

COBAS AMPLICOR HCV MONITOR™ Test, version 2.0

HCM

FOR *IN VITRO* DIAGNOSTIC USE.

Objednáací údaje	COBAS AMPLICOR HCV MONITOR Test, v2.0	HCM	48 Quantitative Determinations	P/N: 21118404 123 ART: 11 1840 4 US: 83363
	COBAS AMPLICOR Wash Buffer	WB	500 Tests	P/N: 20759899 123 ART: 07 5989 9 US: 83314

Účel

COBAS AMPLICOR HCV MONITOR Test, version 2.0 (v2.0) je amplifikační test nukleové kyseliny *in vitro* ke stanovení viru hepatitidy C v lidském séru nebo plazmě na přístroji COBAS AMPLICOR™ Analyzer. Test se používá ve spojení s klinickými zjištěními a dalšími laboratorními markery jako pomůcka k posouzení virové odezvy na antivirovou terapii měřením změn koncentrace HCV RNA v séru nebo plazmě. Výsledky studií poukazují na nižší stálou virologickou reakci u pacientů s infekcí HCV genotypu 1, s vyšší hladinou HCV RNA nebo v pokročilejším stadiu fibrózy. Pokud u osob infikovaných HCV genotypu 1 nenastává virologická reakce brzy (< 2 log pokles HCV RNA), je malá pravděpodobnost, že se kdy dosáhne stálé virologické reakce. Nepřítomnost detekovatelné HCV RNA v séru po léčbě bývá spojena s ústupem poranění jater, poklesem hepatické fibrózy a nízkou pravděpodobností recidivy infekce virem HCV^{1,2,3}

COBAS AMPLICOR HCV MONITOR Test, v2.0 není určen k plošnému vyšetřování krve či krevních derivátů na přítomnost HCV, ani jako diagnostický test k potvrzení infekce virem HCV.

Souhrn a výklad testu

Virem hepatitidy C je ve světě infikováno 170 milionů lidí a v této souvislosti se hovoří o virové pandemii, s prevalencí pětinasobnou oproti infekci virem HIV-1⁴. HCV je virus s jednořetězcovou pozitivně orientovanou RNA s genomem obsahujícím zhruba 10 000 nukleotidů kódujících 3 000 aminokyselin. 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 podrobujících se ledvinové dialýze. Globální prevalence infekce virem HCV se podle imunoserologických údajů pohybuje v Egyptě od 6 % do 28 %, ve Spojených státech na úrovni 1,8 %⁴ a ve Francii v rozmezí 1,1–1,2 %³. Mezi 75 % a 80 % seropozitivních pacientů je také viremických^{3,4}.

Skutečnost, že se v organismu pacientů infikovaných virem HCV vyskytují proti němu protilátky, vedla k vývoji imunoserologických testů, které jsou pro tyto protilátky specifické. Přítomnost protilátek proti HCV je sice ukazatelem předchozí expozice infekci virem HCV, nelze ji však považovat za marker současné infekce. Mimoto není k dispozici ani přímá detekce metodami kultivace virů.

Hladina alanin-aminotransferázy (ALT) se sice považuje za hrubý indikátor infekce virem HCV, není však přímou mírou viremie. Míru zvýšení hladiny ALT nelze s mírou infekce virem HCV přímo korelovat. Hladina ALT totiž může být fakticky zvýšena při celé řadě příčin zánětu jater, kam virová hepatitida spadá, není však jediná. Oproti tomu detekce a kvantitativní stanovení HCV RNA cestou amplifikace nukleové kyseliny polymerázovou řetězovou reakcí (Polymerase Chain Reaction, PCR) představuje míru aktivní viremie⁵⁻⁷. Pomocí PCR lze detekovat HCV viremii ještě před imunologickou serokonverzí^{8,9} a detekovat změny virové zátěže u pacientů s chronickou infekcí virem HCV, kteří jsou pozitivní na protilátky a podrobují se terapii interferonem¹⁻³.

Princip metody

Test na COBAS AMPLICOR HCV MONITOR v2.0 sestává z pěti základních stupňů: příprava vzorku, reverzní transkripce příslušné RNA na komplementární DNA (cDNA)¹⁰; PCR amplifikace¹⁰ této cDNA pomocí HCV-specifických komplementárních primerů, hybridizace amplifikovaných produktů na specifické oligonukleotidové sondy a kolorimetrická detekce sondou vázaných amplifikovaných produktů.

COBAS AMPLICOR HCV MONITOR Test, v2.0 umožňuje současnou reverzní transkripci a PCR amplifikaci RNA HCV a kvantifikačního standardu (Quantitation Standard, QS) RNA HCV. Činidlo Master Mix obsahuje pár primerů specifických pro RNA jak HCV, tak kvantifikačního standardu HCV. Činidlo Master Mix bylo vyvinuto tak, aby zajistilo ekvivalentní stanovení všech známých genotypů HCV.

Stanovení virové HCV RNA se provádí pomocí kvantifikačního standardu HCV. Kvantifikační standard HCV je neinfekční RNA transkript, který obsahuje stejná místa pro vazbu primeru jako terčová HCV RNA a jedinečnou oblast pro vázání sondy, díky které se dá amplikon tohoto standardu odlišit od amplikonu HCV. Kvantifikační standard HCV je zařazen do každého jednotlivého vzorku ve známém počtu kopií a společně s terčovým HCV prochází celým postupem přípravy vzorku, reverzní transkripce, PCR amplifikace, hybridizace a detekce. COBAS AMPLICOR Analyzer vypočítává koncentraci HCV RNA v testovaných vzorcích tak, že u každého vzorku porovnává signál HCV se signálem HCV kvantifikačního standardu.

Kvantifikačním standardem HCV se kompenzují inhibiční efekty a kontroluje se amplifikační proces tak, aby bylo možno v každém vzorku přesně stanovit HCV RNA.

Příprava vzorku

HCV RNA se ze séra nebo plazmy izoluje lýzou virových částic pomocí chaotropního činidla a následným srážením RNA alkoholem. Společně s činidlem pro lýzu se do každého vzorku zavádí známý počet molekul kvantifikačního standardu HCV. Kvantifikační standard HCV prochází stádií přípravy vzorku, reverzní transkripce, amplifikace a detekce a slouží ke stanovení HCV RNA ve zkušebním vzorku.

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^{11,12}. To znamená, že pro schopnost testu detekovat všechny genotypy má zásadní důležitost správná volba primerů i sondy (viz část „*Charakteristika neklinických funkčních parametrů, Genotypová amplifikace HCV*“). Bylo zjištěno, že mezi známými genotypy HCV se sekvence RNA v nejvyšší míře zachovává v 5'-UTR (untranslated region) oblasti genomu HCV. V soupravě COBAS AMPLICOR HCV MONITOR Test, v2.0 se k definování sekvence 244 nukleotidů ve vysoce konzervovaném 5'-UTR genomu HCV používají primery KY78 a KY80⁸. Sekvence sondy a sekvence primeru se nacházejí v nejvíce zachovaných doménách oblasti 5'-UTR¹³.

Reverzní transkripce

Reakce reverzní transkripce a amplifikace se provádí pomocí tepelně stálé DNA polymerázy rekombinantního enzymu *Thermus thermophilus* (*rTth* pol). Za přítomnosti dvojmocného manganu (Mn^{2+}) a za příznivých pufovacích podmínek vykazuje *rTth* pol aktivitu jak reverzní transkriptázy, tak DNA polymerázy¹⁰. Díky tomu může reverzní transkripce a 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 kvantifikační standard RNA HCV. Za přítomnosti Mn^{2+} a nadbytku deoxynukleosid-trifosfátů (dNTPs), včetně trifosfátů deoxyadenosinu, deoxyguanosinu, deoxycytidinu a deoxyuridinu (namísto deoxythymidinu) prodlužuje *rTth* pol napojený primer a vytváří řetězec DNA (cDNA) komplementární vůči terčové RNA.

Amplifikace terče

Po reverzní transkripci RNA HCV terče a RNA HCV Quantitation Standard 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 RNA HCV Quantitation Standard. 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 postup 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 MONITOR Test, v2.0 dosahuje použitím enzymu AmpErase® (uracil-N-glykosyláza) a deoxyuridintrifosfátu (dUTP). Enzym AmpErase rozpozná a katalyzuje rozklad řetězců DNA obsahujících deoxyuridin¹⁴, ale nikoli DNA obsahující deoxythymidin. Deoxyuridin se v přirozené DNA nevyskytuje, je však vždy přítomen v amplikonu díky tomu, že se jako jeden z dNTP v činidle Master Mix místo deoxythymidintrifosfátu používá deoxyuridintrifosfát; proto je deoxyuridin obsažen pouze v amplikonu. V důsledku přítomnosti deoxyuridinu je kontaminující amplikon citlivý vůči destrukci enzymem AmpErase před amplifikací terčové DNA. AmpErase, jenž je součástí činidla Master Mix, katalyzuje štěpení DNA obsahující deoxyuridin na deoxyuridinových zbytcích otevřením deoxyribózového řetězce v poloze C1. Během zahřívání v prvním tepelném cyklu při alkalickém pH činidla Master Mix se DNA řetězec amplikonu štěpí v poloze deoxyuridinu, čímž se tato DNA stává neamplifikovatelnou. Při teplotách nad 55°C, tedy během tepelného cyklování, je AmpErase inaktivní, a proto terčový amplikon nerozkládá. Po amplifikaci se případný zbytkový enzym denaturuje přidávkem denaturačního roztoku, čímž se předchází degradaci terčového amplikonu. Je prokázáno, že enzym AmpErase v soupravě COBAS AMPLICOR HCV MONITOR Test, v2.0 inaktivuje minimálně 10³ kopií deoxyuridin-obsahujícího HCV amplikonu 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 Quantitation Standard amplikon chemicky denaturovaly a vytvořily jednořetězcovou DNA. K dosažení kvantitativních výsledků v širokém dynamickém rozmezí ředí COBAS AMPLICOR Analyzer denaturovaný amplikon sériově v detekčních kelímcích (D- kelímcích). Ke každému ze čtyř zředěných roztoků amplikonu HCV resp. ze dvou zředěných roztoků kvantifikačního standardu HCV se přidá suspenze magnetických částic potažených oligonukleotidovou sondou specifickou pro daný amplikon, tj. KY150 pro amplikon HCV nebo SK535 pro kvantifikační standard HCV. Biotinem značený amplikon je hybridizován k terčově specifické oligonukleotidové sondě vázané na magnetické částice. Pro každé kvantitativní stanovení je zapotřebí čtyř nezávislých měření absorbance činidla za použití suspenze sondy HCV a dvou měření absorbance za použití suspenze sondy pro kvantifikační standard HCV.

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. Konjugát avidinu s křenovou peroxidázou se naváže na biotinem značený amplikon hybridizovaný k terčově specifickým oligonukleotidovým sondám navázaným 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 absorbanci přístroj COBAS AMPLICOR Analyzer proměří při 660 nm.

HCV RNA Quantitation

COBAS AMPLICOR HCV MONITOR Test, v2.0 stanovuje RNA viru HCV pomocí druhé terčové sekvence (kvantifikační standard HCV), který je do testovaného vzorku přidán ve známé koncentraci. Kvantifikační standard HCV je neinfekční molekula RNA transkribovaná 351 nukleotidy *in vitro* s oblastmi vazby primeru stejnými jako v terčové sekvenci HCV. Kvantifikační standard HCV obsahuje vazebná místa pro primer KY78 a KY80 a vytváří amplifikační produkt téže délky (244 bází) a složení bází jako v terčové RNA HCV. Oblast vázající sondu v kvantifikačním standardu HCV je modifikována tak, aby se tento amplikon odlišil od terčového amplikonu HCV. Kvantifikační standard HCV je standardizován vůči mezinárodnímu standardu HCV WHO pro NAT Testing 96/790 a koncentrace se vyjadřuje v mezinárodních jednotkách (International Units)¹⁵ (IU)/PCR.

V lineární oblasti testu je absorbance u 660 nm (A_{660}) D-keřímku úměrná množství amplikonu HCV resp. amplikonu kvantifikačního standardu HCV v něm. Přístroj COBAS AMPLICOR Analyzer nejprve vypočítá absorbanci celkového HCV a kvantifikačního standardu HCV vynásobením absorbance D-keřímku faktorem zředění amplikonu v daném D-keřímku, a potom vybere D-keřímek o nejvyšší celkové absorbanci. Vypočtená celková absorbance je úměrná množství RNA HCV nebo RNA kvantifikačního standardu HCV v dané reakci reverzní transkripce/PCR amplifikace. Množství HCV RNA ve vzorku se pak vypočte z poměru celkové absorbance HCV k celkové absorbanci kvantifikačního standardu HCV a vstupního počtu molekul RNA kvantifikačního standardu HCV podle rovnice:

$$\left[\frac{\text{Celková HCV } A_{660}}{\text{Celková QS } A_{660}} \right]^{1,18} \times \text{vstupní HCV QS IU/PCR} \times 200 = \text{HCV RNA IU/ml}$$

kde:

Celková HCV A_{660} = vypočtená celková absorbance amplikonu HCV

Celková QS A_{660} = vypočtená celková absorbance amplikonu
kvantifikačního standardu

Vstupní HCV QS IU/PCR = počet mezinárodních jednotek kvantifikačního standardu
v každé reakci; tento údaj je specifický pro danou šarži

200 = přepočítávací faktor pro převod z IU/ml na IU/ml

1,18 = Upravovací faktor

Činidla

COBAS AMPLICOR HCM 48 kvantitativních P/N: 21118404 123
HCV MONITOR™ Test, v2.0 stanovení ART: 11 1840 4
 US: 83363

Specimen Preparation Reagents

HCM PREP

Příprava vzorků činidla

HCM LYS, v2.0 4 x 6,9 ml

(Činidlo pro lýzu HCV MONITOR, verze 2.0)

Pufr Tris-HCl
 68% Guanidinthiokyanát
 3% Dithiothreitol
 < 1% Glykogen

Xn X 68% hm. guanidinthiokyanát



Zdraví škodlivý

HCM QS, v2.0 4 x 0,1 ml

(Kvantifikační standard HCV MONITOR, verze 2.0)

< 0,001% neinfekční RNA transkribovaná *in vitro*
 (mikrobiální) obsahující sekvence vázající
 HCV primer specifickou sondu vázající oblast
 < 0,005% poly rA RNA (syntetická)
 EDTA
 0,05% azid sodný

HCM DIL, v2.0 4 x 12 ml

(Ředidlo pro vzorky HCV MONITOR, verze 2.0)

Pufr Tris-HCl
 < 0,005% poly rA RNA (syntetická) EDTA
 0,05% azid sodný

Control Reagents

HCM CTL

Kontrolní činidla

NHP 4 x 0,6 ml

[Negativní plazma (lidská)]

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
 nedetekovatelnými metodami PCR.
 0,1% ProClin® 300

HCV (-) C, v2.0 4 x 0,1 ml

[Kontrola HCV (-), verze 2.0]

< 0,005% poly rA RNA (syntetická)
 EDTA
 0,05% azid sodný

HCV L(+)C**, v2.0** 4 x 0,1 ml
 [Nízká (+) kontrola HCV MONITOR, verze 2.0]
 < 0,001% neinfekční RNA transkribovaná *in vitro*
 (mikrobiální) obsahující sekvence HCV
 < 0,005% poly rA RNA (syntetická)
 EDTA
 0,05% azid sodný

HCV H(+)C**, v2.0** 4 x 0,1 ml
 [Vysoká (+) kontrola HCV MONITOR, verze 2.0]
 < 0,001% neinfekční RNA transkribovaná *in vitro*
 (mikrobiální) obsahující sekvence HCV
 < 0,005% poly rA RNA (syntetická)
 EDTA
 0,05% azid sodný

Amplification Reagents

HCM AMP

Amplifikační činidla

HCM MMX, v2.0 4 x 0,7 ml
 (Master Mix HCV MONITOR, verze 2.0)
 Bicinový pufr
 16% DMSO
 glycerol
 < 0,01% *rTth* DNA polymeráza (*rTth* 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

HCM Mn²⁺, v2.0 4 x 0,1 ml
 (Manganatý roztok HCV MONITOR, verze 2.0)
 < 2% mangan
 Kyselina octová
 Amarantové barvivo
 0,05% azid sodný

Specific Detection Reagents


HCM DK

Specifická detekční činidla

AD3 2 x 75 testů

(Ředící činidlo na amplikon)

EDTA
 0,8% hydroxid sodný

Xi  0,8% hm. hydroxid sodný

Dráždivý

CM PS1, v2.0 2 x 100 testů

(Suspenze sondy HCV MONITOR 1, verze 2.0)

MES pufr

 < 0,4% suspenze paramagnetických částic Dynabeads® potažených
 HCV-specifickou oligonukleotidovou sondou (KY150)

0,09% azid sodný

CM4, v2.0 2 x 100 testů

(Suspenze sondy HCV MONITOR 2, verze 2.0)

Pufr s fosforečnanem sodným

< 0,2% solubilizátor

34,7% thiokyanát sodný

 Xn X 34,7% hm. thiokyanát sodný


Zdraví škodlivý

CQ PS1, v2.0 1 x 100 testů

 (Suspenze sondy kvantifikačního standardu HCV MONITOR 1,
 verze 2.0)

MES pufr

 < 0,2% suspenze Dynabeads (paramagnetické částice) potažených
 oligonukleotidovou záchytovou sondou SK535 specifickou pro
 kvantifikační standard HCV

0,09% azid sodný

CQ4, v2.0 1 x 100 testů

 (Suspenze sondy kvantifikačního standardu HCV MONITOR 2,
 verze 2.0)

Pufr s fosforečnanem sodným

< 0,2% solubilizátor

24,9% thiokyanát sodný

Generic Detection Reagents
DK

Generická detekční činidla

DN4 1 x 100 testů

(Denaturační roztok)

1,6% hydroxid sodný

EDTA

Thymolová modř

 Xi X 1,6% hm. hydroxid sodný


Dráždivý

CN4 3 x 100 testů

(Konjugát avidinu s křenovou peroxidázou)

Pufr Tris-HCl

< 0,001% konjugát avidinu s křenovou peroxidázou

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

WB 2 x 250 testů
 (10X-promývací koncentrát)
 < 2% fosfátový pufr
 < 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 lahviček 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, 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*¹⁶ nebo v dokumentu NCCLS M29-A¹⁷. Všechny plochy důkladně očistěte a vydezinfikujte čerstvě připraveným 0,5% roztokem chlornanu sodného v deionizované nebo destilované vodě.

Poznámka:

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 s deriváty z lidské krve nepřenesou nějaké 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 ty, které jsou uvedeny v publikaci *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*¹⁶ nebo v dokumentu NCCLS M29-A¹⁷. Všechny plochy důkladně očistěte a vydezinfikujte čerstvě připraveným 0,5% roztokem chlornanu sodného v deionizované nebo destilované vodě.

HCM QS, v2.0; HCM DIL, v2.0; HCM MMX, v2.0; HCM Mn²⁺, v2.0; HCV (-) C, v2.0; HCV L(+)C, v2.0; HCV H(+)C, v2.0; CM PS1, v2.0 a CQ PS1, v2.0 obsahuje 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 je velkým objemem vody, aby se azid nemohl nikde usadit.

Při práci s **HCM LYS, v2.0; HCM MMX, v2.0; HCM Mn²⁺, v2.0; DN4, AD3, CM4, v2.0; CQ4, v2.0; CN4, SB3, SB** a pracovním substrátem (směsné činidlo **SB3** s **SB**) noste prostředky ochrany zraku, 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 tuto péči zanedbali, mohly by se vyvinout popáleniny. Jestliže se některé činidlo rozlije nebo rozsype, před vytřením dosucha je zředte vodou.

Dbejte, aby se **SB** ani 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.

Dbejte, aby se **HCM LYS, v2.0**, který obsahuje guanidinthiokyanát, ani **CM4, v2.0** nebo **CQ4, v2.0**, které obsahují thiokyanát sodný, nemohly dostat do styku s roztokem chlornanu sodného (bělidlo). 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.

HCM LYS, v2.0; HCM QS, v2.0 a HCM DIL, 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 **HCM LYS, v2.0** se během skladování při teplotě 2–8°C tvoří sraženina. Před použitím sraženinu rozpustíte zahřátím **HCM LYS, v2.0** na teplotu 25–37°C. Zahřívejte ji maximálně 30 minut a potom kapalinou důkladně míchejte, dokud se krystalky nerozpustí. *Před použitím si každou lahvičkou HCM LYS, v2.0 prohleďte proti bílému podkladu a sledujte, jestli nezpozorujete žluté zbarvení 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 činidlo pro lýzu, připravené tak, že se k **HCM LYS, v2.0** přidá **HCM QS, v2.0**, se uchovává za pokojové teploty a musí se spotřebovat do 4 hodin od přípravy.

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

NHP, HCV (-) C, v2.0; HCV L(+)C, v2.0 a HCV H(+)C, v2.0 uchovávejte při teplotě 2–8°C. Činidla jsou stálá do vypršení vyznačené doby použitelnosti. Po otevření je třeba nespoteřovanou část zlikvidovat.

AD3 uchovávejte za teplot 2–25°C. Po vložení do přístroje COBAS AMPLICOR Analyzer je **AD3** při teplotě 2–8°C stálý 30 dní nebo do vypršení doby použitelnosti, podle toho, která doba je kratší. **AD3** se dá použít maximálně na čtyři 24-hodinové přístrojové cykly a mezi cykly se musí uchovávat při teplotě 2–8°C.

Uchovávejte **CM PS1, v2.0 a CM4, v2.0** při teplotě 2–8°C. Činidla jsou stálá do vypršení vyznačené doby použitelnosti. Po smísení **CM PS1, v2.0** s **CM4, v2.0** je pracovní činidlo při teplotě 2–8°C stálé 30 dní. Dá se použít nanejvýš na čtyři 24-hodinové přístrojové cykly a mezi cykly se musí uchovávat při teplotě 2–8°C.

CQ PS1, v2.0 a **CQ4, v2.0** uchovávejte při teplotě 2–8°C. Činidla jsou stálá do vypršení vyznačené doby použitelnosti. Po smísení **CQ PS1, v2.0** s **CQ4, v2.0** je pracovní činidlo při teplotě 2–8°C stálé 30 dní. Dá se použít nanejvýš na čtyři 24-hodinové přístrojové cykly a mezi cykly se musí uchovávat při teplotě 2–8°C.

Uchovávejte **DN4** za teplot 2–25°C. **DN4** je stálý do vypršení vyznačené doby použitelnosti. Po otevření je při teplotě 2–8°C stálé 30 dní nebo do vypršení doby použitelnosti, podle toho, která doba je kratší. **DN4** se dá použít maximálně na čtyři 24-hodinové přístrojové cykly a mezi cykly se musí uchovávat při teplotě 2–8°C.

CN4 uchovávejte při teplotě 2–8°C. **CN4** je stálé do vypršení vyznačené doby použitelnosti. Po otevření je při teplotě 2–8°C stálé 30 dní nebo do vypršení doby použitelnosti, podle toho, která doba je kratší. **CN4** se dá použít maximálně na čtyři 24-hodinové přístrojové cykly a mezi cykly se musí uchovávat při teplotě 2–8°C.

SB3 a **SB** uchovávejte při teplotě 2–8°C. Neotevřená jsou tato činidla stálá do vypršení vyznačené doby použitelnosti. Pracovní substrát se připravuje smísením **SB3** s **SB** denně. Pracovní substrát je v přístroji COBAS AMPLICOR Analyzer stálý 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 za teplot 2–25°C. **WB** je stálé do vypršení vyznačené doby použitelnosti. Před zředěním **WB** prohlédněte a zpozorujete-li sraženinu, kapalinu zahřejte na 30–37°C, aby se sraženina rozpustila. Pracovní promývací pufr (1X), připravený zředěním činidla **WB** destilovanou nebo deionizovanou vodou v poměru 1:10, se v rezervoáru promývacího pufru přístroje COBAS AMPLICOR uchovává za teplot 2–25°C, kdy je stálý 2 týdny ode dne přípravy.

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

Dodané materiály

HCM

**COBAS AMPLICOR
HCV MONITOR Test, version 2.0**

P/N: 21118404 123

ART: 11 1840 4

US: 83363

HCM PREP

Specimen Preparation Reagents

Příprava vzorků činidla

HCM LYS, v2.0

(Činidlo pro lýzu HCV MONITOR, verze 2.0)

HCM QS, v2.0

(Kvantifikační standard HCV MONITOR, verze 2.0)

HCM DIL, v2.0

(Ředidlo pro vzorky HCV MONITOR, verze 2.0)

Control Reagents

Kontrolní činidla

HCM CTL

NHP

[Negativní plazma (lidská)]

HCV (-) C, v2.0

[Kontrola HCV (-), verze 2.0]

HCV L(+)C, v2.0

[Nízká (+) kontrola HCV MONITOR, verze 2.0]

HCV H(+)C, v2.0

[Vysoká (+) kontrola HCV MONITOR, verze 2.0]

Amplification Reagents

Amplifikační činidla

HCM AMP

HCM MMX, v2.0

(Master Mix HCV MONITOR, verze 2.0)

HCM Mn²⁺, v2.0

(Manganatý roztok HCV MONITOR, verze 2.0)

Specifická detekční činidla

Specifická detekční činidla

HCM DK

AD3

(Ředící činidlo na amplikon)

CM PS1, v2.0

(Suspenze sondy HCV MONITOR 1, verze 2.0)

CM4, v2.0

(Suspenze sondy HCV MONITOR 2, verze 2.0)

CQ PS1, v2.0

(Suspenze sondy kvantifikačního standardu HCV MONITOR 1, verze 2.0)

CQ4, v2.0

(Suspenze sondy kvantifikačního standardu HCV MONITOR, verze 2.0)

Generic Detection Reagents

Generická detekční činidla

DK

DN4

(Denaturační roztok)

CN4

(Konjugát avidinu s křenovou peroxidázou)

SB3

(Substrát A)

SB

(Substrát B)

COBAS AMPLICOR**Wash Buffer**

COBAS AMPLICOR Promývací pufř

WB

P/N: 20759899 123

ART: 07 5989 9

US: 83314

WB

(10X-promývací koncentrát)

Potřebné materiály, jež nejsou součástí dodávky

Předamplifikace – prostor pro přípravu činidel

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

Předamplifikace – 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)
- Izopropyl alkohol čistoty p.a.
- Sterilní transferové pipety s jemnou špičkou prosté RNázy
- Sterilní polystyrenové sérologické pipety na jedno použití (5 ml, 10 ml a 25 ml)
- Pipetory (objem 50 µl, 100 µl, 400 µl, 500 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 ekvivalentní
- Vířivý mixer
- 60°C ± 2°C s horkovzdušným ohřevem
- Rukavice na jedno použití bez prášku

Poamplifikace – prostor pro amplifikaci/detekci

- COBAS AMPLICOR Analyzer a tiskárna
- Příručka „*Operator's Manual*“ k přístroji COBAS AMPLICOR Analyzer
- *Method Manual* for the COBAS AMPLICOR HCV MONITOR Test, v2.0
- Racks of D-cups (ART: 10 4564 4)
- Destilovaná nebo deionizovaná voda
- Serologické pipety 5 ml
- Vířivý mixer
- Rukavice na jedno použití bez prášku

* Pipetory musejí být přesné na 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

Poznámka	<i>Se všemi vzorky je třeba zacházet jako s infekčními.</i>
Odběr vzorků	Souprava COBAS AMPLICOR HCV MONITOR 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 800-1600 x g po dobu 20 minut za pokojové teploty, a převedte 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 ¹⁷ . Celá krev se přepravuje za teplot 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.
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 72.692.005). Studiemi provedenými na pracovišti se prokázalo, že vzorky séra a plazmy je možno až dvakrát zmrazit a rozmrazit, aniž by došlo k úbytku HCV RNA.

Návod k použití

Poznámka	<i>Podrobný provozní návod viz v příručce „Operator’s Manual“ k přístroji COBAS AMPLICOR Analyzer.</i>
Poznámka	<i>Všechna činidla musejí mít před použitím teplotu okolí. Před započatím testu se vizuálně přesvědčte, že je objem činidel dostatečný.</i>
Poznámka	<i>Vzorky séra a plazmy musejí mít před použitím teplotu okolí.</i>
Poznámka	<i>Kde je tak uvedeno, používejte pipetory s aerosolovou bariérou nebo se špičkami s pozitivním posuvem. Dávejte obzvláštní pozor, abyste zajistili selektivní amplifikaci.</i>
Poznámka	<i>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.</i>
Množství pro jedno měření	Každá souprava obsahuje dostatečné množství činidla na čtyři 12-testová měření, která mohou probíhat zvlášť nebo současně. Každé měření musí zahrnovat minimálně po jednom replikátu HCV (–) Control, HCV MONITOR Low (+) Control a HCV MONITOR High (+) Control (viz část „Kontrola jakosti“). Činidla pro přípravu vzorku a amplifikaci jsou balena v 12-testových lahvičkách na jedno použití. Pro co nejefektivnější využití je vhodné zpracovávat činidla, vzorky i kontroly v dávkách, jež jsou násobky dvanácti.

Pracovní tok

COBAS AMPLICOR HCV MONITOR 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 a kontrol*, a *Reverzní transkripce, amplifikace a detekce* v tomto pořadí. Test lze také provést v průběhu dvou dnů. V takovém případě se první den provede *Příprava vzorků a kontrol* a příští den se pokračuje postupy *Příprava činidel a Reverzní transkripce, amplifikace a detekce*.

Chcete-li první den provést přípravu vzorků a kontrol a druhý den reverzní transkripci, amplifikaci a detekci, proveďte z *Přípravy vzorků a kontrol* kroky 1 až 14 a zpracované vzorky a kontroly uložte podle kroku 14. Druhý den začněte *Přípravou činidel*, potom zpracované vzorky a kontroly rozmrazte na pokojovou teplotu a pokračujte v *Přípravě vzorků a kontrol*, krok 15, a postupujte dále k *Reverzní transkripci, Amplifikaci a Detekci*.

Příprava činidel

Provádí se: Předamplifikace – 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 **HCM Mn²⁺, v2.0** do celé lékovky **HCM 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 **HCM Mn²⁺, v2.0** slouží ke kontrole, že byl **HCM Mn²⁺, v2.0** k **HCM MMX, v2.0** skutečně přidán. Nespotebovaný **HCM Mn²⁺, v2.0** zlikvidujte. Pracovní Master Mix se uchovává při teplotě 2–8°C a musí se spotřebovat do 4 hodin od přípravy.*
3. Do každé A-zkumavky odměřte 50 µl 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. Uložte A-kruh(y) obsahující pracovní Master Mix do prostoru Předamplifikace – příprava vzorku a kontroly – 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 čtyři hodiny.

**Vzorek a kontrola
Příprava**

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

Poznámka

K amplifikaci zpracovaných vzorků a kontrol proveďte nejprve kroky uvedené v části „Příprava činidel“. Nechte zpracované vzorky a kontroly při pokojové teplotě rozmrazit a pokračujte s „Přípravou vzorku a kontroly“, krok 15.

Poznámka

*Před použitím si každou lahvičkou **HCM 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 nepoužijte. Vyžádejte si od místního zastoupení firmy Roche náhradu.*

Poznámka

*V **HCM LYS, v2.0** se během uchování při teplotě 2–8°C vytváří sraženina. Před použitím kapalinu zahřejte na teplotu 25–37°C a důkladně promíchejte, aby se veškerý vysrážený materiál rozpustil.*

1. Připravte si 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 tři zkumavky označte „HCV (-) C“, „HCV L(+)C“ a „HCV H(+)C“.
3. Připravte pracovní Lysis Reagent. **HCM QS, v2.0** před použitím po dobu 5–10 sekund vířením míchejte. Na každou dávku až 12 vzorků a kontrol odměřte do jedné lahvičky **HCM LYS, v2.0** objem 100 µl **HCM QS, v2.0**. Objem **HCM LYS, v2.0** není třeba odměřit. Zbývající **HCM QS, v2.0** zlikvidujte. Standardní pracovní Lysis Reagent je při pokojové teplotě stálý čtyři hodiny. Pracovní Lysis Reagent je při pokojové teplotě stálý čtyři hodiny.

POZNÁMKA

Používáte-li vzorky zmrazené, rozmrazte je při pokojové teplotě a vířením po dobu 3–5 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:
 - **NHP, HCV (-) C, v2.0, HCV L(+)C, v2.0 a HCV H(+)C, v2.0** po dobu minimálně 5–10 sekund vířením míchejte.
 - Do každé ze tří kontrolních zkumavek odměřte po 100 µl **NHP**. Zkumavky uzavřete a nechte minimálně 3–5 sekund vířit.
 - Do zkumavky označené „HCV (-) C“, obsahující pracovní Lysis Reagent a **NHP**, odměřte 100 µl **HCV (-) C, v2.0**. Zkumavky uzavřete a nechte minimálně 3–5 sekund vířit.
 - Do zkumavky označené „HCV L(+) C“, obsahující pracovní Lysis Reagent a **NHP**, odměřte 100 µl **HCV L(+) C, v2.0**. Zkumavky uzavřete a nechte minimálně 3–5 sekund vířit.
 - Do zkumavky označené „HCV H(+) C“, obsahující pracovní Lysis Reagent a **NHP**, odměřte 100 µl **HCV H(+) C, v2.0**. Zkumavky uzavřete a nechte minimálně 3–5 sekund vířit.
6. Do patřičně označených zkumavek obsahujících pracovní Lysis Reagent přidejte po 100 µl jednotlivých vzorků od pacientů. Zkumavky uzavřete a nechte minimálně 3–5 sekund vířit.
7. Zkumavky se vzorkem a kontrolou inkubujte 10 minut v horkovzdušném zařízení při teplotě 60°C ± 2°C. Nechte minimálně 10 sekund vířit.
8. Sejměte ze zkumavek uzávěry a do každé přidejte 500 µl 100% izopropylalkoholu (při pokojové teplotě). Zkumavky 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 odstřeďte při pokojové teplotě po dobu 15 minut maximální rychlostí (12 500–16 000 x g).

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!). Odstraňte tolik 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 (o pokojové teplotě), zkumavky opět uzavřete a vířením po dobu 3–5 sekund promíchejte.
12. Vložte zkumavky do mikrocentrifugy orientačními značkami ven a centrifugujte při pokojové teplotě po dobu 5 minut maximální rychlostí (12 500–16 000 x g).
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 nejlépe. **Zbytkový ethanol může amplifikaci inhibovat.**
14. Do každé zkumavky odměřte 1 000 µl **HCM 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 zbýt určité množství nerozpustné hmoty. Zpracované vzorky a kontroly amplifikujte do 3 hodin od přípravy, nebo je můžete po dobu nepřesahující jeden měsíc uchovávat ve zmrazeném stavu při teplotě –70°C nebo nižší, přičemž zmrazit a rozmrazit se mohou nanejvýš jednou. Kdyby se zmrazil a rozmrazil víckrát, mělo by to za následek ztrátu HCV RNA kvantifikačního standardu.

Poznámka

Pokud byly zpracované vzorky a kontroly uchovávány před amplifikací ve zmrazeném stavu, rozmrazte je za pokojové teploty a před postoupením k bodu 15 je dejte na dobu 5 sekund vířit.

15. Z každého zpracovaného vzorku od pacienta a kontroly odměřte 50 µl do příslušné A-zkumavky obsahující pracovní Master Mix; použijte k tomu pipetor s aerosolovou bariérou nebo se špičkou s pozitivním posuvem. Pro každý vzorek a kontrolu použijte novou špičku. Dejte pozor, abyste nepřenesli žádnou vysráženou látku, která se nemusela převést zpět do roztoku. A-zkumavky uzavřete.
16. Zaznamenejte pozice kontrol a vzorků v A-kruhu (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. Nespotřebovaný zpracovaný vzorek je možno na dobu jednoho týdne uložit ve zmrazeném stavu při teplotě –70°C nebo nižší, přičemž zmrazit a rozmrazit se smí jenom jednou. Kdyby se zmrazil a rozmrazil víckrát, mělo by to za následek ztrátu HCV QS RNA.

Reverzní transkripce, Amplifikace a detekce

Provádí se v: Poamplifikace – prostor amplifikace/detekce

Proveďte každodenní údržbu přístroje, jak je uvedeno v příručce *Operator's Manual* k přístroji COBAS AMPLICOR Analyzer:

- 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
- Následujícím postupem připravte pracovní promývací pufr (1X). Před zředěním **WB** prohlédněte a zpozorujete-li sraženinu, kapalinu zahřejte na 30–37°C, aby se sraženina rozpustila. Přidejte jeden objem **WB** k 9 objemům destilované nebo deionizované vody. Dobře promíchejte. V rezervoáru promývacího pufru (1X) by měly být pufru vždy minimálně 3–4 litry.
- Vyprázdněte odpadní nádobu
- Systém naprimerujte
- Během primingu zkontrolujte stříkačky a trubičky
- Během primingu zkontrolujte transferové špičky

Před každým měřením:

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

Plnění přístroje a provoz zařízení

1. Zkontrolujte v přístroji COBAS AMPLICOR Analyzer množství činidel. Připravte si dostatek kazet, abyste s nimi vystačili.
2. **CM PS1, v2.0** vířením důkladně promíchejte. Do jedné kazety s **CM4, v2.0** odměřte 2,5 ml **CM PS1, v2.0**. a kazetu uložte do příslušného stojanu, specifického pro daný test. Použitou lékovku od **CM PS1, v2.0** zlikvidujte. Na kazetě s **CM4, v2.0** vyznačte datum přípravy činidla.
3. **CQ PS1, v2.0** vířením důkladně promíchejte. Do jedné kazety s **CQ4, v2.0** odměřte 2,5 ml **CQ PS1, v2.0**. a kazetu uložte do příslušného stojanu, specifického pro daný test. Použitou lékovku od **CQ PS1, v2.0** zlikvidujte. Na kazetě s **CQ4, v2.0** vyznačte 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** vyznačte datum přípravy.
5. Pracovní substrát uložte do příslušného (generického) stojanu.
6. Kazetu s **AD3** uložte do příslušného stojanu. Na kazetě s **AD3** vyznačte datum.
7. Kazety s **DN4** a **CN4** uložte do příslušných (generických) stojanů. Na kazetách vyznačte datum, kdy byly otevřeny.

8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. Stojan na D-kelímky uložte na plošinu pro D-kelímky. Pro každý vzorek a kontrolu je zapotřebí šest D-kelímek, dalších dvou D-kelímek je třeba pro jednotlivé kazety pracovního substrátu k provedení slepého pokusu.
12. A-kruh(y) uložte do segmentu(ů) tepelného cyklizátoru přístroje COBAS AMPLICOR Analyzer.
13. 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.
14. Sestavte pro A-kruhy pracovní seznam (Worklist), jak je popsáno v příručce (*Operator's Manual*) k přístroji COBAS AMPLICOR Analyzer.

Poznámka

Nyní vložte do přístroje COBAS AMPLICOR Analyzer počet kopií (IU/PCR) kvantifikačního standardu, který je specifický pro danou šarží, a rozmezí Low (+) a High (+) Control uvedené na „Data Cards“ k soupravě COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0.

15. Kryt segmentu(ů) tepelného cyklizátoru těsně uzavřete.
16. Uvedte přístroj COBAS AMPLICOR Analyzer do chodu, jak je popsáno v příručce (*Operator's Manual*) k přístroji COBAS AMPLICOR Analyzer.
17. Vyčkejte, dokud analyzátor neohlásí, že kontrola uložení proběhla úspěšně.

Poznámka

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

18. Reverzní transkripci, amplifikaci a detekci provádí přístroj COBAS AMPLICOR Analyzer automaticky.

Výsledky

Výpočet výsledku

U každého vzorku a kontroly COBAS AMPLICOR Analyzer provede automaticky tyto činnosti: Následujícím postupem stanoví titr HCV RNA. *Titr CV RNA je vyjádřen v IU/ml.*

- Vybere všechna zředění amplikonu HCV a kvantifikačního standardu, jejichž absorbance spadají do lineárního rozmezí pro daný test ($A_{660} = 0,10 - 2,0$). Má-li být výsledek počítán, musí do tohoto lineárního rozmezí spadat minimálně jedno zředění HCV a jedno zředění amplikonu kvantifikačního standardu.
- U všech vybraných hodnot absorbance provede korekci na pozadí.
- Zkontroluje, jestli je hodnota A_{660} **HCM QS, v2.0** přijatelná, tedy jestli zpracování vzorku, reverzní transkripce, amplifikace a detekce proběhly správně.
- Zkontroluje, že všechna zředění **HCV (-) C, v2.0** poskytují hodnoty $A_{660} \leq 0,099$.
- Stanoví celkovou hodnotu A_{660} HCV a celkovou hodnotu A_{660} kvantifikačního standardu pro všechna zvolená zředění a pro **HCV L(+), v2.0** a **HCV H(+), v2.0** a pro všechny vzorky vypočte hodnotu IU/ml za použití maximální celkové absorbance vypočtené pro amplikon HCV a HCM QS a počet IU/PCR přiřazených k **HCM QS, v2.0**.
- Zkontroluje, zda vypočtený počet kopií (IU/ml) **HCV L(+), v2.0** a **HCV H(+), v2.0** spadá do vymezeného rozmezí.
- Vygeneruje tisk hodnot A_{660} pro všechna zředění HCV a kvantifikačního standardu a vypočtených hodnot HCV IU/ml pro všechny vzorky a kontroly. IU/ml je na tisku výsledků vyznačen pod identifikací vzorku ve vědecké notaci.

Podle uživatelské volby mohou být výsledky testu manuálně přepočteny z mezinárodních jednotek (International Units, tedy IU/ml) na počet kopií/ml.

Faktor pro přepočet hodnot IU/ml na počet kopií/ml činí **2,7**.
 $1 \text{ IU/ml} \times 2,7 \text{ kopií/IU} = \text{kopií/ml}$.

Validace

Zkontrolujte, zda v tisku nejsou žádné příznaky (flags) a poznámky a že je tedy měření platné. Měření platné **není**, pokud se u HCV MONITOR Controls objeví některý z následujících příznaků nebo poznámek.

Poznámka

Pokyny a popis k tisku výsledků a k interpretaci příznaků a poznámek naleznete v příručce („Operator’s Manual“) k přístroji COBAS AMPLICOR Analyzer.

Příznak	Poznámka	Interpretace
Q	QS_INVALID	Obě hodnoty A_{660} HCM QS, v2.0 pro všechny kontroly leží nad nebo pod přijatelným rozmezím.
N	NC_INVALID	A_{660} HCV (-) C, v2.0 leží nad přijatelným rozmezím ($> 0,099$).
H	HPC_INVALID	Hodnota IU/ml HCV H(+), v2.0 leží nad nebo pod přijatelným rozmezím.
L	LPC_INVALID	Hodnota IU/ml HCV L(+), v2.0 leží nad nebo pod přiřazeným rozmezím.
	OD_SEQUENCE	Indikuje hodnotu A_{660} terče ležící mimo sekvenci. Žádný výsledek nebyl vypočítáván. Celý test zopakujte, včetně přípravy vzorku a kontrol, amplifikace a detekce.
	QS_SEQUENCE	Indikuje hodnotu A_{660} kvantifikačního standardu ležící mimo sekvenci. Žádný výsledek nebyl vypočítáván. Celý test zopakujte, včetně přípravy vzorku a kontrol, amplifikace a detekce.

- Pokud je měření neplatné, je třeba celý test, tj. včetně přípravy vzorků a kontrol, reverzní transkripce, amplifikace a detekce, zopakovat.

Kontrola dat

Přístroj COBAS AMPLICOR Analyzer tiskne hodnoty A_{660} a IU/ml pro každý vzorek a kontrolu. Hodnoty A_{660} při sériovém ředění terčového amplikonu a amplikonu kvantifikačního standardu mají s rostoucím faktorem zředění vykazovat klesající trend A_{660} , s výjimkou zředění, kde hodnoty A_{660} překračují lineární rozmezí testu (vzorky o vysokém titru) nebo se naopak blíží A_{660} pozadí (vzorky o nízkém titru).

Ředění amplikonu HCV

U HCV představují zředění č. 1, 2, 3 a 4 po řadě neředěný amplikon a amplikon zředěný v poměru 1:8, 1:64 a 1:512. Absorbance mají v této řadě klesat s tím, že nejvyšší hodnotu A_{660} vykazuje u každého vzorku nebo kontroly první zředění (zředění č. 1) a nejnižší hodnotu A_{660} vykazuje zředění poslední (zředění č. 4). Pokud hodnoty A_{660} pro HCV toto pořadí nesledují, zobrazí se u daného vzorku nebo kontroly chybové hlášení OD_SEQUENCE.

Ředění amplikonu kvantifikačního standardu HCV

U kvantifikačního standardu HCV představuje zředění č. 1 čistý amplikon a zředění č. 2 amplikon zředěný v poměru 1:8. Pokud je hodnota A_{660} při zředění č. 2 vyšší než při zředění č. 1, došlo k chybě a zobrazí se chybové hlášení QS_SEQUENCE. Výsledek pro daný vzorek nebo kontrolu je neplatný Celý test pro daný vzorek či kontrolu, tj. včetně zpracování vzorku, amplifikace a detekce, je třeba zopakovat.

Interpretace výsledků, kde se hodnoty A_{660} vymykají ze sekvence

- Hodnoty A_{660} pro sérii zředění amplikonu HCV mají s rostoucím faktorem zředění vykazovat klesající trend hodnot A_{660} , s výjimkou zředění nasycených a zředění blízkých se pozadí hodnot A_{660} .
- V reakcích s vysokou hodnotou IU/ml HCV RNA mohou být zředění č. 1, 2 a 3 nasycená, což vede ke sníženým hodnotám A_{660} (viz tab. 1, příklad č. 1). Tyto výsledky jsou platné i tehdy, nevykazují-li hodnoty A_{660} v řadě zředění od č. 1 do č. 4 klesající trend.
- V reakcích s nízkým počtem IU/ml HCV RNA mohou zředění č. 2, č. 3 a č. 4 vést k hodnotám A_{660} blízkým se pozadí (viz tab. 1, příklad č. 2). Tyto výsledky jsou platné i tehdy, nevykazují-li hodnoty A_{660} v řadě zředění od č. 1 do č. 4 klesající trend.
- Všechna zředění poskytující hodnoty A_{660} v rozmezí 2,0–0,1 mají v řadě zředění od č. 1 do č. 4 vykazovat klesající trend hodnot A_{660} . ***Pokud hodnoty A_{660} ležící mezi 2,0 a 0,1 klesající trend v řadě zředění od č. 1 do č. 4 nevykazují, pak došlo k chybě (viz tab. 1, příklady č. 3, 4 a 5).*** Výsledek pro daný vzorek nebo kontrolu je neplatný. Celý test pro daný vzorek či kontrolu, tj. včetně zpracování vzorku, amplifikace a detekce, je třeba zopakovat.

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

	Terčové A_{660} (Faktor zředění)				QS A_{660} (Faktor zředění)		Interpretace výsledků
	1:1	1:8	1:64	1:512	1:1	1:8	
Příklad č. 1	2,578	3,603	3,201	*0,700	2,618	*0,397	PLATNÉ: Vzorek o vysokém titru A_{660} nad lineárním rozmezím absorbancí.
Příklad č. 2	*0,216	0,004	0,016	0,007	3,236	*0,743	PLATNÉ: Vzorek o nízkém titru A_{660} na úrovni detekce nebo poblíž.
Příklad č. 3	0,002	0,007	0,004	0,339	4,218	*0,883	NEPLATNÉ: Zobrazí se hlášení OD_SEQUENCE.
Příklad č. 4	3,052	1,597	3,384	2,887	1,357	*0,158	NEPLATNÉ: Zobrazí se hlášení OD_SEQUENCE.
Příklad č. 5	0,016	0,267	0,007	0,004	3,612	*0,793	NEPLATNÉ: Zobrazí se hlášení OD_SEQUENCE.

* Označuje hodnotu A_{660} , kterou COBAS AMPLICOR Analyzer vybral pro výpočet výsledku, jak je uvedeno na tisku. U vzorků, kde hodnoty A_{660} nedodržují sekvenci, nejsou výsledky uvedeny.

Interpretace výsledků

V případně platného měření zkontrolujte, zda v tisku výsledků nejsou u některého vzorku uvedeny nějaké příznaky nebo poznámky Tisk výsledků. Výsledky se interpretují takto:

Poznámka

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

- **Platné** měření může zahrnovat platné i neplatné výsledky vzorků podle toho, zda se u jednotlivých vzorků objeví příznaky resp. poznámky nebo ne.
- Vzorky s příznaky resp. poznámkami se interpretují takto:

Příznak	Poznámka	Interpretace
Q	QS_INVALID	<i>U žádného zředění kvantifikačního standardu neleží hodnota A_{660} v lineárním rozmezí absorbancí daného testu.</i> Výsledek pro tento vzorek je neplatný. U vzorků s neplatnými výsledky je třeba test zopakovat, včetně přípravy vzorků a kontrol, reverzní transkripce, amplifikace a detekce.
	TARGETOD_LO	<i>Pro všechna zředění HCV leží hodnoty A_{660} pod lineárním rozmezím pro daný test.</i> Výsledky nahlaste jako „HCV RNA nedetekována“.
	TARGETOD_HI	<i>Pro všechna zředění HCV leží hodnoty A_{660} nad lineárním rozmezím pro daný test.</i> Výsledek nahlaste jako „Nestanoveno“. Požadujete-li kvantitativní výsledek, zřeďte původní vzorek HCV-negativní lidskou plazmou v poměru 1:100 a test zopakujte. Zjištěný výsledek vynásobte 100.
	RESULT_LO	<i>Vypočtená hodnota počtu kopií/ml leží pod lineárním rozmezím testu.</i> Výsledky nahlaste jako „HCV RNA detekována, méně než 600 HCV IU/ml“.
	RESULT_HI	<i>Vypočtená hodnota kopií/ml leží nad lineárním rozmezím testu.</i> Výsledky nahlaste jako „více než $7,0 \times 10^5$ HCV IU/ml“. Potřebujete-li kvantitativní výsledek, můžete původní vzorek zředit v poměru 1:100 HCV-negativní lidskou plazmou a test zopakovat. Zjištěný výsledek vynásobte 100. Jestliže titr zředěného vzorku leží i nadále nad lineárním rozmezím testu, nahlaste výsledek jako „koncentrace HCV RNA vyšší než $7,0 \times 10^7$ IU/ml“; pokud je požadován kvantitativní výsledek, pokračujte v ředění, dokud se výsledek nedostane do lineárního rozmezí testu, a výsledek vynásobte faktorem zředění použitého k získání titru HCV RNA vzorku.
	TARG_RANGE	<i>Všechny hodnoty A_{660} terče leží mimo lineární rozmezí daného testu.</i> Výsledek nahlaste jako „Nestanoveno“. Test s původním vzorkem zopakujte, včetně přípravy vzorku, reverzní transkripce, amplifikace a detekce.
	OD_SEQUENCE	<i>Indikuje hodnotu A_{660} terče ležící mimo sekvenci.</i> Výsledky nebyly vypočítávány. Celý test zopakujte, včetně přípravy vzorku a kontroly, amplifikace a detekce.
	QS_SEQUENCE	<i>Indikuje hodnotu A_{660} kvantifikačního standardu ležící mimo sekvenci.</i> Výsledky nebyly vypočítávány. Celý test zopakujte, včetně přípravy vzorku a kontrol, amplifikace a detekce.

Kontrola kvality

Každé měření musí zahrnovat minimálně po jednom replikátu HCV (–) Control, HCV MONITOR Low (+) Control a HCV MONITOR High (+) 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. Na pozice 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*) k přístroji COBAS AMPLICOR Analyzer.

Negativní kontrola

HCV (–) Control má dát výsledek „Nedetkováno“, tj. všechny hodnoty $A_{660} \leq 0,099$. Jestliže HCV (–) Control toto kritérium nesplňuje, je celé měření neplatné. Je pak třeba celý postup, tj. přípravu vzorků a kontrol, reverzní transkripci, amplifikaci a detekci, zopakovat. Jestliže je takto absorbance A_{660} HCV (–) Control soustavně vyšší než 0,099, spojte se s místním zastoupením firmy Roche a vyžádejte si technickou pomoc.

Pozitivní kontrola

Přiřazené rozmezí pro HCV MONITOR Low (+) a High (+) Controls je pro každou šarži kontroly specifické a je uvedeno na *COBAS AMPLICOR HCV MONITOR Test, v2.0 Data Card*, dodané v rámci soupravy. Tato rozmezí se do přístroje COBAS AMPLICOR Analyzer vkládají pomocí klávesnice, snímače čárových kódů nebo software AMPLILINK během sestavování pracovního seznamu pro A-kruh(y) (viz příručku *Operator's Manual*).

Počet IU/ml HC by měl jak pro HCV MONITOR Low (+) Control, tak pro HCV MONITOR High (+) Control ležet v rozmezí uvedeném na *COBAS AMPLICOR HCV MONITOR Test, v2.0 Data Card*. Pokud tomu tak u některé z HCV MONITOR (+) Controls není, je celé měření neplatné je pak třeba celý postup, tj. přípravu vzorků a kontrol, reverzní transkripci, amplifikaci a detekci, zopakovat. Jestliže leží počet kopií HCV v jednom ml u jedné nebo obou HCV MONITOR (+) Controls mimo přiřazené rozmezí soustavně, obraťte se o technickou pomoc na místní zastoupení firmy Roche.

Nač je třeba při postupu dbát

Pracovní tok musí v laboratoři probíhat jednosměrně, 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 reagentů 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 typů 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 MONITOR Test, v2.0 používat nesmějí.

Hodnoty generované testem COBAS AMPLICOR HCV MONITOR Test, v2.0 se také nedají přímo porovnávat s hodnotami generovanými testem AMPLICOR HCV MONITOR Test, v1.0.

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

Díky přítomnosti enzymu AmpErase v HCV MONITOR 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.

S produktem nechtě pracují pouze pracovníci znalí technik PCR.

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

Rušivé látky

- ***Heparin inhibuje PCR, Vzorky odebrané s heparinem nepoužívejte.***
- Je prokázáno, že zvýšené hladiny triglyceridů, bilirubinu, albuminu, imunoglobulinů a hemoglobinu ve vzorcích stanovení HCV RNA tímto testem neruší.
- Výsledky testů získané v rámci klinických studií na pacientech podstupujících léčbu interferonem prokázaly, že interferon- α 2a/b nemá na COBAS AMPLICOR HCV MONITOR Test, v2.0 žádný vliv.

Charakteristika neklinických funkčních parametrů

Mez detekce

Mez detekce COBAS AMPLICOR HCV MONITOR Test, v2.0 byla stanovena analýzou zředění mezinárodního standardu HCV RNA WHO, kód NIBSC 96/790. Součástí panelu pro stanovení meze detekce byly připraveny naředěním rehydrovaného standardu v HCV-negativní lidské plazmě a HCV-negativním lidském séru na koncentrace 800, 700, 600, 500 a 400 IU/ml na základě přiřazené hodnoty 10^5 IU/ml. Test byl proveden metodou COBAS AMPLICOR HCV MONITOR Test, v2.0. Pět pracovníků testovalo po pět dnů vždy po čtyřech identicky opakovaných analýzách koncentrací 800, 700, 600, 500 a 400 IU/ml v plazmě a séru (celkem 100 identických opakování [replikátů]). Ředící série byly připravovány denně čerstvě. Mez detekce byla stanovena jako nejnižší koncentrace HCV, kde 95 % nebo více hodnot A_{660} HCV bylo $\geq 0,1$. Výsledky této studie ukazují, že COBAS AMPLICOR HCV MONITOR Test, v2.0 detekuje s četností pozitivity 95 % HCV RNA v koncentracích 600 IU/ml nebo vyšších (viz tab. 2 a 3).

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

HCV RNA (IU/ml)	Replikáty (n)	HCV RNA Pozitivních (n)	HCV RNA Pozitivních (%)
800	95 ^{1,2}	94	98,8 %
700	96 ¹	92	95,8 %
600	96 ¹	93	96,9 %
500	96 ¹	90	93,8 %
400	96 ¹	86	89,6 %

¹ Jedno měření čtyř identických opakování každé koncentrace HCV bylo neplatné v důsledku toho, že jedna vysoká pozitivní kontrola ležela mimo rozsah

² Jeden replikát byl neplatný (HCV a QS negativní)

Tabulka 3
Mez detekce mezinárodního standardu WHO pro HCV RNA v séru

HCV RNA (IU/ml)	Replikáty (n)	HCV RNA Pozitivních (n)	HCV RNA Pozitivních (%)
800	99 ¹	98	99,0 %
700	99 ²	98	99,0 %
600	100	99	99,0 %
500	99 ²	92	92,9 %
400	97 ³	87	89,7 %

¹ Jeden replikát byl neplatný (HCV a QS negativní).

² Výsledek jednoho replikátu ležel mimo sekvenci (neplatný). V řadě ředění amplikonu nebyl dodržen trend klesající hodnoty A_{660} se zředěním rostoucím od č. 1 do č. 4 (viz část *Kontrola údajů*).

³ Výsledky tří replikátů ležely mimo sekvenci (neplatné). V řadě ředění amplikonu nebyl dodržen trend klesající hodnoty A_{660} se zředěním rostoucím od č. 1 do č. 4 (viz část *Kontrola údajů*).

Lineární rozmezí

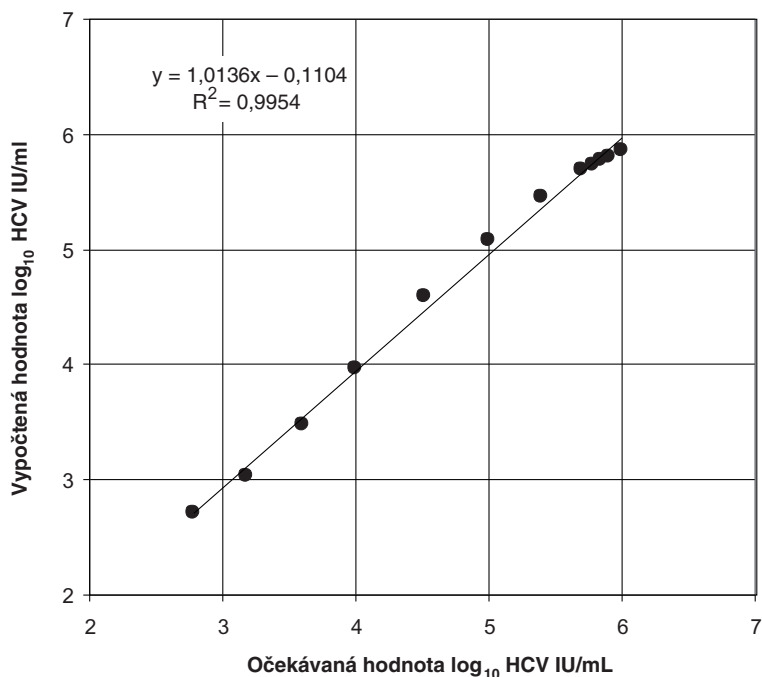
Panel pro testování linearity byl připraven paralelním ředěním poolu HCV-pozitivní plazmy o vysokém titru ve sloučené (pooled) HCV-negativní lidské plazmě. Koncentrace se pohybovaly v rozmezí od 600 IU/ml (mez detekce) do 1 000 000 IU/ml. Po šest dnů opakovaně testovali jednotlivě tři pracovníci tuto ředící sérii za použití tří šarží soupravy COBAS AMPLICOR HCV MONITOR Test, v2.0. Celkem tři ředící série byly připravovány obden čerstvé. S každou součástí panelu linearity byly provedeny celkem 72 testy.

„Očekávaný“ titer poolu vysoce HCV-pozitivní plazmy byl stanoven kalibrací mezinárodního standardu HCV RNA WHO, kód NIBSC 96/790. Koncentrace HCV byly součástí panelu přiřazeny na základě jejich příslušných faktorů zředění.

Všechny vypočtené hodnoty jednotlivých zředění poolu vysoce HCV-pozitivní plazmy byly vyneseny proti očekávanému titru HCV podle zředění. Ty body, které ležely v rámci 0,2 log „očekávané“ hodnoty IU/ml, byly považovány za ležící uvnitř lineárního rozmezí testu. Jak vidíme z obr. 1, činí lineární rozmezí testu COBAS AMPLICOR HCV MONITOR Test, v2.0 600 IU/ml (mez detekce) až 700 000 IU/ml.

Obr. 1

Lineární rozmezí testu COBAS AMPLICOR HCV MONITOR Test, v2.0

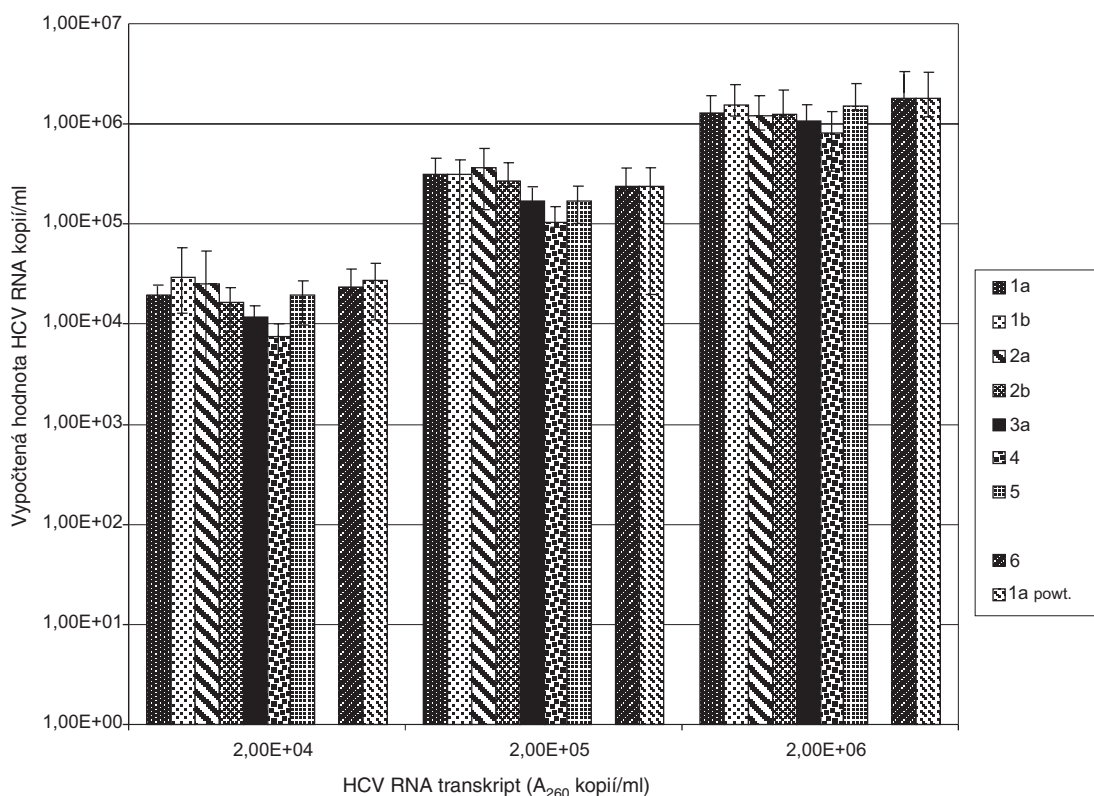


Amplifikace genotypů HCV

HCV RNA transkripty reprezentující genotypy HCV 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 4 a 5 byly stanoveny spektrofotometricky a následně zředěny ředidlem HCV MONITOR Specimen Diluent, v2.0 na koncentrace přibližně 2 000 000, 200 000 a 20 000 kopií /ml. Testem COBAS AMPLICOR HCV MONITOR Test, v2.0 byly trojmo stanoveny tři série každého genotypu (n-9). Všechny transkripty genotypů HCV zkoumaných v této studii byly amplifikovány se srovnatelnou účinností, jak ukazuje obr. 2, přičemž největší rozdíl mezi vstupním počtem HCV kopií/ml a změřeným počtem kopií/ml byl u genotypu 4 při koncentraci 2 000 000 kopií/ml (0,41 log neboli 2,6-násobný rozdíl).

RNA transkript HCV genotypu 6 byl testován v rámci samostatné studie za použití téhož protokolu, s RNA transkriptem HCV RNA genotypu 1a jako referenčním (obr. 2). Největší rozdíl mezi genotypem 1a a genotypem 6 činil 0,018 log při koncentraci 20 000 kopií/ml.

Obr. 2
Počet HCV kopií/ml RNA transkriptů
různých genotypů HCV



Chybové úsečky = 2 směrodatné odchylky

COBAS AMPLICOR HCV MONITOR Test, v2.0 byl použit na panelu 51 HCV RNA-pozitivních vzorků v plazmě s EDTA reprezentujícím 15 genotypů a subtypů HCV (1a, 1b, 2a, 2b, 2c, 2d, 3a, 3b, 4a, 4c, 4f, 4g, 4h, 5a a 6a). Tímto testem byly získány všechny genotypy HCV testované jako pozitivní na HCV RNA a hodnoty HCV IU/ml (tab. 4).

Tabulka 4
Detekce 51 klinických vzorků různých genotypů HCV

	Genotyp HCV	Počet vzorků Testováno (n)	% s HCV RNA IU/ml Výsledky (HCV- pozitivní)
1	1a	7	7 (100 %)
2	1b	7	7 (100 %)
3	2a	4	4 (100 %)
4	2b	4	4 (100 %)
5	2c	3	3 (100 %)
6	2d	1	1 (100 %)
7	3a	5	5 (100 %)
8	3b	1	1 (100 %)
9	4a	2	2 (100 %)
10	4c	3	3 (100 %)
11	4f	1	1 (100 %)
12	4g	1	1 (100 %)
13	4h	2	2 (100 %)
14	5a	4	4 (100 %)
15	6a	6	6 (100 %)
	Celkem	51	51 (100 %)

Exkluzivita mikroorganismů

Analytická specifická testu COBAS AMPLICOR HCV MONITOR Test, v2.0 byla hodnocena tak, že do HCV-negativní lidské plazmy byly přidány vypěstované buňky nebo viry z následujících organismů nebo virů. Mezi testovanými vzorky byla řada izolátů patogenních mikroorganismů, které mohou být v patientských vzorcích přítomny, jako jsou HIV-1, CMV, HSV apod., a izoláty normální epidermální mikroflóry a komensálních organismů přítomných ve vzorcích. Celkové množství extrahovaných izolátů v amplifikační reakci se pohyboval v mezích od $4,3 \times 10^4$ do $2,2 \times 10^5$ kopií u subtypů HIV-1, od $10^{1,9}$ do $10^{7,9}$ TCID₅₀ u všech non-HIV-1 virových izolátů a od $4,5 \times 10^5$ do $1,2 \times 10^7$ buněk u bakteriálních izolátů. Každý nastříknutý vzorek prošel celým postupem od přípravy vzorku přes RT/PCR amplifikaci po detekci podle části „Návod k použití“ této metodické příručky. Žádný z testovaných non-HCV organismů nebo virů nevykazoval v testu COBAS AMPLICOR HCV MONITOR Test, v2.0 křížovou reaktivitu (tab. 5).

Pomocí COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0, citlivějšího kvalitativního testu na HCV RNA používajícího tytéž primery a sondy, bylo testováno dvanáct různých členů *Flaviviridae* a u žádného z následujících členů nebyla zjištěna křížová reaktivita: Západonilský virus řady I a II, virus encefalitidy St. Louis, virus encefalitidy Murray Valley, virus Dengue typu 1, 2, 3 a 4; virus žluté zimnice, Zika virus, Banzi virus a Ilheus virus.

Tabulka 5
Exkluzivita mikroorganismů

	Popis izolátu/vzorku	Vzorky (n)	HCV RNA Detekováno (n)	QS platný (n)
1	Adenovirusy: Adenovirus 2, 3 & 7	3	0	3
2	Enterovirusy: • Echovirus 1 • Coxsackievirus B1	2	0	2
3	Herpesvirus: • Herpes simplex viry (typ I - F, HF a McIntyre; typ II - G a MS) • Lidské herpes viry 6 a 7 • Cytomegalovirus (kmeny AD-169, Davis a Towne) • Virus varicella-zoster (Ellen a Oka) • Virus Epsteinův-Barrové	13	0	13
6	HIV-1: Subtypy A - F	6	0	6
7	Papilloma viry: • Lidský papilloma virus (Typy 6a, 16 a 18)	3	0	3
8	<i>Propionibacterium acnes</i>	1	0	1
9	<i>Staphylococcus aureus</i> (subsp. Rosenbach NCTC 8530 a D1470) a <i>epidermis</i>	3	0	3
	Celkem	31	0	31

Non-HCV-virová hepatitida

Pomocí COBAS AMPLICOR HCV MONITOR Test, v2.0 bylo analyzováno deset vzorků plazmy s citrátem od osob se zvýšenou hladinou HAV-IgM (ukazující na infekci virem HAV), deset vzorků séra od osob se zvýšenou hladinou povrchového antigenu hepatitidy B (HBsAg, ukazující na infekci virem HBV) a deset klinických vzorků séra od pacientů infikovaných více než 4×10^7 kopií/ml HBV DNA za použití HBV PCR testu pro výzkumné účely. Ve všech vzorcích od osob infikovaných virem HAV nebo HBV byla HCV RNA testem COBAS AMPLICOR HCV MONITOR Test, v2.0 nedetekovatelná (tab. 6). COBAS AMPLICOR HCV MONITOR Test, v2.0 je tedy pro detekci HCV RNA specifický a při běžných virech hepatitidy HAV nebo HBV, nedává ani falešně pozitivní, ani falešně negativní výsledky.

Tabulka 6
Vzorky s non-HCV-virovou hepatitidou

	Popis vzorku	Počet vzorků (n)	HCV RNA Detekováno (n)	QS platný (n)
1	Virus hepatitidy A (HAV IgM+)	10	0	10
2	Virus hepatitidy B (HBsAg+)	10	0	10
3	Virus hepatitidy B (HBV DNA+)	10	0	10
	Celkem	30	0	30

Rušivý vliv léčiv

Potenciální rušivý vliv při použití soupravy COBAS AMPLICOR HCV MONITOR Test, v2.0 byl zkoumán u dvaceti dvou léčiv, jež mohou být podávána pacientům infikovaným virem HCV, HIV, HBV nebo CMV. Rušivý vliv byl testován tak, že byla do HCV-pozitivní plazmy obsahující 2000 nebo 200 000 IU/ml HCV a do HCV-negativní lidské plazmy jednotlivá léčiva byla přidána ve třech koncentracích: nulové (0X C_{max}), špičkové v plazmě (1X C_{max}) a v trojnásobku špičkové koncentrace v plazmě (3X C_{max}). Každá kombinace koncentrace HCV a koncentrace léčiva byla testována trojmo.

Seznam s uvedením názvů a výrobců oněch 22 léčiv, u nichž byl testován rušivý vliv při koncentracích 1X C_{max} a 3X C_{max} , je reprodukován v tab. 7.

Tabulka 7
Souhrn léčiv testovaných s ohledem na svůj potenciální rušivý vliv

#	Obchodní název léčiva	Generický název léčiva	Výrobce	1X C_{max}	3X C_{max}	Jednotky
1	Crixivan®	Indinavir sulfate	Merck & Co., Inc.	8,98	26,94	µg/ml
2	Cytovene®	Ganciclovir	Hoffmann-La Roche	1,18	3,54	µg/ml
3	Epivir HBV®	Lamivudine, 3TC	GlaxoSmithKline	1,5	4,5	µg/ml
4	Fortovase®	Saquinavir	Hoffmann-La Roche	2,477	7,431	µg/ml
5	Hivid®	Zalcitabine, ddC	Hoffmann-La Roche	25,2	75,6	ng/ml
6	Infergen®	Interferon alfacon-1	AMGEN Inc.	0,15	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®	Paroxetine HCl	GlaxoSmithKline	61,7	185,1	ng/ml
11	Pegasys™	Peginterferon alpha-2a	Hoffmann-La Roche	18	54	ng/ml
12	Prozac®	Fluoxetine HCl	Eli-Lilly & Co.	302	906	ng/ml
13	Rescriptor®	Delavirdine mesylate	Pharmacia & Upjohn	19,3	57,9	µg/ml
14	Retrovir®	Zidovudine	GlaxoSmithKline	1,06	3,18	µg/ml
15	Roferon®-A	Interferon alfa-2a	Hoffmann-La Roche	2,58	7,74	ng/ml
16	Symmetrel®	Amantadine HCl	Endo Pharmaceuticals Inc.	0,51	1,53	µg/ml
17	Videx®	Didanosine, ddl	Bristol-Myers Squibb Co.	2,32	6,96	µg/ml
18	VIRACEPT®	Nelfinavir mesylate	Agouron Pharmaceuticals Inc.	4	12	µg/ml
19	Viramune®	Nevirapine	Roxane Laboratories, Inc.	4,5	13,5	µg/ml
20	Zadaxin®	Thymosin alpha 1	SciClone	100	300	ng/ml
21	ZERIT®	Stavudine, d4T	Bristol-Myers Squibb Co.	4,15	12,45	µg/ml

Při všech koncentracích léčiva byly všechny HCV-pozitivní vzorky plazmy v testu AMPLICOR HCV MONITOR Test, v2.0 HCV RNA-pozitivní a podobně všechny HCV-negativní vzorky plazmy byly v testu HCV RNA-negativní. Všechny vypočtené hodnoty IU/ml při všech koncentracích léčiva a při obou vstupních koncentracích HCV RNA ležely v mezích 0,34 log (2,19-násobku) vypočtené hodnoty IU/ml za nepřítomnosti léčiva.

Průvodní infekce k HCV

Na potenciální rušivý vliv průvodního viru byly testovány vzorky od pacientů pozitivních na HCV-protilátky, kteří byli současně infikováni virem HAV, HBV nebo HIV: HBV/HCV (n = 10), HIV/HCV (n = 11), HIV/HBV/HCV (n = 5) a HAV/HBV/HCV (n = 2).

Vzorky byly považovány za pozitivní na HCV na základě anti-HCV-pozitivních výsledků. Jako důkaz infekce virem HAV sloužily celkové protilátky k HAV. Za důkaz infekce virem HBV byl pokládán povrchový antigen hepatitidy B. Za důkaz infekce virem HIV byly považovány protilátky k HIV. K dalšímu hodnocení anti-HCV-pozitivních vzorků HCV RNA-nedetekovatelným výsledkem testu byly použity další tři páry HCV primerů.

Pět anti-HCV-seropozitivních vzorků, dva vzorky HBV/HCV, jeden vzorek HIV/HBV/HCV a dva vzorky HAV/HBV/HCV byly v testu COBAS AMPLICOR HCV MONITOR Test, v2.0 HCV RNA-negativní (tab. 8). Výsledky pro kvantifikační standardy byly u všech pěti vzorků platné, což ukazuje, že PCR reakce nejsou inhibovány a výsledky testů jsou platné. U oněch pěti HCV-negativních vzorků bylo provedeno testování navržené pro případ diskrepancí za použití tří dalších párů primerů. Výsledky pro všech pět vzorků se všemi třemi páry primerů byly negativní, což ukazuje, že ve vzorcích nebyla HCV RNA přítomna. Průvodní infekce virem HAV, HBV nebo HIV podle serologických zkoušek u HCV-seropozitivních vzorků detekci ani stanovení HCV RNA soupravou COBAS AMPLICOR HCV MONITOR Test, v2.0 neruší.

Tabulka 8
Rušivý vliv průvodních infekcí k HCV

Průvodní infekce Vzorek	Počet vzorků (n)	HCV RNA Detekováno (n)	QS platný (n)
HBV/HCV	10	*8	10
HIV/HCV	11	11	11
HIV/HBV/HCV	5	*4	5
HAV/HBV/HCV	2	*0	2
Celkem	28	*23	28

* Oněch pět vzorků, které byly v testu COBAS AMPLICOR HCV MONITOR Test, v2.0 HCV RNA-negativní, bylo také negativních v testování navrženém pro případ diskrepancí pomocí tří dalších párů primerů

Přesnost v rámci jednoho měření

Přesnost v rámci jednoho měření (within-run precision) byla hodnocena dvěma laboratořemi v Evropě za použití 10-násobného sériového ředění HCV-pozitivních vzorků plazmy o vysokém titru reprezentujících genotypy 1a, 1b, 2b, 2c a 3a. Všechna ředění se prováděla za použití HCV-negativní lidské plazmy. Každé měření zahrnovalo po 6 identických vzorcích (replikátech) od každého zředění, které testem COBAS AMPLICOR HCV MONITOR Test, v2.0 analyzoval téhož dne týž pracovník. Výsledky jsou uvedeny v tab. 9.

Tabulka 9
Přesnost v rámci jednoho měření (within-run precision) testu
COBAS AMPLICOR HCV MONITOR Test, v2.0

Vzorek Počet	Zředění Počet	HCV Genotyp	HCV RNA IU/ml		
			Průměr	Směrod. odch.	Variační koef.
71824305	1	1a	593 000	90 100	15 %
	2		58 600	6 100	10 %
	3		6 520	1 340	21 %
	4		< 600	NA	NA
71815620	1	1b	> 700 000	NA	NA
	2		43 300	6 020	14 %
	3		4 910	538	11 %
	4		784	237	30 %
71823667	1	2b	593 000	167 000	28 %
	2		27 600	4 110	15 %
	3		2 370	323	14 %
	4		< 600	NA	NA
72249021	1	2c	529 000	178 000	34 %
	2		44 300	11 762	27 %
	3		3 970	987	25 %
	4		< 600	NA	NA
72237713	1	3a	572 000	170 000	30 %
	2		37 100	8 330	22 %
	3		3 600	1 070	30 %
	4		< 600	NA	NA
72249864	1	3a	387 000	49 800	13 %
	2		35 300	2 980	8 %
	3		3 310	1 220	37 %
	4		< 600	NA	NA

Přesnost mezi různými měřeními (run-to-run precision)

Přesnost mezi různými měřeními byla hodnocena dvěma laboratořemi v Evropě za použití 10-násobného sériového zředění HCV-pozitivních vzorků plazmy o vysokém titru reprezentujících genotypy HCV 1b, 2b a 3a. K ředění byla používána HCV-negativní lidská plazma. V laboratoři A se analyzovala zředění č. 1 - 3, v laboratoři B zředění č. 2 - 4. Každé měření zahrnovalo po dvou identických vzorcích (replikátů) od každého zředění, které soupravou COBAS AMPLICOR HCV MONITOR Test, v2.0 analyzoval šest dnů po sobě vždy týž pracovník. Výsledky jsou uvedeny v tab. 10.

Tabulka 10
Přesnost mezi jednotlivými měřeními (run-to-run precision)
testu COBAS AMPLICOR HCV MONITOR Test, v2.0

Vzorek Počet	Laboratoř	Zředění Počet	HCV Genotyp	HCV RNA IU/ml		
				Průměr	Směrod. odch.	Variační koef.
71815620	A	1	1b	554 960	148 472	27%
		2		80 272	14 400	18%
		3		6 808	1 509	22%
	B	2		77 337	16 996	22%
		3		5 919	1 386	23%
		4		604	103	17%
71823667	A	1	2b	409 611	40 724	10%
		2		49 151	7 942	16%
		3		3 717	894	24%
	B	2		40 729	11 718	29%
		3		5 215	5 862	112%
		4		< 600	NA	NA
72237713	A	1	3a	423 321	33 913	8%
		2		53 592	11 519	21%
		3		4 608	462	10%
	B	2		44 155	8 175	19%
		3		3 098	299	10%
		4		< 600	NA	NA

Zhodnocení klinických výsledků

Klinická specifita

Klinická specifita testu COBAS AMPLICOR HCV MONITOR Test, v2.0 byla stanovena analýzou vzorků plazmy od 530 anti-HCV- a HCV RIBA-negativních dárců krve, které poskytlo Sacramento Blood Center v USA. Testem COBAS AMPLICOR HCV MONITOR Test, v2.0 nebyla v žádném z těchto vzorků detekována žádná HCV RNA. Předpokládáme-li u těchto dárců se seronegativní plazmou nulovou prevalenci infekce virem HCV, činí specifita testu 100%. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 11.

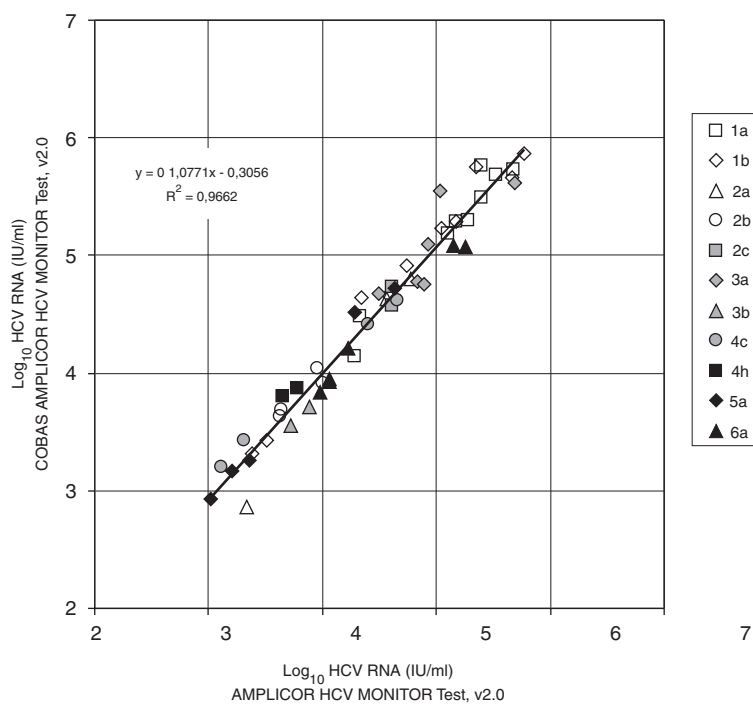
Tabulka 11
Klinická specifita testu COBAS AMPLICOR HCV MONITOR Test, v2.0

N	HCV RNA (IU/ml)		HCV Absorbance u 660 nm		
	Počet Nedetekovatelné	Počet pozitivních	Průměr	Minimum	Maximum
530	530	0	0,018	0,000	0,069

Korelace s testem soupravou AMPLICOR HCV MONITOR Test, v2.0

Soupravou COBAS AMPLICOR HCV MONITOR Test, v2.0 i AMPLICOR HCV MONITOR Test, v2.0 byly testovány 33 klinické vzorky od pacientů infikovaných 11 různými subtypy viru hepatitidy. S oběma soupravami pracovali dva pracovníci za použití různých šarží činidel pro každý test. Výsledkem bylo 25 nahlásitelných výsledků (v lineárním rozmezí u obou testů) od jednoho pracovníka a 28 od druhého pracovníka. Na obr. 3 vidíme korelaci mezi oběma testy u klinických vzorků o titrech HCV RNA zaujímajících celý lineární rozsah testů. Tyto údaje prokazují dobrou korelaci mezi oběma testy, což znamená, že na jakýkoliv vzorek od pacienta lze aplikovat údaje získané kterýmkoliv z obou testů.

Obr. 3
COBAS AMPLICOR HCV MONITOR Test, v2.0
vs. AMPLICOR HCV MONITOR Test, v2.0
(všechny genotypy)



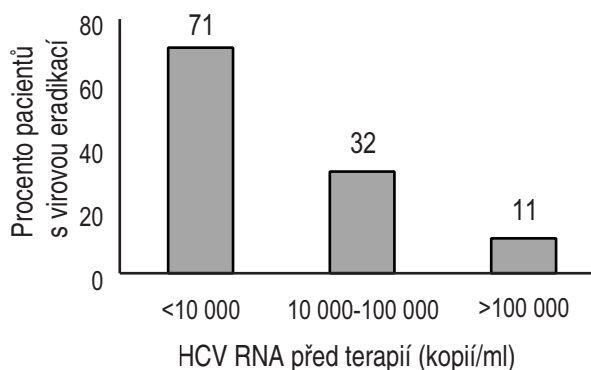
Klinická využitelnost měření hladiny HCV RNA před terapií

V dokumentech „European Association for the Study of the Liver (EASL) International Consensus Statement 1999“ a „National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement for the Management of Hepatitis C: 2002“ se poukazuje na to, že kvantitativní testování HCV RNA může být užitečné pro posouzení pravděpodobnosti odezvy na antivirovou terapii¹⁻². V „EASL Statement“ se doporučuje kvantitativní testování na HCV RNA před léčbou a konstatuje se, že u pacientů s vyšší viremii (nad 2 miliony kopií/ml) je menší pravděpodobnost, že budou na terapii reagovat. V dokumentu se také navrhuje využívat hladiny HCV RNA před terapií ve spojení s genotypem HCV ke stanovení délky léčby. Nižší je uvedeno několik publikovaných studií, kde se stanovením hladiny HCV RNA pomocí soupravy AMPLICOR nebo COBAS AMPLICOR HCV MONITOR Test, v2.0 prokázalo, že u pacientů s nízkou hladinou HCV RNA před léčbou je větší pravděpodobnost, že budou reagovat na léčbu interferonem. Přes rozdíly ve způsobu provedení testu (manuální vs poloautomatizovaná) nebo rozdílné verze testu použité ve studiích i rozdílnost v hodnoceném terapeutickém přístupu výsledky konzistentně prokazují, že při vyšších hladinách HCV RNA před léčbou je prognóza reakce na léčbu horší. V řadě studií se prokázalo, že výchozí virová zátěž je prediktorem jak virologické, tak biochemické odezvy na tyto terapie.

Soffredini et al.¹⁹ použil AMPLICOR HCV MONITOR™ Test k posouzení využitelnosti hodnot HCV RNA před léčbou jakožto prediktoru odezvy na léčbu interferonem. Medián hodnot HCV RNA před léčbou byl 5 322 kopií/ml u pacientů, kteří dosáhli trvalé virologické a biochemické reakce na interferon, oproti 83 125 kopií/ml u pacientů, kteří na léčbu nereagovali nebo u nichž došlo po počáteční reakci na léčbu k recidivě ($p = 0,01$). Za použití tzv. receiver-operating characteristic (ROC) analýzy autoři stanovili, že nereagování na terapii predikuje nejlépe hladina HCV RNA před léčbou ve výši 22 134 kopií/ml (citlivost 72 %, specifická 75 %).

Shiratori et al.²⁰ zjistili virovou eradikaci po terapii u 71 % pacientů s počtem $< 1 \times 10^4$ kopií/ml HCV RNA, stanovenými metodou AMPLICOR HCV MONITOR™ Test. Autoři konstatují, že stanovení HCV-RNA v séru je pro predikci reakce na léčbu interferonem užitečné. Ovšem při vyšších hladinách HCV RNA není virová eradikace častá (obr. 4).

Obr. 4
Podíl pacientů s virovou eradikací
jako funkce hladiny HCV RNA před léčbou (Shiratori et al. 1997)



V rámci studie, kde byl AMPLICOR HCV MONITOR Test použit ke stanovení hladiny HCV RNA v séru před léčbou, zjistil Kakumu et al.²¹ multivariační analýzou, že jedinými nezávislými faktory spojenými s trvalou reakcí na interferonovou terapii jsou hladina HCV RNA v séru a genotyp HCV. V této studii činila průměrná hladina HCV RNA před léčbou u respondérů 4,2 log, což je významně méně než hladina 5,6-log u non-respondérů ($p < 0,0001$). Trvalé reakce na interferon se dosáhlo u 81 % pacientů, u nichž byla hladina HCV RNA před léčbou nižší než 1×10^5 kopií/ml, zatímco z pacientů, u nichž byla hladina HCV RNA před léčbou vyšší, bylo trvalé reakce dosaženo pouze u 19 %. Hladina HCV RNA před léčbou byla také korelována s dobou do zmizení viremie; multivariační analýzou se zjistilo, že nejsilnějším prediktorem dlouhodobé reakce je vymizení viremie do druhého týdne léčby. HCV genotyp 1b se vyskytoval u 81 % pacientů, kteří na terapii nereagovali, a pouze u 44 % pacientů, u kterých se dosáhlo trvalé reakce.

Izopet et al.²² studoval vztah mezi HCV RNA a účinností léčby interferonem alfa u 126 pacientů s chronickou hepatitidou C. S trvalou reakcí se pojily tři nezávislé faktory: nízká výchozí hladina HCV, genotyp non-1 a ženské pohlaví (tab. 12).

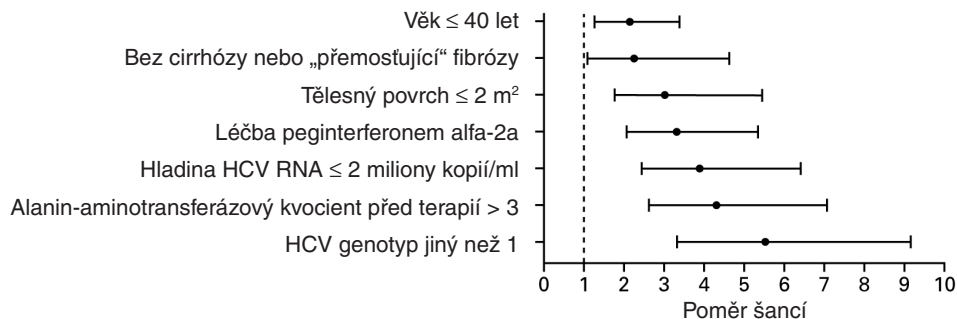
Tabulka 12
Proměnné před léčbou spojené s trvalou kompletní reakcí při univariační a multivariační analýze (Izopet et al., 1998)

Proměnná	Poměr šancí Poměr	95% interval spolehl. Interval	P
Univariační analýza			
Nižší HCV RNA ^a	3,23	1,80–5,80	< 0,001
Genotyp HCV non-1	31,2	4,03–241,6	< 0,001
Ženské pohlaví	3,47	1,25–9,64	0,017
Normální aktivita gama-GT	4,58	1,27–16,5	0,02
Multivariační analýza			
Nižší HCV RNA ^a	1,95	1,01–3,77	0,045
Genotyp HCV non-1	20,0	2,38–168,3	0,006
Ženské pohlaví	4,0	1,25–12,78	0,019

^a Poměry šancí (odds ratios) jsou ty, které jsou spojeny s výchozí koncentrací nižší o 1,0 v log kopií na mililitr.

Zeuzem et al.²³ vyvodili podobné závěry ze studie na chronických HCV pacientech léčených peginterferonem alfa-2a, u nichž byla virová zátěž vyhodnocována testem COBAS AMPLICOR HCV MONITOR Test, v2.0. Při použití násobného logistického regresního modelu se s trvalou virologickou reakcí nezávisle a významně pojily hladina HCV RNA $< 2 \times 10^6$ kopií/ml, alanin-aminotransferázový kvocient před léčbou a jiný genotyp HCV než 1 (všechna $p < 0,001$). Kombinace genotypu HCV jiného než 1 a hladina HCV RNA před léčbou je silným prediktorem trvalé virologické odezvy (obr. 5).

Obr. 5:
Nezávislé faktory pojící se s trvalou virologickou reakcí podle násobné logisticko-regresní analýzy (Zeuzem et al., 2000)



Také Lee et al.²⁴ za použití testu AMPLICOR HCV MONITOR Test, v2.0 prokázali, že genotyp non-1 a výchozí hladina HCV RNA jsou nejsilnějšími nezávislými prediktory trvalé virové odezvy; poměr šancí (odds ratio) u pacientů léčených peginterferonem alfa-2a byl po řadě 4,11 a 3,25. Jelikož podle postupné regresní analýzy je dominantním faktorem genotyp, byly analýzy zopakovány zvláště pro pacienty s genotypy 1 a non-1. Oběma analýzami se prokázalo, že je výchozí hladina HCV RNA nezávisle spojena s trvalou virovou odezvou: (poměr šancí u genotypu 1 byl 4,34, u genotypů non-1 činil 2,45).

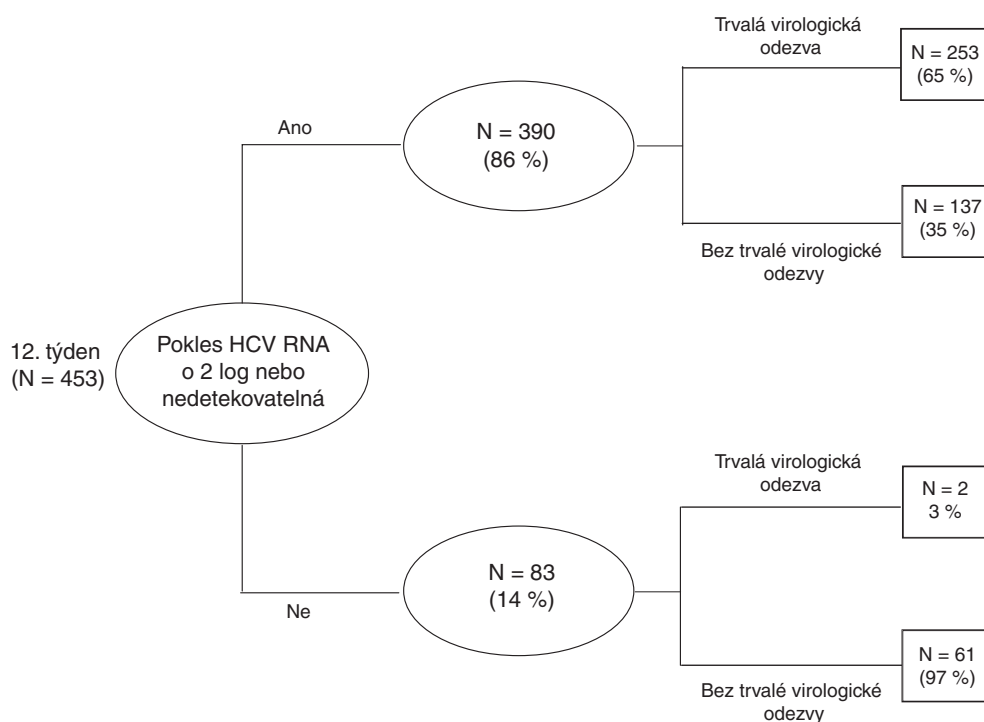
Jaekel et al.²⁵ použil COBAS AMPLICOR HCV MONITOR Test, v2.0 k posouzení virové zátěže u pacientů s akutní hepatitidou v rámci studie, jejímž cílem bylo zjistit, jestli může léčba interferonem alfa-2b sloužit k prevenci chronické infekce. Virová zátěž byla hodnocena před léčbou (0. týden) a ve 2., 4., 12., 24. a 48. týdnu. Průměrná doba, kdy hladina HCV RNA přestala být detekovatelná, byla 3,2 týdnů, přičemž u 42 ze 43 pacientů, kteří absolvovali následnou péči ve 24 týdnech, bylo dosaženo stálé reakce.

Klinická využitelnost měření hladiny HCV RNA během terapie

Výzkumem se v poslední době zjistilo, že vysoce prediktivním ukazatelem pro konečný výsledek léčby je brzký pokles (během 2–12 týdnů) hladiny HCV RNA po zahájení léčby.²⁶⁻²⁸ Pacienti, u kterých se brzký významný pokles neprojeví, nejspíše už vůbec reagovat nebudou. Ve studii necirhotických pacientů infikovaných virem HCV, kde byla hladina HCV RNA hodnocena pomocí testu AMPLICOR HCV MONITOR Test, Fallows et al. zjistili, že po 2 a 4 týdnech léčby interferonem alfa je u respondérů hladina HCV RNA významně nižší než u non-respondérů ($p < 0,001$)²⁶.

Použitím soupravy COBAS AMPLICOR HCV MONITOR Test, v2.0 k měření hladiny HCV RNA potvrdil Fried et al.²⁷, že silným prediktorem trvalé virologické reakce je počáteční pokles koncentrace HCV RNA minimálně o 2 log. Ve 12. týdnu vykazovalo 86 % (390 ze 453) pacientů léčených peginterferonem alfa-2a plus ribavirinem buď pokles hladiny HCV RNA o 2 log nebo hladinu HCV RNA zcela nedetekovatelnou (obr. 6).

Obr. 6
Predikovatelnost trvalé virologické reakce (Fried et al., 2002)



Davis²⁸ zkombinoval údaje ze dvou velkých klinických studií léčby peginterferonem plus ribavirinem a ukázal, že jako prediktor trvalé virové reakce může sloužit pokles hladiny HCV RNA po 12 týdnech léčby minimálně o 2 log. Speciálně může použití tzv. „early stopping point rule“ pomoci určit, zda se má u pacienta s léčbou pokračovat. Z 187 pacientů, kteří poklesu hladiny HCV RNA o 2 log během prvních 12 týdnů léčby nedosáhli, reagovali na léčbu jenom tři (1,6 %).

Tabulka 13
**Negativní prediktivní hodnoty různých virových a časových definicí
brzké virologické reakce, seřazené od nejrigoróznější k nejméně rigorózní
(Davis, 2002)**

Virová reakce v časovém bodě	4 týdnů	12 týdnů	24 týdnů
PCR-negativní	0,57 (0,53–0,61)	0,85 (0,75–0,92)	0,94 (0,90–0,96)
Pokles HCV RNA o ≥ 3 logs nebo k negativním	0,73 (0,70–0,76)	0,96 (0,95–0,96)	0,97 (0,96–1,00)
Pokles HCV RNA o ≥ 2 logs nebo k negativním	0,82 (0,75–0,87)	0,98 (0,96–0,99)	0,96 (0,95–1,00)
Pokles HCV RNA o ≥ 1 log nebo k negativním	0,91 (0,83–0,95)	0,97 (0,92–0,99)	0,96 (0,95–1,00)

Jak Fried²⁷, tak Davis²⁸ dochází k závěru, že 12 týdnů je klinicky neužitečnějším časovým bodem, kdy se má měřit virová zátěž a minimalizovat počet přerušeni léčby u pacientů, kteří by nakonec mohli po absolvování plné léčby reagovat.

Souhrn a závěry

Jak je uvedeno výše, bylo soupravy AMPLICOR nebo COBAS AMPLICOR HCV MONITOR Test, v2.0 k měření hladiny HCV RNA u pacientů hodnocených z hlediska léčby a její účinnosti použito u řady studií zabývajících se monoterapií i kombinovanou terapií. Nejběžnějšími kritérii k posouzení, zda pacient na terapii reaguje, jsou virologická odezva a genotyp; ovšem vztah mezi hladinou před léčbou a reakcí na léčbu není absolutní, protože mezi hladinami HCV RNA u responderů a non-responderů je značný překryv. Jak je tomu u každého diagnostického testu, je třeba výsledky z testů AMPLICOR nebo COBAS AMPLICOR HCV MONITOR Test, v2.0 interpretovat s uvážením všech virologických, biochemických a histologických nálezů daného pacienta.

Literatura

1. Consensus Statement. EASL International Consensus Conference on Hepatitis C. Paris, 26.-28. 2. 1999. *J Hepatol* 1999; **31 Suppl** 1:3-8
2. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement Management of Hepatitis C: 2002. 10.-12. 6. 2002.
3. Consensus Statement. AFEF Conference on Treatment of Hepatitis C. Paris. 27.-28. 2. 2002.
4. Lauer, G. M., Walker, B.D. 2001. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* **345**:41-52.
5. Kessler, H.H., Santner, B.I., Umlauft, F. et al. 1996. Quantitation and genotyping of Hepatitis C virus RNA in sera of hemodialysis and AIDS patients. *Clinical Diagnostic Virology* **5**:73-78.
6. Orito, E., Mizokami, M., Nakano, T. et al. 1994. Serum hepatitis C virus RNA level as a predictor of subsequent response to interferon- α therapy in Japanese patients with chronic Hepatitis C. *Journal of Medical Virology* **44**:410-414.
7. Reichard, O., Yun, Z.B., Sonnerborg, A. et al. 1993. Hepatitis C viral titers in serum prior to, during, and after oral treatment with ribavirin for chronic Hepatitis C. *Journal of Medical Virology* **41**:99-102.
8. Puoti, M., Zonaro, A., Ravagil, A. et al. 1992. Hepatitis C Virus RNA and antibody response in the clinical course of acute Hepatitis C virus infection. *Hepatology* **16**:877-881.
9. Young, K., Resnick, R., Myers, T. 1993. Detection of Hepatitis C virus RNA by a combined reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. *Journal of Clinical Microbiology* **31**:882-886.
10. Myers, T.W., Gelfand, D.H. 1991. Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase. *Biochemistry* **30**:7661-7666.
11. Stuyver, L., Rossau, R., Wyseur, A. et al. 1993. Typing of hepatitis C virus isolates and characterization of new subtypes using a line probe assay. *Journal of General Virology* **74**:1093-1102.
12. 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.
13. Bukh, J., Purcell, R.H., 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.
14. Longo, M.C., Berninger, M.S., Hartley, J.L. 1990. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* **93**:125-128.

15. Saldanha, J., Lelie, N., Heath, A. and the WHO Collaborative Study Group. 1999. Establishment of the First International Standard for Nucleic Acid Amplification Technology (NAT) Assays for HCV RNA. *Vox Sanguinis* **76**:149-158.
16. Richmond, J.Y., McKinney, R.W. eds. 1993 Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. HHS Publication Number (CDC) 93-8395.
17. 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.
18. International Air Transport Association. Dangerous Goods Regulations, 41st Edition. 2000. 704 pp.
19. Soffredini R., Rumi M.G., Del Ninno E., et al. 1998. Serum levels of hepatitis C virus RNA predict non-response to interferon therapy: comparison of two commercial assays. *Jour Viral Hep* **6**:65-71.
20. Shiratori Y., Kato N., Yokosuka O., et al. 1997. Quantitative assays for hepatitis C virus in serum as predictors of the long-term response to interferon. *Jour of Hep* **27**:437-444.
21. Kakumu S., Aiyama T., Okumura A., et al. 1997. Earlier loss of hepatitis C virus RNA in interferon therapy can predict a long-term response in chronic hepatitis C. *Journ Gastro and Hep* **12**:468-472
22. Izopet J., Payen J.-L., Alric L., et al. 1998. Baseline level and early suppression of serum HCV RNA for predicting sustained complete response to alpha-interferon therapy. *J Virol Med* **54**:86-91.
23. Zeuzem S., Feinman S., Rasenek J., et al. 2000. Peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C. *N Engl J Med* **343**: 1666-1672.
24. Lee S., Heathcote E., Reddy K., et al. 2002. Prognostic factors and early predictability of sustained viral response with peginterferon alfa-2a(40KD). *J. Hepatology* **37**:500-506.
25. Jaeckel E., Cornberg M., Wedmeyer H., et al. 2001. Treatment of acute hepatitis C with interferon alfa-2b. *N Engl J Med* **345**:1452-1457.
26. Fallows G., Kiata K., Minuk G., et al. 2000. Early changes in hepatitis C virus (HCV) RNA levels predict response to interferon treatment in noncirrhotic HCV patients. *Can J Gastroenterol* **14(Suppl B)**: 30B-35B.
27. Fried M., Shiffman M., Reddy K., et al. 2002. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* **347**: 975-982.
28. Davis G. 2002. Monitoring of viral levels during therapy of hepatitis C. *Hepatology* **36 (Suppl 1)**: S145-S151.



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® a ROFERON®A
jsou registrované obchodní známky společnosti Hoffmann-La Roche Inc.

AMPLICOR®, AMPLICOR MONITOR®, AMPLICOR HCV MONITOR®,
AMPLILINK® a AmpErase® jsou registrované obchodní známky a COBAS
AMPLICOR HCV MONITOR™ je obchodní známka společnosti Roche
Molecular Systems, Inc., licencovaná 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 společnosti 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® a Retrovir® jsou registrované obchodní známky
společnosti GlaxoSmithKline.

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

Impact® je registrovaná obchodní známka společnosti MATRIX Technologies, Inc.

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 and 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 nebo příbuzných společností, držitelů licence nebo partnerů ve společných podnicích.

Copyright 2003, Roche Molecular Systems, Inc.

Všechna práva vyhrazena.

5/2003

(58003601-03ENGL)

04497767001-01



Roche Diagnostics GmbH
D-68298 Mannheim

