52/54	96 %
								4	55/57	97 %
								5	49/50	98 %
75	1,9	A	82/86	95 %	1	80/88	91 %	1	49/53	93 %
		B	83/90	92 %	2	83/90	92 %	2	53/54	98 %
		C	84/90	93 %	3	86/88	98 %	3	48/52	92 %
								4	51/56	91 %
								5	48/51	94 %
50	1,7	A	76/89	85 %	1	70/90	78 %**	1	50/54	93 %
		B	80/90	89 %	2	82/90	91 %**	2	46/54	85 %
		C	77/90	86 %	3	81/89	91 %	3	48/54	89 %
								4	49/57	86 %
								5	40/50	80 %

**C. Proměnné v rámci studie: četnosti negativních výsledků
($A_{660} < 0,15$) u vzorků bez HCV RNA**

Poč. HCV RNA	Mezi pracovišti			Mezi šaržemi			Mezi jednotlivými dny		
	Pracov.	Počet/testov. počet	%	Lot	Počet/testov. počet	%	Den	Počet/testov. počet	%
	A	172/172	100 %	1	176/176	100 %	1	106/106	100 %
	B	179/179	100 %	2	180/180	100 %	2	107/107	100 %
	C	180/180	100 %	3	175/175	100 %	3	106/106	100 %
							4	114/114	100 %
							5	98/98	100 %

* V těchto výpočtech byly do jmenovatele (testovaný počet) zařazeny i nejednoznačné výsledky, nikoli však výsledky potenciálně inhibované.

** Exaktní 95% binomický interval spolehlivosti vypočten v B. pouze pro dvě nejvíce se lišící četnosti u jedné proměnné (50 IU/ml, mezi jednotlivými šaržemi): šarže č. 1: interval spolehlivosti CI = 68–86 %, šarže č. 2: CI = 83–96 %; všechny analogické intervaly spolehlivosti se také překrývají.

Tabulka 13
Reprodukovatelnost: vzorky plazmy s EDTA
A. Celková četnost výsledků

HCV RNA IU/ml	$(\log_{10}$ IU)/ml	No. testováno*	Výsledky testu COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0				
			Nejednoznačná zóna ($0,15 \leq A_{660} < 1,0$)		Pozitivní zóna ($A_{660} \geq 1,0$)		
			No.	%	No.	% *	CI **
200	2,3	268	1	0,4 %	266	99,3 %	97–100 %
100	2,0	269	6	2 %	262	97 %	95–99 %
75	1,9	270	6	2 %	262	97 %	94–99 %
50	1,7	269	20	7,4 %	240	89 %	85–93 %
			Nejednoznačná zóna		Negativní zóna ($A_{660} < 0,15$)		
0	–	532	0		532	100 %	99–100 %

**B. Proměnné v rámci studie: Četnosti pozitivních výsledků ($A_{660} = 1,0$)*
u vzorků obsahujících HCV RNA**

HCV RNA/ml IU	\log_{10} IU	Mezi pracovišti			Mezi šaržemi			Mezi jednotlivými dny		
		Místo	Počet/testov. počet	%	Lot	Počet/testov. počet	%	Den	Počet/testov. počet	%
200	2,3	A	88/89	99 %	1	87/89	98 %	1	53/53	100 %
		C	89/90	99 %	2	90/90	100 %	2	54/54	100 %
		D	89/89	100 %	3	89/89	100 %	3	53/54	98 %
								4	55/56	98 %
								5	51/51	100 %
100	2,0	A	84/89	94 %	1	88/89	99 %	1	53/53	100 %
		C	89/90	99 %	2	88/90	98 %	2	53/54	98 %
		D	89/90	99 %	3	86/90	96 %	3	52/54	96 %
								4	54/57	95 %
								5	50/51	98 %
75	1,9	A	88/90	98 %	1	86/90	96 %	1	51/54	94 %
		C	88/90	98 %	2	87/90	97 %	2	52/54	96 %
		D	86/90	96 %	3	89/90	99 %	3	54/54	100 %
								4	55/57	97 %
								5	50/51	98 %
50	1,7	A	80/89	90 %	1	79/90	88 %	1	45/53	85 %**
		C	83/90	92 %	2	81/89	91 %	2	52/54	96 %**
		D	77/90	86 %	3	80/90	89 %	3	50/54	93 %
								4	49/57	86 %
								5	44/51	86 %

C. Proměnné v rámci studie: četnosti negativních výsledků ($A_{660} < 0,15$) u vzorků bez HCV RNA

Poč. HCV RNA	Mezi pracovišti			Mezi šaržemi			Mezi jednotlivými dny		
	Pracov.	Počet/testov. počet	%	Lot	Počet/testov. počet	%	Den	Počet/testov. počet	%
	A	172/172	100 %	1	178/178	100 %	1	107/107	100 %
	C	180/180	100 %	2	175/175	100 %	2	105/105	100 %
	D	180/180	100 %	3	179/179	100 %	3	107/107	100 %
							4	113/113	100 %
							5	100/100	100 %

* V těchto výpočtech byly do jmenovatele (testovaný počet) zařazeny i nejednoznačné výsledky, nikoli však výsledky potenciálně inhibované.

**Exaktní 95% binomický interval spolehlivosti vypočten v B. pouze pro dvě nejvíce se lišící četnosti u jedné proměnné (50 IU/ml, mezi jednotlivými dny): 1. den: interval spolehlivosti CI = 72–93 %, 2. den: CI = 87–100 %; všechny analogické intervaly spolehlivosti se také překrývají.

Literatura

1. Choo, Q-L., Weiner, A.J., Overby, L.R. et al. 1990. Virus hepatitidy C: Hlavní způsobující činitel virové hepatitidy non-a a non-b. *British Medical Bulletin* **46**:423–441.
2. Alter, H. 1991. Descartes before the horse: I clone, therefore I am: The hepatitis C virus in current perspective. *Annals of Internal Medicine* **115**:644–649.
3. Alter, M.J., D. Kruszon-Moran, O.V. Nainan, G.M. McQuillan, F. Gao, L.A. Moyer, R.A. Kaslow and H.S. Margolis. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. *N Engl J Med* 1999; **341(8)**:556–562.
4. Gretch, D.R. 1996. Diagnostic tests for hepatitis C. *Hepatology* **26 (suppl. 1)**: 43S–47S.
5. Schiff, E.R., M. de Medina and R.S. Kahn. 1999. New Perspectives in the Diagnosis of Hepatitis C. *Seminars In Liver Disease* **19 (suppl.1)**: 3–15.
6. Lok, A.S. and N.T. Gunaratnam. 1997. Diagnosis of hepatitis C. *Hepatology* **26 (suppl.1)**: 48S–56S.
7. Damen, M., H.L. Zaaijer, H.T. Cuyppers, H. Vrieling, C.L. van der Poel, H.W. Reesink and P.N. Lelie. 1995. Reliability of the third-generation recombinant immunoblot assay for hepatitis C virus. *Transfusion* **35**: 745–749.
8. NIH. 1997. Management of Hepatitis C. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement #105.
9. 1998. Recommendations for Prevention and Control of Hepatitis C Virus (HCV) Infection and HCV-Related Chronic Disease. *MMWR*, Vol. 47, No. RR-19.
10. Pawlotsky, J-M, A. Bastie, C. Pellet, J. Remire, F. Darthuy, L. Wolfe, C. Sayada, J. Duval and D. Dhumeaux. 1996. Significance of Indeterminate Third-Generation Hepatitis C Virus Recombinant Immunoblot Assay. *Journal of Clinical Microbiology*. **34**: 80–83.
11. Lu, R.H., S.J. Hwang, C.Y. Chan, F.Y. Chang and S.D. Lee. 1998. Quantitative measurement of serum HCV RNA in patients with chronic hepatitis C: comparison between AMPLICOR HCV monitor system and branched DNA signal amplification assay. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* **12**: 121–125.
12. Gretch, D., D. de la Rosa, L. Corey and R. Carithers. 1996. Assessment of hepatitis C viremia using molecular amplification technologies. *Viral Hepatitis Reviews* **2**: 85–96.
13. Young, K.Y., Resnick, R. and Myers, T.W. 1993. Detection of hepatitis C virus RNA by a combined reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. *Journal of Clinical Microbiology* **31**:882-886.

14. Myers, T.W. and Gelfand, D.H. 1991. Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase. *Biochemistry* **30**:7661–7666.
15. Stuyver, L., Rossau, R., Wyseur, A. et al. 1993. Typing hepatitis C virus isolates and characterization of new subtypes using a line probe assay. *Journal of General Virology* **74**:1093–1102.
16. Machida, A., Ohnuma, H., Tsuda, F. et al. 1992. Two distinct subtypes of hepatitis C virus defined by antibodies directed to the putative core protein. *Hepatology* **16**:886–891.
17. Bukh, J. R. Purcell and R. Miller. 1992. Importance of primer selection for the detection of hepatitis C virus RNA with the polymerase chain reaction assay. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **89**: 187–191.
18. Bukh, J., Purcell, R.H. and Miller, R.H. 1992. Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **89**:4942–4946.
19. Okamoto, H., Okada, S., Sugiyama, Y. et al. 1990. The 5' -terminal sequence of hepatitis C virus genome. *Japanese Journal of Experimental Medicine* **60**:167–177.
20. 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.
21. Richmond, J.Y. and McKinney, R.W. eds. 1999. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*. HHS Publication Number (CDC) 93-8395.
22. NCCLS. *Protection of Laboratory Workers from Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids, and Tissue*. Approved Guideline. NCCLS Document M29-A Villanova, PA:NCCLS, 1997.
23. International Air Transport Association. *Dangerous Goods Regulations*, 41st Edition. 2000. 704 pp.



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



Distributed by

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

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

Roche Diagnostics (Schweiz) AG
CH-6343 Rotkreuz

Roche Diagnostics
F-38240 Meylan

Roche Diagnostics GmbH
D-68298 Mannheim, Germany

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

Roche Diagnostics S.L.
E-08006 Barcelona

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

United States:

Roche®, CYTOVENE®, FORTOVASE®, HIVID®, PEGASYS® and ROFERON®A jsou registrované obchodní známky společnosti Hoffmann-La Roche Inc.

AMPLICOR®, AMPLILINK® and AmpErase® jsou registrované obchodní známky a COBAS AMPLICOR™ je obchodní známka společnosti Roche Molecular Systems, Inc, licencované subjektu Roche Diagnostics Corporation.

Roche Response Center® je registrovaná známka služby společnosti Roche Diagnostics Corporation.

Ostatní země:

Výše uvedené obchodní známky buď ve vlastnictví nebo v licencovaném používání dceřiné společnosti firmy Roche, jež produkt distribuuje.

CRIXIVAN® je registrovaná obchodní známka společnosti Merck & Co., Inc.

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

Epivir-HBV®, Paxil® and Retrovir® jsou registrované obchodní známky společnosti GlaxoSmithKline.

Eppendorf Multipette® and Eppendorf Combitip® jsou registrované obchodní známky společnosti Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Německo.

INFERGEN® je registrovaná obchodní známka společnosti Amgen, Inc.

INTRON®A a INTRON®A/REBETOL® jsou registrované obchodní známky společnosti Schering-Plough Corporation.

NORVIR® je registrovaná obchodní známka společnosti Abbott Laboratories.

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

PROZAC® je registrovaná obchodní známka společnosti Eli Lilly and Company.

RESCRIPTOR® a VIRACEPT® jsou registrované obchodní známky společnosti Agouron Pharmaceuticals Inc.

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

Symmetrel® je registrovaná obchodní známka společnosti Endo Pharmaceuticals, Inc.

VIDEX® a ZERIT® jsou registrované obchodní známky společnosti Bristol-Myers Squibb Company nebo některé její divize nebo dceřiné společnosti.

VIRAMUNE® je registrovaná obchodní známka společnosti Roxane Laboratories, Inc.

ZADAXIN® je registrovaná obchodní známka společnosti SciClone Pharmaceuticals, Inc.

ZOLOFT® je registrovaná obchodní známka společnosti Pfizer, Inc., jejích přidružených či spřízněných organizací, jejích držitelů licence nebo partnerů ve společných podnicích or its licensors or joint venture partners.

Copyright 2003, Roche Molecular Systems, Inc.

Všechna práva vyhrazena.

4/2003

(58003595-02ENGL)

04498330001-01



Roche Diagnostics GmbH
D-68298 Mannheim

