

COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Test

PRO ÚČELY DIAGNOSTIKY *IN VITRO*.

COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Test	<table border="1"><tr><td>HCMCAP</td></tr></table>	HCMCAP	48 Tests	P/N: 03568547 190
HCMCAP				
COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® Wash Reagent	<table border="1"><tr><td>PG WR</td></tr></table>	PG WR	5.1 Liters	P/N: 03587797 190
PG WR				

POUŽITÍ

Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV je *in vitro* amplifikační test nukleové kyseliny pro kvantifikaci RNA viru hepatitidy C (HCV) v lidské plazmě nebo séru za použití zařízení COBAS® AmpliPrep pro automatizované zpracování vzorku a analyzátoru COBAS® TaqMan® nebo COBAS® TaqMan® 48 pro automatizovanou amplifikaci a detekci. Tento test se používá ve spojení s klinickými údaji a dalšími laboratorními markery HCV infekce k určování klinické terapie pacientů s chronickou infekcí HCV. Test může být použit pro zhodnocení pravděpodobnosti chronické virové odpovědi časně v průběhu antivirové terapie a pro zhodnocení virové odpovědi na antivirovou terapii měřené změnami hladin HCV RNA v séru nebo plazmě.

Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV 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

Virus hepatitidy C¹ je považován za hlavního etiologického původce zodpovědného za 90-95% případů potransfúzní hepatitidy non-A a non-B^{2,3}. HCV je virus s jednořetězcovou pozitivně orientovanou RNA s genomem obsahujícím zhruba 10 000 nukleotidů kódujících 3000 aminokyselin. HCV se vyskytuje v krvi, a proto se může krví a krevními deriváty přenášet. Rozsáhlým plošným vyšetřováním krve na přítomnost viru HCV se nebezpečí onemocnění hepatitidou spojené s krevní transfúzí výrazně snížilo. Incidence infekce virem HCV je nejvyšší v souvislosti s nitrožilním zneužíváním drog a v menší míře i s ostatními perkutánními aplikacemi³. Celosvětová prevalence infekce HCV, stanovená imunoserologickými testy se pohybuje v rozmezí od 0,6% v Kanadě až po 1,5% v Japonsku².

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. Kromě toho, přímá detekce metodami virové kultury není dostupná, i když je detekce antigenu jádra HCV možná.

Hladina alanin-aminotransferázy (ALT) se sice považuje za hrubý indikátor infekce virem HCV, není však přímou mírou virémie. Stupeň 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 (PCR) nabízí způsob měření aktivní virémie⁴⁻⁶. Pomocí PCR lze detekovat HCV virémii ještě před imunologickou sérokonverzí^{7,8} a detekovat změny virové zátěže u pacientů s chronickou infekcí virem HCV, kteří jsou pozitivní na protilátky a podrobují se terapii interferonem⁹.

PRINCIPY PROCEDURY

Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV je amplifikační test nukleové kyseliny pro kvantifikaci RNA viru hepatitidy C (HCV) v lidské plazmě nebo séru. Příprava vzorku je automatizována pomocí zařízení COBAS® AmpliPrep s amplifikací a detekcí automatizovanou pomocí analyzátoru COBAS® TaqMan® nebo COBAS® TaqMan® 48.

Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV je založen na třech základních procesech: (1) přípravě vzorku pro izolaci HCV RNA; (2) reverzní transkripci cílové RNA pro vytvoření komplementární DNA (cDNA), a (3) simultánní PCR amplifikaci cílové cDNA a detekci rozštěpené, dvojité značené oligonukleotidové detekční sondy specifické pro cíl.

Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV umožňuje automatizovanou přípravu vzorku následovanou automatizovanou reverzní transkripcí, PCR amplifikací a detekcí cílové HCV RNA a kvantifikačního standardu (QS) HCV Armored RNA. Činidlo Master Mix obsahuje primery a sondy specifické pro HCV RNA a HCV QS Armored RNA. Master Mix byl vyvinut pro zajištění ekvivalentní kvantifikace HCV genotypů 1 až 6. Detekce amplifikované DNA je prováděna pomocí cílově specifické a QS specifické, dvojitě značené oligonukleotidové sondy, která umožňuje nezávislou identifikaci ampliconu HCV a HCV QS.

Stanovení množství virové HCV RNA se provádí pomocí kvantifikačního standardu HCV. Ten kompenzuje účinky inhibitorů a kontroluje přípravné a amplifikační procesy, čímž umožňuje přesnější kvantifikaci HCV RNA v každém vzorku. HCV QS je neinfekční Armored RNA konstrukce, která obsahuje HCV sekvence s identickými vazebnými místy pro primer jako cílovou HCV RNA a unikátní vazebnou oblast pro sondu, která umožňuje odlišení HCV QS ampliconu od HCV cílového ampliconu.

HCV QS se přidává do každého vzorku o známém počtu kopií a prochází následujícími kroky přípravy vzorku, reverzní transkripce, PCR amplifikace a detekce štěpených, dvojitě značených oligonukleotidových detekčních sond. Analyzátor COBAS® TaqMan® nebo COBAS® TaqMan® 48 vypočítává koncentraci HCV RNA v testovaném vzorku srovnáním signálu HCV se signálem HCV QS u každého vzorku a kontroly.

Volba cílové sekvence

Volba cílové sekvence RNA pro HCV závisí na identifikaci takových oblastí v genomu HCV, kde se mezi jednotlivými genotypy HCV sekvence v maximální míře zachovává^{10,11}. Generická příprava vzorku založená na křemíku je používána pro zachycení HCV RNA a HCVQS RNA a definované oligonukleotidy jsou použity jako primery při amplifikaci HCV RNA a HCVQS RNA. Cílově specifická a QSspecifická, dvojitě značená oligonukleotidová sonda umožňuje nezávislou identifikaci ampliconu HCV a HCV QS. Proto je patřičný výběr primerů a dvojitě značené oligonukleotidové sondy kritický pro schopnost testu amplifikovat a detekovat HCV genotypy. Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV používá reverzní transkripci a primery PCR amplifikace, které definují sekvence ve vysoce konzervované oblasti 5'-nepřeložené oblasti HCV genomu¹². Nukleotidové sekvence primerů byly optimalizovány pro umožnění srovnatelné amplifikace genotypů HCV.

Příprava vzorku

Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV využívá automatizovanou přípravu vzorku na zařízení COBAS® AmpliPrep pomocí generické vycytávací technologie založené na křemíku. Procedura zpracovává 850 µl plazmy nebo séra. HCV virové částice jsou rozloženy inkubací při zvýšené teplotě s proteázou a chaotropním lytickým/vazebným puřem, který uvolňuje nukleové kyseliny a chrání uvolněnou HCV RNA před působením RNáz v séru nebo plazmě. Proteáza a známý počet molekul HCV QS RNA jsou přidány do každého vzorku spolu s lytickým činidlem a magnetickými skleněnými částicemi. Následně je směs inkubována a HCV RNA a HCV QS RNA jsou navázány na povrch magnetických skleněných částic. Nenavázané substance, jako soli, bílkoviny a ostatní buněčné nečistoty, jsou odstraněny propláchnutím magnetických skleněných částic. Po separaci kuliček a dokončení oplachování jsou absorbované nukleové kyseliny eluovány při zvýšené teplotě pomocí vodného roztoku. Zpracovaný vzorek obsahující magnetické skleněné částice a uvolněnou HCV RNA a HCV QS RNA, je přidán do amplifikační směsi a přemístěn do analyzátoru COBAS® TaqMan® nebo COBAS® TaqMan® 48. Cílové HCV RNA a HCV QS RNA jsou pak reverzně transkribovány, amplifikovány a simultánně detekovány štěpením cílově specifické a QS specifické, dvojitě značené oligonukleotidové sondy.

Reverzní transkripce a PCR amplifikace

Reverzní transkripce a amplifikační PCR reakce je prováděna pomocí termostabilního rekombinantního enzymu DNA polymerázy (Z05) *Thermus specie*. Za přítomnosti dvojmocného manganu (Mn^{2+}) a za příznivých puřovacích podmínek vykazuje Z05 aktivitu jak reverzní transkriptázy, tak DNA polymerázy^{13,14}. To umožňuje reverzní transkripci a PCR amplifikaci spolu s detekcí ampliconu v reálném čase.

Zpracované vzorky se přidávají do amplifikační směsi v amplifikačních zkumavkách (K-zkumavkách), kde probíhá jak reverzní transkripce, tak PCR amplifikace. Reakční směs se zahřívá, aby se downstream primer napojil specificky na cílovou HCV RNA a na kvantifikační standard HCVQS RNA. V přítomnosti Mn^{2+} a nadbytku deoxynukleotid-trifosfátů (dNTPs), mezi něž patří deoxyadenozin-, deoxyguanozin-, deoxycytidin- a deoxyuridin- triphosfáty, polymerizuje Z05 polymeráza hybridizované primery za vzniku vlákna DNA komplementárního k cílové RNA.

Cílová amplifikace

Po reverzní transkripci cílové HCV RNA a HCVQSRNA zahřeje termocyklyer v analyzátoru COBAS® TaqMan® nebo COBAS® TaqMan® 48 reakční směs tak, aby došlo k denaturaci hybridu RNA:cDNA a expozici specifických primerových cílových sekvencí. Při chladnutí směsi se primery připojí k cílové DNA. Termostabilní Z05 DNA polymeráza *Thermus specie* v přítomnosti Mn^{2+} a nadbytku deoxynukleotid-trifosfátů (dNTPs), tj. deoxyadenozin-, deoxyguanozin-, deoxycytidin- a deoxyuridin- (místo thymidinu) trifosfátu, polymerizuje primery po hybridizaci podél cílového templátu a vytváří molekulu dvouvláknové DNA nazývanou amplikon. Analyzátor COBAS® TaqMan® nebo COBAS® TaqMan® 48 opakuje automaticky tento proces po určený počet cyklů, kdy při každém cyklu dojde ke zdvojení množství amplikonové DNA. Požadovaný počet cyklů je předem naprogramovaný v analyzátoru COBAS® TaqMan® nebo COBAS® TaqMan® 48. Amplifikace probíhá pouze v oblasti genomu HCV mezi primery, celý genom amplifikován není.

Selektivní amplifikace

Selektivní amplifikace cílové nukleové kyseliny z klinického vzorku se dosahuje v testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV použitím enzymu AmpErase (uracil-N-glykosylázy) a deoxyuridin-trifosfátu (dUTP). Enzym AmpErase rozpozná a katalyzuje rozklad řetězců DNA obsahujících deoxyuridin¹⁵, ale nikoli DNA obsahující deoxythymidin. Deoxyuridin se v přirozené DNA nevyskytuje, je však vždy přítomen v amplikonu díky použití deoxyuridin-trifosfátu jako jednoho z dNTPs v činidle Master Mix, takže deoxyuridin obsahuje pouze amplikon. V důsledku přítomnosti deoxyuridinu je kontaminovaný amplikon citlivý vůči destrukci enzymem AmpErase před amplifikací cílové DNA. Jakýkoliv nespecifický produkt vytvořený po iniciální aktivaci Master Mix manganem je zničen enzymem AmpErase. Enzym AmpErase, který je obsažen v činidle Master Mix, katalyzuje rozštěpení DNA obsahující deoxyuridin v místě deoxyuridinového zbytku rozevřením deoxyribozového řetězce v pozici C1. Když je řetězec amplikonové DNA v prvním tepelně cyklizačním kroku zahříván, štěpí se v poloze deoxyuridinu, čímž se DNA stává neamplifikovatelnou. Enzym AmpErase zůstává neaktivní po delší dobu, jakmile je vystaven teplotám nad 55°C, tzn. v průběhu tepelně cyklizačního kroku, a proto nerozkládá cílový amplikon vzniklý po PCR reakci.

Detekce produktů PCR v testu COBAS® TaqMan®

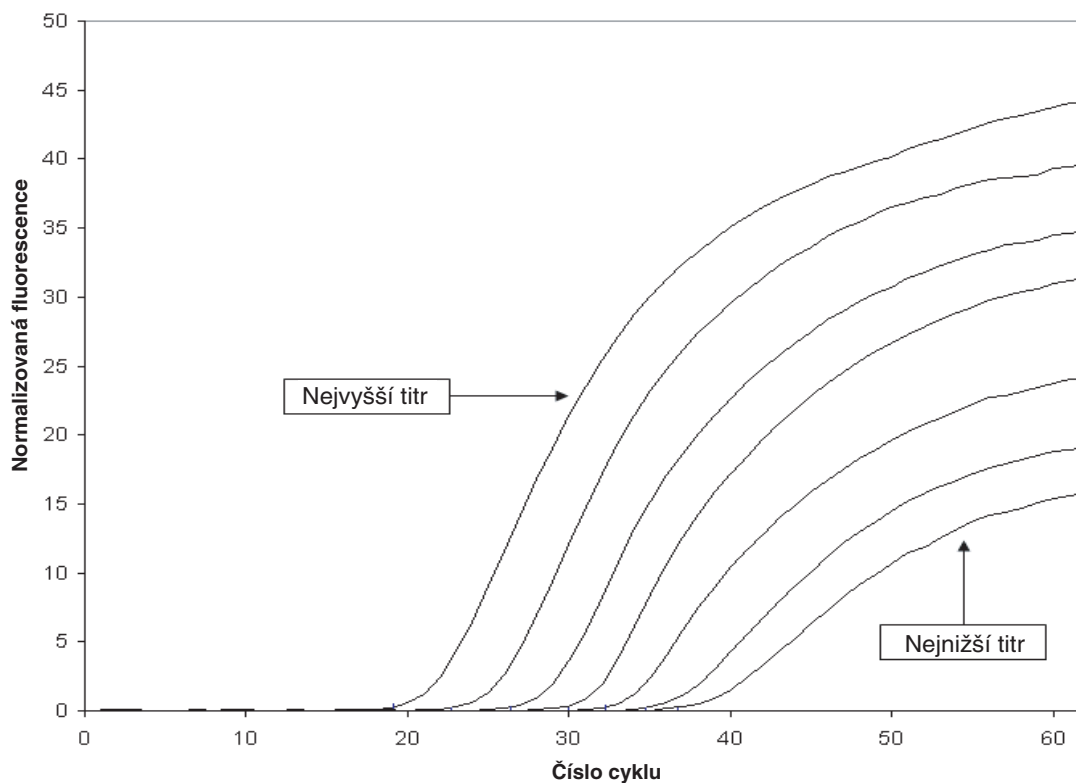
Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV využívá^{16,17} PCR technologii běžící v reálném čase. Použití dvojité značených fluorescenčních sond umožňuje detekci akumulace PCR produktů v reálném čase monitorováním intenzity emise fluorescenčního barviva uvolněného během amplifikačního procesu. SONDY se skládají z HCV a HCV QS-specifických oligonukleotidových sond s oznamovacím a tlumícím barvivem. V testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV jsou HCV a HCV QS sondy značeny různými fluorescenčními oznamovacími barvivy. Jsou-li tyto sondy intaktní, je fluorescence oznamovacího barviva potlačena blízkostí tlumícího barviva kvůli přenosovému vlivu energie Försterova typu. Při PCR hybridizuje sonda s cílovou sekvencí a je rozštěpena 5' → 3' nukleázovou aktivitou termostabilní Z05 DNA polymerázy. Jakmile je oznamovací a tlumící barvivo uvolněno a odděleno, tak nedochází nadále k útlumu a fluorescenční aktivita oznamovacího barviva se zvyšuje. Amplifikace HCV RNA a HCV QS RNA je měřena nezávisle při různých vlnových délkách. Tento proces je opakován po předem určený počet cyklů, přičemž každý cyklus efektivně zvyšuje emisní intenzitu jednotlivého oznamovacího barviva a umožňuje nezávislou identifikaci HCV RNA a HCV QS RNA. PCR cyklus, při němž růstová křivka začíná exponenciální růst, souvisí s množstvím počátečního materiálu na začátku PCR reakce.

Základy kvantifikace v testu COBAS® TaqMan®

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

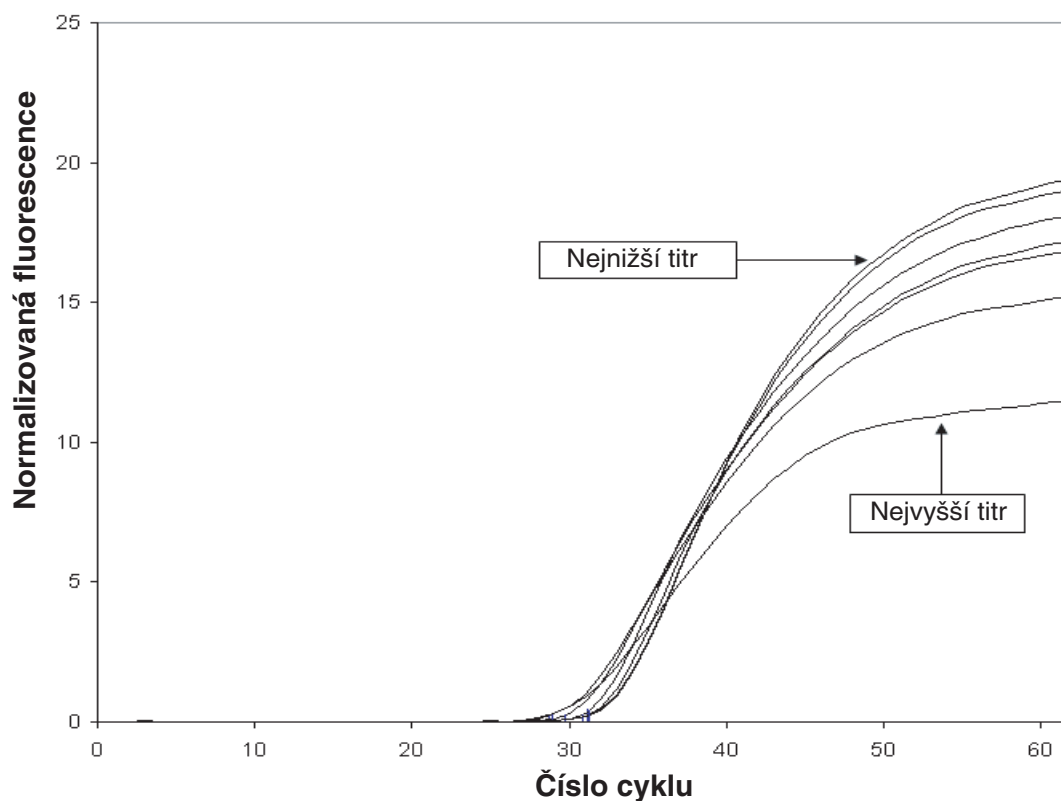
Obrázek 1 ukazuje cílové růstové křivky pro série ředění v rozsahu 5- \log_{10} . Jakmile koncentrace viru narůstá, tak se růstové křivky posouvají do dřívějších cyklů. Proto růstová křivka nejvíce vlevo odpovídá nejvyššímu titru viru, zatímco růstová křivka nejvíce vpravo odpovídá nejnižšímu titru viru.

Obrázek 1



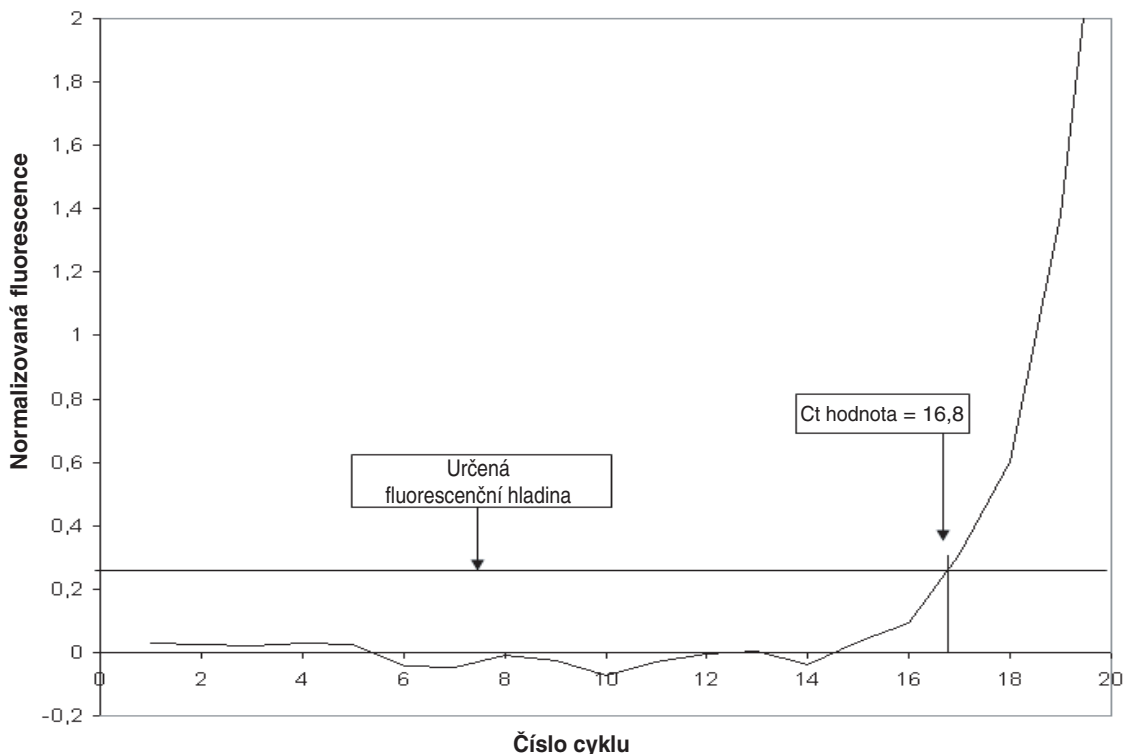
Obrázek 2 ukazuje růstové křivky kvantifikačního standardu pro vzorek z sérií ředění viru zajímavý rozsah 5-log_{10} . Množství kvantifikačního standardu přidaného do každého vzorku je konstantní pro každou reakci. Ct hodnota kvantifikačního standardu je podobná bez ohledu na titr viru.

Obrázek 2



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

Obrázek 3



Kvantifikace HCV RNA

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

Při hybridizační fázi PCR reakce v analyzátoru COBAS® TaqMan® nebo COBAS® TaqMan® 48 jsou vzorky osvětleny a excitovány filtrovaným světlem a filtrovaná emisní fluorescenční data jsou shromažďována pro každý vzorek. Odečty pro každý vzorek jsou pak korigovány na fluktuace zařízení. Tyto odečty fluorescence jsou odeslány zařízením do softwaru AMPLILINK a uloženy v databázi. Pre-Checks (kontroly) se používají pro stanovení, zda-li HCV RNA a HCV QS RNA data reprezentují sady, které jsou platné a indikátorové záložky jsou generovány v případě, že data leží mimo nastavené limity. Po dokončení a splnění všech kontrol jsou odečty fluorescence zpracovány pro generování Ct hodnot pro HCV RNA a HCV QS RNA. Kalibrační konstanty specifické pro sérii poskytované spolu s testem COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV jsou používány pro kalkulaci hodnoty titru pro vzorky a kontroly založené na Ct hodnotách HCV RNA a HCV QS RNA. Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV je standardizován vzhledem k Prvnímu mezinárodnímu standardu WHO pro testování technologie analýzy nukleových kyselin ("WHO International Standard for Hepatitis C Virus RNA for Nucleic Acid Technology (NAT) Assays Testing (NIBSC kód 96/790)¹⁸") a hodnoty titru jsou udávány v mezinárodních jednotkách (IU/ml).

ČINIDLA

COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Test

HCMCAP

48 testů

(P/N: 03568547 190)


HCV CS1

1 x 48 testů


(HCV Kazeta s činidly pro magnetické skleněné částice)

Magnetické skleněné částice



93% Isopropanol

Xi  93% hm. Isopropanol

Dráždivý

F  93% hm. Isopropanol

Vysoce hořlavý


HCV CS2 (HCV kazeta s lytickým čínidlem)	1 x 48 testů
Dihydrát citrátu sodného 42,5% Guanidinthiokyanát < 14% Polydokanol 0,9% Dithiothreitol	
Xn  42,5% hm. guanidinthiokyanát	
Zdraví škodlivý	
HCV CS3 HCV Multičínidlová kazeta obsahuje:	1 x 48 testů
Pase (Roztok proteinázy)	1 x 3,8 ml
Tris pufr < 0,05% EDTA Chlorid vápenatý Acetát vápenatý ≤ 7,8% Proteináza Glycerol	
Xn  ≤ 7,8% hm. proteináza	
Zdraví škodlivý	
EB (Eluční pufr)	1 x 7,0 ml
Třibázový pufr 0,2% Methylparaben	
HCV CS4 HCV Kazeta na čínidla specifická pro test obsahuje:	1 x 48 testů
HCV QS (HCV kvantifikační standard)	1 x 3,6 ml
Tris pufr EDTA < 0,002% Poly rA RNA (syntetická) < 0,001% Armored HCV RNA konstrukce obsahující HCV vazebné sekvence primeru a unikátní vazebnou oblast sondy (neinfekční RNA v bakteriofágu MS2) 0,05% azid sodný	
HCV MMX (HCV Master Mix)	1 x 2,5 ml
Tricin pufr Acetát draselný Hydroxid draselný < 20% Dimethylsulfoxid Glycerol < 0,004% dATP, dCTP, dGTP, dUTP < 0,002% Upstream a downstream HCV primery pro 5' UTR oblast HCV < 0,001% Fluorescenčně značené oligonukleotidové sondy specifické pro HCV a HCV kvantifikační standard < 0,001% Oligonukleotidový aptamer < 0,05% Z05 DNA Polymeráza (mikrobiální) < 0,1% enzym AmpErase (uracil-N-glykosyláza) (mikrobiální) 0,09% azid sodný	
CAP/CTM Mn²⁺ (CAP/CTM roztok manganu)	1 x 19,8 ml
< 0,5% Acetát manganatý Ledová kyselina octová 0,09% azid sodný	

HCV H(+)C****

4 x 1,0 ml

(HCV Vysoce pozitivní kontrola)

- < 0,001% Armored HCV RNA konstrukce obsahující HCV sekvenční (neinfekční RNA v bakteriofágu MS2)
- Negativní lidská plazma, nereagující podle testů na protilátky proti HCV, protilátky proti HIV-1/2, HIV p24 antigen a HBsAg; HIV-1 RNA, HCV RNA a HBV DNA nedetekovatelné metodami PCR
- 0,1% konzervační činidlo ProClin® 300

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

Dráždivý

R36/38: Dráždí oči a kůži.


R43: Může vyvolat senzibilizaci při styku s kůží.

HCV L(+)C****

4 x 1,0 ml

(HCV Nízce pozitivní kontrola)

- < 0,001% Armored HCV RNA konstrukce obsahující HCV sekvenční (neinfekční RNA v bakteriofágu MS2)
- Negativní lidská plazma, nereagující podle testů na protilátky proti HCV, protilátky proti HIV-1/2, HIV p24 antigen a HBsAg; HIV-1 RNA, HCV RNA a HBV DNA nedetekovatelné metodami PCR
- 0,1% konzervační činidlo ProClin® 300

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

Dráždivý

R36/38: Dráždí oči a kůži.


R43: Může vyvolat senzibilizaci při styku s kůží.

CTM (-) C

4 x 1,0 ml

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

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

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

Dráždivý

R36/38: Dráždí oči a kůži.

R43: Může vyvolat senzibilizaci při styku s kůží.

HCV H(+)C** Clip**

1 x 4 klipy

(HCV Klipy s čárovým kódem pro vysoce pozitivní kontrolu)

HCV L(+)C** Clip**

1 x 4 klipy

(HCV Klipy s čárovým kódem pro nízce pozitivní kontrolu)

HCV (-) C Clip

1 x 4 klipy

(HCV Klipy s čárovým kódem pro negativní kontrolu)

COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® Wash Reagent
Mycí činidlo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®
(P/N: 03587797 190)

PG WR

PG WR

1 x 5,1 l

(Mycí činidlo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®)

- Dihydrát citrátu sodného
- < 0,1% N-Methylisothiazolon-HCl

UPOZORNĚNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

A. PRO *IN VITRO* DIAGNOSTICKÉ POUŽITÍ.

- B. Test se používá s lidským sérem nebo plazmou odebranou do EDTA antikoagulačního činidla.
- C. Nepipetovat ústy.
- D. V pracovních laboratorních prostorách nejíst, nepít a nekouřit. Při manipulaci se vzorky a činidly ze soupravy noste ochranné rukavice na jedno použití, laboratorní plášť a prostředek ochrany očí. Po práci se vzorky a zkušebními činidly si důkladně umyjte ruce.
- E. Při odebírání alikvotních podílů z kontrolních lahvíček dbejte na to, aby nedošlo k mikrobiální nebo ribonukleázové kontaminaci.
- F. Doporučuje se používat sterilní pipety na jedno použití a hroty na pipety prosté RNázy.
- G. Nesměšujte dohromady kontroly z různých šarží, ani z různých lahvíček téže šarže.
- H. Nesmíchávejte kazety na činidla ani kontroly z různých souprav.
- I. Neotevírejte kazety COBAS® AmpliPrep ani nevyměňujte, nemíchejte, neodstraňujte ani nepřidávejte láhve.
- J. Nespotřebovaná činidla, odpad a vzorky likvidujte v souladu s celostátními a místními předpisy.
- K. Po vypršení lhůty použitelnosti již soupravu nepoužívejte.
- L. Pravidla bezpečnosti při práci (MSDS) zašle na vyžádání vaše místní pobočka společnosti Roche.
- M. Manipulace se vzorky a kontrolami se musí řídit pravidly pro zacházení s infekčním materiálem. Musí být používány bezpečné laboratorní postupy, např. postupy uvedené v publikaci *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*¹⁹ a v dokumentu CLSI č. M29-A3²⁰. Všechny plochy důkladně očistěte a vydezinfikujte čerstvě připraveným 0,5% roztokem chlornanu sodného v deionizované nebo destilované vodě.

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

- N. **POZOR: CTM (-) C, HCV L(+)**C** a HCV H(+)**C**** obsahují lidskou plazmu pocházející z lidské krve. Zdrojový materiál byl testován a byl shledán nereaktivním na přítomnost povrchového antigenu hepatitidy B (HBsAg), protilátek proti HIV-1/2 a HCV a HIV p24 antigenu. Testování negativní lidské plazmy metodami PCR neprokázalo žádnou detekovatelnou HIV-1 RNA, HCV RNA, ani HBV DNA. Nicméně žádná známá testovací metoda nepředstavuje dokonalou záruku, že se s deriváty z lidské krve nepřenese nějaká infekční agens. Proto je třeba považovat všechny materiál lidského původu za potenciálně infekční. S **CTM (-) C, HCV L(+)**C** a HCV H(+)**C**** je třeba zacházet jako s infekčním materiálem a při práci s nimi je nutno uplatňovat bezpečné laboratorní postupy, například ty, které jsou uvedeny v publikaci *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*¹⁹ nebo v dokumentu CLSI M29-A3²⁰. Všechny pracovní plochy důkladně očistěte a dezinfikujte čerstvě připraveným 0,5% roztokem chlornanu sodného v deionizované nebo destilované vodě.
- O. **HCV QS, CAP/CTM Mn²⁺ a HCV MMX** obsahuje azid sodný. Ten může reagovat s olovenými nebo měděnými armaturami a vytvářet vysoce explozivní kovové azidy. Při likvidaci roztoků obsahujících azid sodný nakloňte laboratorní umyvadla a propláchněte odtok velkým množstvím vody, abyste tak zabránili nárůstu množství azidu.
- P. Při práci s jakýmkoli činidly používejte rukavice na jedno použití, pracovní oděv a ochranné brýle. Dbejte na to, aby se tyto materiály nedostaly do styku s pokožkou, očima nebo sliznicemi. Pokud ke styku dojde, okamžitě postiženou oblast omyjte velkým množstvím vody. Pokud byste tuto péči zanedbali, mohly by se na postiženém místě vyvinout popáleniny. Jestliže se některé činidlo rozlije nebo rozsype, tak ho před vytřením dosucha zředte vodou.
- Q. Dbejte na to, aby **HCV CS2** a tekutý odpad ze zařízení COBAS® AmpliPrep, který obsahuje guanidin thiokyanát, nepřišel do styku s roztokem chlornanu sodného (bělidlo). Ze směsi by se mohl uvolňovat vysoce toxický plyn.
- R. Při likvidaci jednotek pro zpracování vzorku (SPU) ze zařízení COBAS® AmpliPrep, které obsahují guanidinthiokyanát, zabraňte jakémukoli kontaktu s roztokem chlornanu sodného (bělidlo). Ze směsi by se mohl uvolňovat vysoce toxický plyn.

POŽADAVKY NA MANIPULACI A SKLADOVÁNÍ

- A. **Činidla ani kontroly nezmrazujte.**
- B. Skladujte **HCV CS1, HCV CS2, HCV CS3** a **HCV CS4** při teplotě 2-8°C. Pokud jsou tato činidla nepoužitá, tak jsou stabilní až do vypršení doby použitelnosti, jež je na nich uvedena. Po použití jsou při teplotě 2-8°C stálá ještě 28 dní nebo do data expirace, je-li tato doba kratší. **HCV CS1, HCV CS2, HCV CS3** a **HCV CS4** je možné použít maximálně ve 4 cyklech zařízení až do maximální kumulativní doby 64 hodin v zařízení COBAS® AmpliPrep. Činidla musí být skladována při teplotě 2-8°C mezi jednotlivými cykly zařízení.
- C. Skladujte **HCV H(+)**C**, HCV L(+)**C**** a **CTM (-) **C**** při teplotě 2-8°C. Kontroly jsou stálé do vyznačeného data expirace. Po otevření je třeba nespoteřovanou část zlikvidovat.
- D. Skladujte klipy s čárovým kódem [**HCV H(+)**C** Clip, HCV L(+)**C** Clip** a **HCV (-) **C** Clip**] při teplotě 2-30°C.
- E. Skladujte **PG WR** při teplotách 2-30°C. **PG WR** je stálý až do vypršení vyznačené doby expirace. Po otevření se uchovává při teplotě 2-30°C a za těchto okolností je stálé 28 dní (resp. do data expirace, je-li tato doba kratší).

DODÁVANÝ MATERIÁL

- A. **COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Test**
(P/N: 03568547 190)

HCMCAP

HCV CS1

(HCV Kazeta s činidly pro magnetické skleněné částice)

HCV CS2

(HCV kazeta s lytickým činidlem)

HCV CS3

(HCV Multičinidlová kazeta)

HCV CS4

(HCV Kazeta na činidla specifická pro test)

HCV H(+)C****

(HCV Vysocepozitivní kontrola)

HCV L(+)C****

(HCV Nízce pozitivní kontrola)

CTM (-) **C**

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

HCV H(+)C** Clip**

(HCV Klipy s čárovým kódem pro vysoce pozitivní kontrolu)

HCV L(+)C** Clip**

(HCV Klipy s čárovým kódem pro nízce pozitivní kontrolu)

HCV (-) **C Clip**

(HCV Klipy s čárovým kódem pro negativní kontrolu)

- B. **COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® Wash Reagent**
Mycí činidlo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®
(P/N: 03587797 190)

PG WR

PG WR

(Mycí činidlo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®)

POTŘEBNÝ MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ DODÁVKY

Instrumentarium a software

- Zařízení COBAS® AmpliPrep
- Analyzátor COBAS® TaqMan® nebo COBAS® TaqMan® 48
- Volitelné: Docking Station
- Volitelné: Zařízení **cobas p 630**
- Software AMPLILINK, verze 3.2 nebo 3.3
- Datová stanice pro software AMPLILINK s tiskárnou

Pokud je datová stanice pro software AMPLILINK nainstalována se softwarem AMPLILINK verze 3.2 nebo 3.3, použijte následující příručky:

- Příručka pro zařízení COBAS® AmpliPrep pro použití s analyzátozem COBAS® TaqMan®, analyzátozem COBAS® TaqMan® 48, analyzátozem COBAS® AMPLICOR® nebo zařízením **cobas p 630** a se softwarem AMPLILINK, verze 3.2 a 3.3
- Příručka k analyzátozu COBAS® TaqMan® (plus k volitelné dokovací stanici) pro použití s aplikační příručkou softwaru AMPLILINK, verze 3.2 a 3.3
- Příručka pro analyzátoz COBAS® TaqMan® 48 pro použití s aplikační příručkou softwaru AMPLILINK, verze 3.2 a 3.3
- Aplikační příručka pro software AMPLILINK verze 3.2 pro použití se zařízením COBAS® AmpliPrep, analyzátozem COBAS® TaqMan®, COBAS® TaqMan® 48 a analyzátozem COBAS® AMPLICOR®

nebo

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

Spotřební materiál

- Jednotky pro zpracování vzorku: SPU
- Vstupní zkumavky pro vzorek (S-zkumavky) s klipy s čárovým kódem (P/N: 03137040001)
- Stojany s K-hroty (P/N: 03287343001)
- Box s K-zkumavkami v počtu 12 x 96 (P/N: 03137082001)

DALŠÍ POTŘEBNÝ MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ DODÁVKY

- Stojan na vzorky (stojan SK 24) (P/N: 28122172001)
- Stojan na činidla (P/N: 28122199001)
- Stojan SPU (P/N: 28122806001)
- Motorizovaný víčkovač K-zkumavek (P/N: 03516539001)
- Víčkovač K-zkumavek (P/N: 03339874001)
- K-nosič (P/N: 28150397001)
- Přemísťovač K-nosičů (P/N: 03517519001)
- Stojan pro K-nosiče (P/N: 03286436001)
- Pipetory s RNázy-prostými hroty s aerosolovou bariérou nebo s pozitivním posuvem (kapacita 1000 µl)*
- Rukavice na jedno použití bez pudru
- Vířivý mixér

* Pipetory musí být přesné na 3% jmenovitého objemu. Kde je tak uvedeno, musí být použity hroty s aerosolovou bariérou nebo s pozitivním posuvem prosté RNázy, aby se zabránilo vzájemné kontaminaci vzorku a amplikonu.

ODBĚR, PŘEPRAVA A SKLADOVÁNÍ VZORKŮ

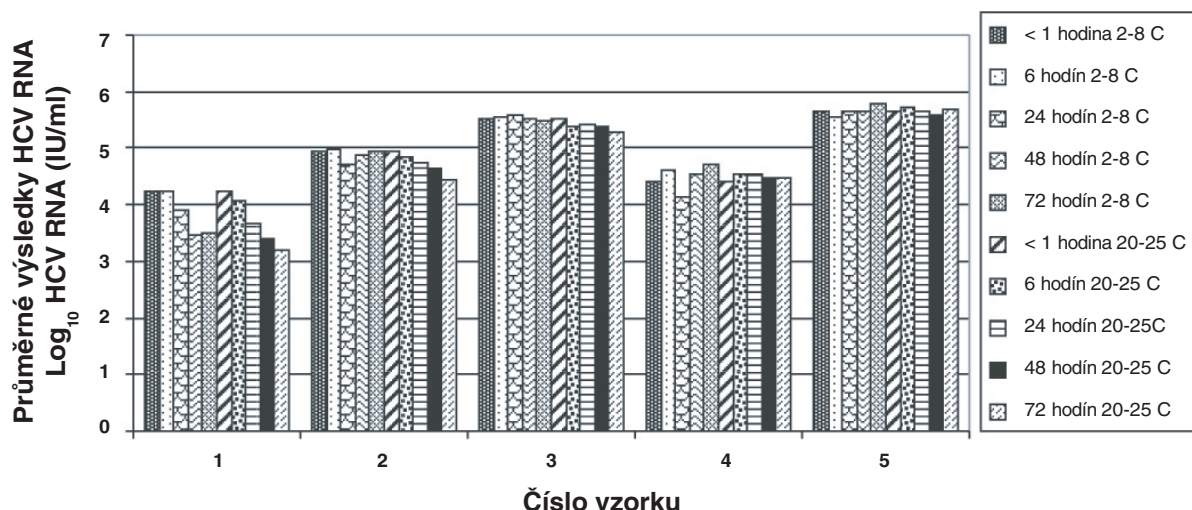
POZN.: Zacházejte se vzorky a kontrolami jako s možnými přenašeči infekce.

A. Odběr vzorků

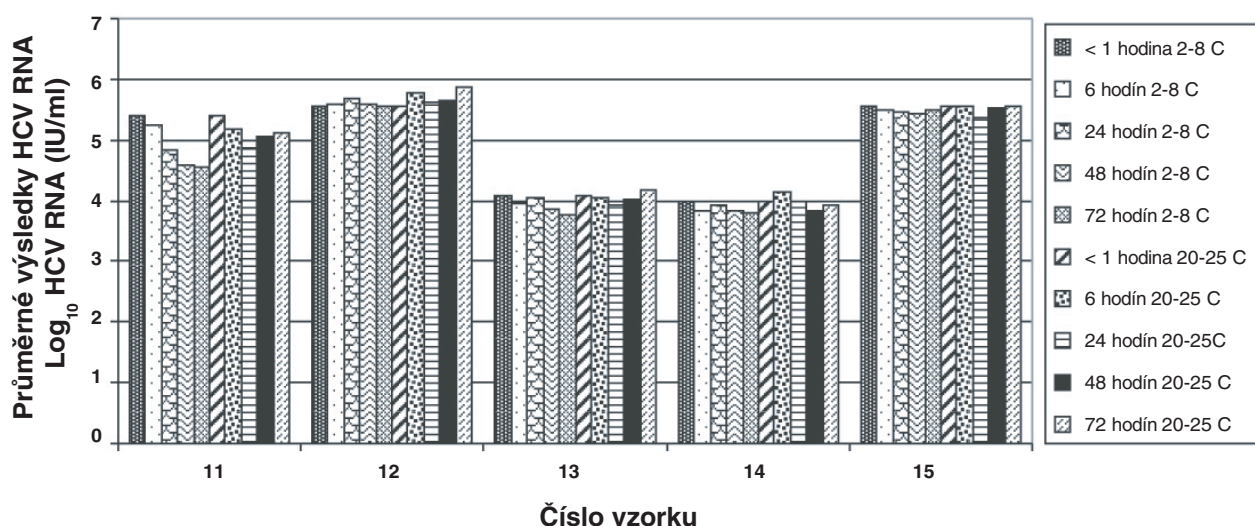
Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV je určen pro použití s vzorky séra nebo plazmy. Krev se odebírá do zkumavek SST® (Serum Separation Tubes) nebo do sterilních zkumavek za použití EDTA (vršek levandulové barvy) jako antikoagulantu.

Plnou 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. Sérum nebo plazmu převedte do sterilní polypropylenové zkumavky. Obrázky 4 a 5 ukazují data stability vzorků ze studií odběru vzorků. Studie byly provedeny za použití testu COBAS® AMPLICOR® HCV MONITOR, verze 2.0 (v2.0).

Obrázek 4
HCV Stabilita v plné krvi (sérum)



Obrázek 5
HCV Stabilita v plné krvi (EDTA plazma)



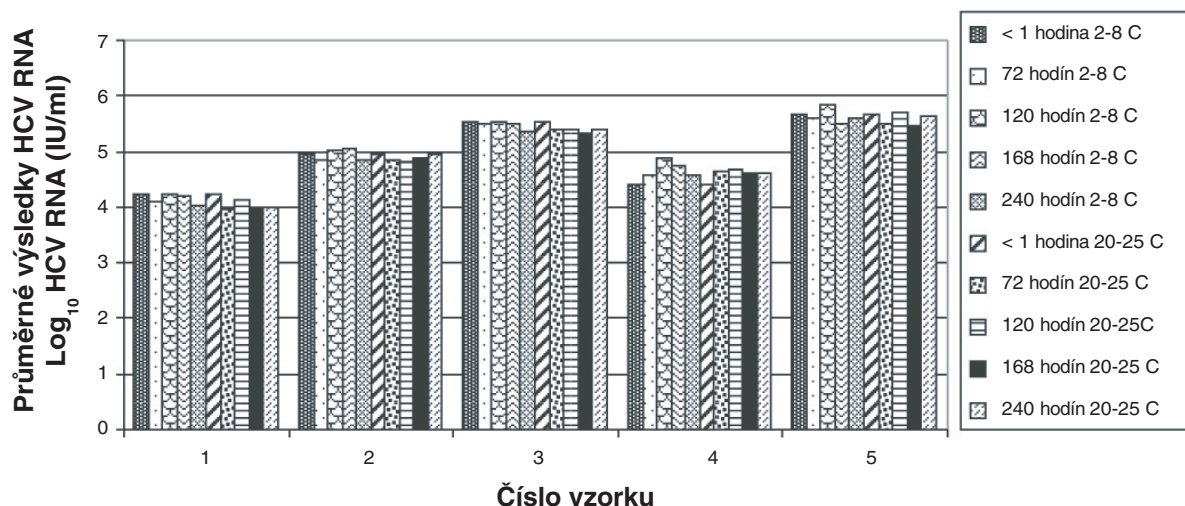
B. Přeprava vzorků

Při přepravě plné krve, séra nebo plazmy je třeba dodržovat celostátní resp. místní předpisy o dopravě etiologických agens²¹. Plná krev se přepravuje za teplot 2–25°C a musí se odstředit do 6 hodin od odběru. Plazma nebo sérum se může přepravovat při teplotě 2-8°C nebo ve zmrazeném stavu při teplotě -70°C nebo nižší.

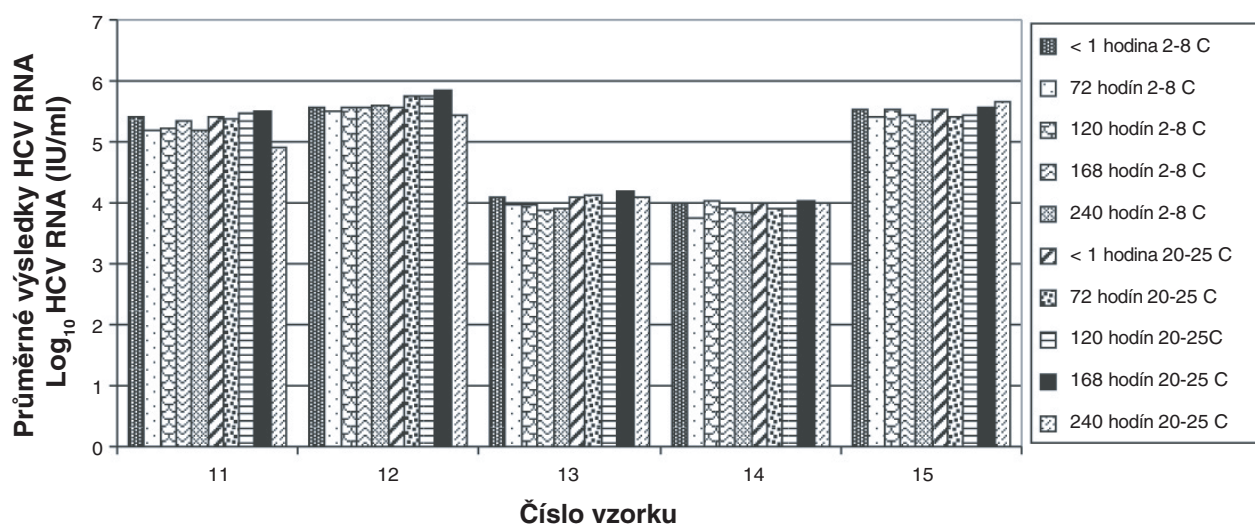
C. Skladování vzorků

Vzorky séra nebo plazmy se mohou uchovávat při teplotě 2–8°C po dobu až 3 dnů nebo ve zmrazeném stavu při teplotě -70°C nebo nižší. Doporučuje se vzorky uchovávat v alikvotních podílech po 1100–1200 µl ve sterilních polypropylenových zkumavkách o objemu 2,0 ml se šroubovacím uzávěrem (například Sarstedt 72.694.006). Obrázky 6 a 7 ukazují data stability vzorků ze studií skladování vzorků. Studie byly provedeny za použití testu COBAS® AMPLICOR® HCV MONITOR, v2.0.

Obrázek 6
HCV stabilita v séru



Obrázek 7
HCV stabilita v EDTA plazmě



Vzorky séra a plazmy mohou být zmraženy a rozmraženy maximálně dvakrát bez ztráty HCV RNA. Tabulka 1 ukazuje data ze studií zmrazování – rozmrazování provedených pomocí testu COBAS® AMPLICOR® HCV MONITOR, v2.0.

Tabulka 1
Log₁₀ Diference v koncentraci HCV z cyklu 0
pro sérum a EDTA plazmu zmrazené a rozmražené pro 5 cyklů

Matrix	Stabilita Vzorek Číslo	Cykly zmrazení / rozmrazení					
		Cyklu 0	Cyklus 1	Cyklus 2	Cyklus 3	Cyklus 4	Cyklus 5
Sérum	1	0,000	-0,052	0,238	0,179	-0,670	-0,277
	2	0,000	0,293	0,228	-0,206	-0,338	0,175
	3	0,000	-0,270	-0,023	-0,430	0,008	-0,229
	4	0,000	0,071	-0,516	-0,295	-0,564	-0,670
	5	0,000	0,342	-0,031	-0,344	-0,436	-0,277
Průměrné sérum		0,000	0,077	-0,021	-0,239	-0,400	-0,246
EDTA plazma	1	0,000	-0,006	0,043	-0,143	-0,159	-0,140
	2	0,000	-0,329	-0,375	-0,234	-0,642	-0,265
	3	0,000	-0,056	-0,248	-0,371	-0,395	-0,142
	4	0,000	0,186	-0,066	-0,034	-0,241	-0,084
	5	0,000	-0,120	-0,111	-0,055	0,250	-0,217
Průměrná EDTA plazma		0,000	-0,065	-0,151	-0,167	-0,237	-0,170

NÁVOD K POUŽITÍ

POZN.: Detailní provozní pokyny, podrobný popis možných konfigurací, tisk výsledků a interpretace příznaků, poznámek a chybových hlášení naleznete v (1) příručce pro zařízení COBAS® AmpliPrep pro použití s analyzátořem COBAS® TaqMan®, analyzátořem COBAS® TaqMan® 48, analyzátořem COBAS® AMPLICOR® nebo zařizním cobas p 630 a se softwarem AMPLILINK, verze 3.2 a 3.3; (2) příručce k analyzátořu COBAS® TaqMan® (plus k volitelné dokovací stanici) pro použití s aplikační příručkou softwaru AMPLILINK, verze 3.2 a 3.3; (3) příručce pro analyzátoř COBAS® TaqMan® 48 pro použití s aplikační příručkou softwaru AMPLILINK, verze 3.2 a 3.3; (4) aplikační příručka softwaru AMPLILINK, verze 3.2 pro použití se zařizním COBAS® AmpliPrep, analyzátořem COBAS® TaqMan®, analyzátořem COBAS® TaqMan® 48 a analyzátořem COBAS® AMPLICOR® nebo v aplikační příručce k softwaru AMPLILINK, verze 3.3 pro použití se zařizním COBAS® AmpliPrep, analyzátořem COBAS® TaqMan®, analyzátořem COBAS® TaqMan® 48, analyzátořem COBAS® AMPLICOR® a zařizním cobas p 630; (5) volitelně: příručka obsluhy cobas p 630, verze softwaru 2.2.

Velkost šarže:

Každý kit obsahuje dostatek činidel pro 48 testů, které mohou být provedeny v dávkách po 12 až 24 testech. Alespoň jedna z každé kontroly [CTM (-) C, HCV L(+)+C a HCV H(+)+C] musí být zahrnuta do každé dávky (viz oddíl "Kontrola kvality").

Pracovní tok:

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

POZN.: NEZMRAZUJTE ani NESKLADUJTE zpracované vzorky a kontroly při teplotě 2-8°C.

Příprava vzorků a kontrol

POZN.: Používáte-li vzorky zmrazené, tak je ponechte při pokojové teplotě, dokud kompletně nerozmraznou a nechte je 3-5 sekund vířit před použitím. Kontroly by měly být odstraněny ze skladování při 2-8°C a vyrovnány na okolní teplotu před použitím.

Nastavení zařízení COBAS® AmpliPrep

Část A. Údržba a plnění

- A1. Zařízení COBAS® AmpliPrep je připraveno k práci v pohotovostním režimu.
- A2. Zapněte datovou stanici pro software AMPLILINK (**ON**). Připravte datovou stanici dle následujícího návodu:
 - a. Přihlaste se k Windows® XP.
 - b. Dvakrát klikněte na ikonu softwaru AMPLILINK.
 - c. Přihlaste se k softwaru AMPLILINK zadáním přiděleného uživatelského jména a hesla.
- A3. Zkontrolujte dodávku **PG WR** použitím obrazovky **Status** a proveďte v případě potřeby výměnu.
- A4. Proveďte veškerou údržbu, jak je uvedeno v záložce **Due**. Zařízení COBAS® AmpliPrep automaticky naplní systém.

Část B. Plnění kazet s činidly

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

- B1. Vložte **HCV CS1** do stojanu na činidla. Vložte **HCV CS2**, **HCV CS3** a **HCV CS4** do odděleného stojanu na činidla.
- B2. Vložte stojan na činidla obsahující **HCV CS1** do pozice stojanu **A** v zařízení COBAS® AmpliPrep.
- B3. Vložte stojan na činidla obsahující **HCV CS2**, **HCV CS3** a **HCV CS4** do polohy stojanu **B**, **C**, **D** nebo **E** v zařízení COBAS® AmpliPrep (pro informace viz tabulka 2).

Část C. Plnění spotřebním materiálem

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

Jsou možné mnohočetné konfigurace použití zařízení COBAS® AmpliPrep s analyzátozem COBAS® TaqMan® nebo COBAS® TaqMan® 48. Pro bližší informace viz tabulka 2 uvedená níže. V závislosti na použité konfiguraci vložte odpovídající počet stojanů s kazetami na činidla, stojanů se vzorky se vstupními S-zkumavkami, stojanů na SPU, stojanů s K-hroty, stojanů s K-zkumavkami a K-nosiči na stojanech pro K-nosiče do odpovídajících pozic pro stojany v zařízení COBAS® AmpliPrep (pro informace viz tabulka 2).

- C1. Uložte jednotky SPU do stojanu(ů) na SPU a zaveďte stojan(y) do pozic **J**, **K** nebo **L** v zařízení COBAS® AmpliPrep.
- C2. V závislosti na použité konfiguraci, zaveďte plný stojan(y) s K-zkumavkami do pozic **M**, **N**, **O** nebo **P** v zařízení COBAS® AmpliPrep.
- C3. Zaveďte plný stojan(y) s K-hroty do pozic **M**, **N**, **O** nebo **P** v zařízení COBAS® AmpliPrep.
- C4. Pro konfigurace 3 až 5 využívající analyzátor COBAS® TaqMan® 48, vložte K-nosiče na stojanu(ech) K-nosičů do pozic stojanu **M**, **N**, **O** nebo **P** v zařízení COBAS® AmpliPrep.

Tabulka 2
Možné konfigurace pro použití zařízení COBAS® AmpliPrep
s COBAS® TaqMan® analyzátořem nebo analyzátořem COBAS® TaqMan® 48

	Konfigurace	Přemístovací režim do analyzátořu COBAS® TaqMan® nebo analyzátořu COBAS® TaqMan® 48	Stojany, nosiče a spotřební materiál	Poloha na zařizení COBAS® AmpliPrep
1.	Zařizení COBAS® AmpliPrep s Docking Station s analyzátořem COBAS® TaqMan®	Automatický přesun K-nosiče	K-zkumavky v plných stojanech K-zkumavek K-hroty v plných stojanech na K-hroty Vstupní S-zkumavky obsahující vzorky a kontroly ve stojanech na vzorky SPU ve stojanech na SPU CS1 ve stojanu na kazety CS2, CS3 a CS4 ve stojanu na kazety	M-P M-P F-H J-L A B-E
2.	Zařizení COBAS® AmpliPrep s analyzátořem COBAS® TaqMan®	Manuální přesun K-zkumavek na stojanu(ech) na vzorky do analyzátořu COBAS® TaqMan®.	K-zkumavky v plných nosičích K-zkumavek K-hroty v plných stojanech na K-hroty Vstupní S-zkumavky ve stojanech na vzorky SPU ve stojanech na SPU CS1 ve stojanu na kazety CS2, CS3, CS4 ve stojanu na kazety <u>Po dokončení zpracování vzorku:</u> K-zkumavky ve stojanech na vzorky (připravené k manuálnímu přesunu)	M-P M-P F-H J-L A B-E Stejně jako výše (F-H)
3. & 4.	Zařizení COBAS® AmpliPrep s 1-2 analyzátořem(y) COBAS® TaqMan® 48	Manuální přesun K-nosiče na stojanu(ech) pro K-nosiče do analyzátořu COBAS® TaqMan® 48.	K-zkumavky ve stojanech na vzorky K-hroty v naplněných stojanech na K-hroty Vstupní S-zkumavky ve stojanech na vzorky SPU ve stojanech na SPU CS1 ve stojanu na kazety CS2, CS3, CS4 v stojanu na kazety Prázdný K-nosič označený čárovým kódem ve stojanu na K-nosiče <u>Po dokončení zpracování vzorku:</u> K-zkumavky v K-nosiči ve stojanu pro K-nosič	F-H M-P F-H J-L A B-E M-P Stejně jako výše (M-P)
5.	Zařizení COBAS® AmpliPrep s analyzátořem COBAS® TaqMan® s analyzátořem COBAS® TaqMan® 48	Manuální přesun K-zkumavek ve stojanu na vzorky do analyzátořu COBAS® TaqMan®. Manuální přesun K-nosiče přes stojan K-nosiče do analyzátořu COBAS® TaqMan® 48.	Stejně jako konfigurace 2 a 3	Stejně jako konfigurace 2 a 3

Část D. Objednávání a ukládání vzorků

- D1. Připravte stojany na vzorky dle následujícího postupu: Připevněte klipy s čárovým kódem ke každé pozici stojanu na vzorky, kam je ukládán vzorek (S-zkumavka). Připevněte jeden ze specifických klipů s čárovým kódem pro kontroly [**CTM (-) C, HCV L(+)**C a **HCV H(+)**C] ke každé pozici stojanu na vzorky, do které budou kontroly (S-zkumavky) uloženy. Klipy s čárovým kódem by měly mít stejné číslo šarže kontroly, jako je číslo šarže na kontrolních lahvičkách v kitu. Dbejte na to, abyste přiřadili správnou kontrolu k pozici s odpovídajícím kontrolním klipem s čárovým kódem. Vložte jednu vstupní S-zkumavku do každé pozice obsahující klip s čárovým kódem.
- D2. Použitím softwaru AMPLILINK vytvořte příkazy pro každý vzorek a kontrolu v okně **Orders** ve složce **Sample**. Zvolte příslušný testový soubor a dokončete ukládání.
- D3. Přiřadte příkazy pro vzorek a kontrolu k pozici stojanu na vzorky v okně **Orders** ve složce **Sample Rack**. Číslo stojanu na vzorky musí být pro stojan připravený v kroku D1.
- D4. Vytiskněte zprávu **Sample Rack Order** pro použití jako pracovní tabulku.
- D5. Připravte stojany na vzorek a kontrolu na určeném místě pro přidávání vzorků a kontrol dle následujícího postupu: Vířením promíchejte každý vzorek a kontrolu [**CTM (-) C, HCV L(+)**C a **HCV H(+)**C] po dobu 3 až 5 sekund. Braňte kontaminaci rukavic při manipulaci se vzorky a kontrolami.
- D6. Přesuňte 1000 až 1050 µl každého vzorku a kontroly [**CTM (-) C, HCV L(+)**C a **HCV H(+)**C] do odpovídající vstupní S-zkumavky s čárovým kódem použitím mikropipetoru s aerosolovou bariérou nebo RNázy prostou špičkou s pozitivním posuvem. **Zabraňte přenosu částicek a/nebo fibrinových sraženin z originálního vzorku do vstupní S-zkumavky.** Vzorky a kontroly by měly být přemístovány do pozic na zkumavky, jak bylo určeno a zaznamenáno v pracovní tabulce v kroku D4. Klipy s čárovým kódem by měly mít stejné číslo šarže kontroly, jako je číslo šarže na kontrolních lahvičkách v kitu. Přiřadte správnou kontrolu k pozici s odpovídajícím kontrolním klipem s čárovým kódem. **Zabraňte kontaminaci horní části S-zkumavky vzorkem nebo kontrolami.**
- D7. Jestliže používáte zařízení **cobas p 630** pro přípravu vzorků, přečtěte si příručku obsluhy pro zařízení **cobas p 630**.
- D8. Pro konfigurace 1 a 2 zaveďte stojan(y) na vzorky naplněné vstupními S-zkumavkami do pozic **F, G** nebo **H** v zařízení COBAS® AmpliPrep.
- D9. Pro konfigurace 3 až 5 využívající analyzátor COBAS® TaqMan® 48, vložte stojan(y) na vzorky s vstupními S-zkumavkami a K-zkumavkami (jedna pro každou vstupní S-zkumavku, zavedené v pozici vpravo vedle vstupních S-zkumavek) do pozice pro stojany **F, G** nebo **H** v zařízení COBAS® AmpliPrep.

Část E. Spusťte běh zařízení COBAS® AmpliPrep

- E1. Zapněte zařízení COBAS® AmpliPrep použitím softwaru AMPLILINK.

Část F. Konec běhu zařízení COBAS® AmpliPrep a přesun do analyzátoru COBAS® TaqMan® nebo COBAS® TaqMan® 48 (pouze pro konfigurace 2-5)

- F1. Sledujte záložky nebo chybová hlášení.
- F2. Odstraňte zpracované vzorky a kontroly ze zařízení COBAS® AmpliPrep na stojanech na vzorky (pro analyzátor COBAS® TaqMan® bez Docking station) nebo na stojanech pro K-nosiče (pro analyzátor COBAS® TaqMan® 48), v závislosti na konfiguraci (pro detaily odkazujeme na Část G).
- F3. Odstraňte odpad ze zařízení COBAS® AmpliPrep.

POZN.: Žádné zpracované vzorky a kontroly by neměly být vystaveny světlu po dokončení přípravy vzorku a kontroly.

Amplifikace a detekce

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

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

POZN.: NEZMRAZUJTE ani NESKLADUJTE zpracované vzorky a kontroly při teplotě 2-8°C.

Část G. Plnění zpracovaných vzorků

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

Konfigurace 1: Automatizovaný přesun K-nosiče přes docking station do analyzátoru COBAS® TaqMan®. Manuální zásah není nutný.

Konfigurace 2 a 5: Manuální přesun K-zkumavek ve stojanu(ech) na vzorky do analyzátoru COBAS® TaqMan®.

Konfigurace 3, 4 a 5: Manuální přesun K-nosiče na stojanu(ech) K-nosiče do analyzátoru COBAS® TaqMan® 48. Manuální přesun K-nosičů do analyzátoru COBAS® TaqMan® 48 za použití přemístovače K-nosiče.

Část H. Začátek běhu analyzátoru COBAS® TaqMan® nebo COBAS® TaqMan® 48

H1. Zapněte analyzátor COBAS® TaqMan® nebo COBAS® TaqMan® 48 jednou z možností uvedených níže, v závislosti na použité konfiguraci:

Konfigurace 1: Není nutná žádná intervence.

Konfigurace 2 a 5: Automatický start analyzátoru COBAS® TaqMan® po vložení stojanu(ů) na vzorky.

Konfigurace 3, 4 a 5: Naplňte K-nosič prázdnými K-zkumavkami v případě, že je méně než 6 K-zkumavek v nosiči. Plnění je řízeno pomocí softwaru AMPLILINK. Otevřete kryt termocykleru, zaveďte K-nosič a uzavřete víko. Zapněte běh analyzátoru COBAS® TaqMan® 48.

Část I. Konec běhu analyzátoru COBAS® TaqMan® nebo COBAS® TaqMan® 48

I1. Po dokončení běhu analyzátoru COBAS® TaqMan® nebo COBAS® TaqMan® 48 vytiskněte výsledkový protokol. Sledujte záložky nebo chybová hlášení ve výsledkovém protokolu. Vzorky s indikátory a komentáři jsou interpretovány tak, jak je popsáno v části *Výsledky*. Po odsouhlasení uložte data do archívu.

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

VÝSLEDKY

Analyzátor COBAS® TaqMan® nebo COBAS® TaqMan® 48 automaticky stanovuje koncentrace HCV RNA pro vzorky a kontroly. **Koncentrace HCV RNA je vyjádřena v mezinárodních jednotkách (IU) /ml.**

Software AMPLILINK:

- Stanovuje prahovou hodnotu cyklu (Ct) pro HCV RNA a HCV QS RNA.
- Stanovuje koncentraci HCV RNA založenou na Ct hodnotách pro HCV RNA a HCV QS RNA a kalibračních koeficientech specifických pro danou sérii, které jsou poskytnuty na čárových kóděch kazet.
- Určuje, že vypočtená hodnota IU/ml pro **HCV L(+)**C a **HCV H(+)**C spadá do vymezeného rozmezí.

Validace šarže – AMPLILINK, verze 3.2

Zkontrolujte výsledkové okno softwaru AMPLILINK nebo výsledkový výtisk na přítomnost záložek a komentářů, abyste se ujistili, že je šarže platná.

Pro kontrolní příkazy je provedena kontrola pro stanovení, zda-li je hodnota IU/ml pro kontrolu v rámci specifikovaného rozsahu. Je-li hodnota IU/ml pro kontrolu mimo její rozsah, tak se objeví **INDIKÁTOR**, který ukazuje, že kontrola selhala.

Šarže je platnou v případě, že se neobjeví žádná záložka pro žádnou kontrolu [**HCV L(+)**C, **HCV H(+)**C a **CTM (-) C**].

Šarže není platná, pokud se u HCV kontrol objeví některý z následujících indikátorů.

Negativní kontrola:

Indikátor	Výsledek	Interpretace
__N_NC_INVALID	Invalid	Neplatný výsledek nebo "platný" výsledek, který nebyl negativní pro cílový HCV

HCV Nízce pozitivní kontrola:

Indikátor	Výsledek	Interpretace
__L_LPCINVALID	< 1.50E+01 IU/mL	Kontrola pod rozsahem testu
__L_LPCINVALID	Target Not Detected	Kontrola pod rozsahem testu
__L_LPCINVALID	Numerický titr, X.XXE+XX IU/mL	Kontrola mimo rozsah testu
__L_LPCINVALID	> 6.90E+07 IU/mL	Kontrola nad rozsahem testu
__L_LPCINVALID	Invalid	Neplatný výsledek

HCV Vysoce pozitivní kontrola:

Indikátor	Výsledek	Interpretace
__H_HPCINVALID	< 1.50E+01 IU/mL	Kontrola pod rozsahem testu
__H_HPCINVALID	Target Not Detected	Kontrola pod rozsahem testu
__H_HPCINVALID	Numerický titr, X.XXE+XX IU/mL	Kontrola mimo rozsah testu
__H_HPCINVALID	> 6.90E+07 IU/mL	Kontrola nad rozsahem testu
__H_HPCINVALID	Invalid	Neplatný výsledek

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

Validace šarže – AMPLILINK, verze 3.3

Zkontrolujte výsledkové okno softwaru AMPLILINK nebo výsledkový výtisk na přítomnost příznaků a komentářů, abyste se ujistili, že je šarže platná.

Pro kontrolní objednávky je provedena kontrola, zda-li je hodnota IU/ml pro danou kontrolu v rámci specifikovaného rozmezí. Je-li hodnota IU/ml pro danou kontrolu mimo její rozsah, je vytvořen PŘÍZNAK, který ukazuje, že kontrola selhala.

Šarže je platná v případě, že se neobjeví žádný příznak pro žádnou kontrolu [HCV L(+)**C**, HCV H(+)**C**, CTM (-) **C**].

Šarže není platná, pokud se u HCV kontrol objeví některý z následujících příznaků:

Negativní kontrola:

Indikátor	Výsledek	Interpretace
NC_INVALID	Invalid	Neplatný výsledek nebo "platný" výsledek, který nebyl negativní pro cílový HCV

HCV Nízce pozitivní kontrola:

Indikátor	Výsledek	Interpretace
LPCINVALID	Invalid	Neplatný výsledek nebo kontrola mimo rozsah

HCV Vysoce pozitivní kontrola:

Indikátor	Výsledek	Interpretace
HPCINVALID	Invalid	Neplatný výsledek nebo kontrola mimo rozsah

Pokud je šarže neplatná, je třeba celou šarži, tj. včetně přípravy vzorků a kontrol, reverzní transkripce, amplifikace a detekce, zopakovat.

Interpretace výsledků:

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

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

Výsledky vzorků jsou interpretovány následujícím způsobem:

Výsledek titru	Interpretace
Target Not Detected	Ct hodnota pro HCV je nad hranicí testu nebo nebyla žádná Ct hodnota pro HCV získána. Výsledky nahlaste jako "HCV RNA nedetekována".
< 1.50E+01 IU/mL	Vypočtená hodnota IU/ml je pod detekční hranicí testu. Nahlaste výsledky jako "HCV RNA detekována, méně než 15 HCV RNA IU/ml".
≥ 1.50E+01 IU/mL a < 4.30E+01 IU/mL	Vypočítané výsledky v IU/ml jsou pod dolní hranicí lineárního rozmezí testu. Tyto výsledky mají velký stupeň variability, a proto nemohou být považovány za přesné. Tyto výsledky by měly být interpretovány s opatrností.
≥ 4.30E+01 IU/mL a ≤ 6.90E+07 IU/mL	Vypočítané výsledky větší než nebo rovny 43 IU/ml a menší než nebo rovny 6,90E+07 IU/ml jsou v lineárním rozmezí analýzy.
> 6.90E+07 IU/mL	Vypočtená hodnota IU/ml leží nad rozsahem testu. Nahlaste výsledky jako "vyšší než 6,90E+07 HCV RNA IU/ml". Jsou-li žádané kvantitativní výsledky, měl by být originální vzorek rozředěn HCV-negativním lidským sérem nebo EDTA plazmou v závislosti na matrix originálního vzorku a test zopakován. Vynásobte uvedený výsledek dilučním faktorem.

POZN.: Vzorky nad rozsahem testu, které vykazují neplatný výsledek s příznakem „QS_INVALID“, nesmí být vykázány jako >6.90E+07 IU/mL. Originální vzorek je nutné rozředit lidskou EDTA plazmou negativní na HCV a test by měl být zopakován. Vynásobte uvedený výsledek faktorem ředění.

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

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

POZN.: U některých vzorků kmenů genotypu 4, bylo pozorováno podhodnocení kvantifikace ($o \geq 2 \log_{10}$ IU/ml s většinou neshodou $< 2 \log_{10}$ IU/ml) virové zátěže u pacientů, která je nezávislá na mutacích virového genomu pokrytého primery, případně sondami testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV. Kromě toho musí být výsledky testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV interpretovány v kontextu všech relevantních klinických a laboratorních nálezů.

KONTROLA KVALITY

Jedna COBAS® TaqMan® negativní kontrola, HCV nízké pozitivní kontrola a HCV vysoce pozitivní kontrola musí být zahrnuta do každé testové dávky. Šarže je platnou v případě, že se neobjeví žádný indikátor pro žádnou kontrolu [**HCV L(+)**C, **HCV H(+)**C a **CTM (-)** C].

Není rozhodující, na které pozici ve stojanu na vzorky jsou kontroly umístěny.

Zkontrolujte si, co přístroj vytiskl, a na indikátorech a komentářích si ověřte, že je šarže platná.

Negativní kontrola

CTM (-) C musí dát výsledek "Target Not Detected". Je-li **CTM (-) C** označeno jako neplatné, pak je celá šarže neplatná. Celý postup zopakujte (příprava vzorků a kontrol, amplifikace a detekce). Je-li **CTM (-) C** trvale neplatné v mnoha šaržích, kontaktujte vašeho místního zástupce společnosti Roche pro technickou pomoc.

Pozitivní kontroly

Přiřazený rozsah pro **HCV L(+)**C a **HCV H(+)**C je specifický pro každou šarži činidel a je uveden na čárovém kódu kazety s činidly pro COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Test.

HCV RNA IU/ml pro **HCV L(+)**C a **HCV H(+)**C by měl spadat do daného předepsaného rozsahu. Jsou-li jedna nebo obě pozitivní kontroly označeny záložkou jako neplatné, tak je celá šarže neplatná. Celý postup zopakujte (příprava vzorků a kontrol, amplifikace a detekce). Jestliže leží titr HCV RNA u jedné nebo obou pozitivních kontrol soustavně mimo přiřazené rozmezí u mnoha šarží, obraťte se o technickou pomoc na místní zastoupení firmy Roche.

BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ PŘI PRÁCI

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

PRECEDURÁLNÍ OMEZENÍ

1. Tento test je validován pro používání pouze s lidským sérem nebo plazmou odebranou do EDTA jako antikoagulantu. Testování jiných typů vzorků může vést k nepřesným výsledkům.
2. I když vzácně, mutace ve vysoce konzervovaných oblastech virového genomu pokryté primery testu a/nebo sondou mohou vést v podhodnocení množství nebo selhání detekce viru.
3. Kvantifikace HCV RNA závisí na tom, kolik virových částic je ve vzorku přítomno, na což mají vliv metody odběru vzorku, faktory pacienta (např. věk, symptomy) a/nebo stádium infekce.
4. K získání spolehlivých výsledků je třeba dodržovat patřičné postupy odběru, transportu, skladování a zpracování vzorků.
5. Díky přítomnosti enzymu AmpErase v Master Mixu pro COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV se snižuje riziko kontaminace ampikonu. Kontaminaci od HCV pozitivních kontrol a klinických vzorků lze ovšem zabránit pouze důsledným uplatňováním zásad správné laboratorní praxe a pečlivým dodržováním postupů uvedených v tomto příbalovém letáku.
6. S produktem by měli pracovat pouze pracovníci znalí technik PCR.
7. Tento produkt může být použit pouze spolu s zařízením COBAS® AmpliPrep a analyzátozem COBAS® TaqMan® nebo COBAS® TaqMan® 48.
8. Díky podstatným rozdílům mezi technologiemi se doporučuje, aby uživatelé před změnou technologie na jinou provedli korelační metodické studie ve vlastní laboratoři a kvantifikovali rozdíly mezi technologiemi.

RUŠIVÉ LÁTKY

Při zvýšených hladinách triglyceridů, bilirubinu, albuminu, hemoglobinu a lidské DNA ve vzorcích, a také při přítomnosti autoimunních onemocnění jako je systémový lupus erythematoses (SLE), revmatoidní artritida (RA) a antinukleární protilátky (ANA) bylo zjištěno, že nedochází k interferenci s kvantifikací HCV RNA testem COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV.

Následující sloučeniny léčiv testované při maximální plazmatické hladině (C_{max}) a při trojnásobném C_{max} nevykázaly interferenci s kvantifikací HCV RNA testem COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV:

Inhibitory nukleotidové DNA polymerázy Tenofovir Adefovir dipivoxil	Nukleozidová reverzní transkriptáza a Inhibitory DNA polymerázy Lamivudin Zidovudin Stavudin Abacavir Didanosin
Inhibitory HIV proteázy Indinavir Saquinavir Ritonavir Nelfinavir Amprenavir Lopinavir/Ritonavir	Inhibitory nenukleozidové HIV reverzní transkriptázy Nevirapin Efavirenz
	Inhibitory HIV fúze Enfuvirtid
Imunomodulátory Interferon alfa-2a Interferon alfa-2b Peginterferon alfa-2a Peginterferon alfa-2a + Ribavirin Interferon alfa-2b + Ribavirin	Antidepresiva Paroxetin HCl Fluoxetin Sertralin
	Sloučeniny pro léčbu herpetických virů Gancyklovir Valgancyklovir Acyklovir

VYHODNOCENÍ LABORATORNÍCH VÝSLEDKŮ

A. Mez detekce

Detekční limit testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV byl stanoven analýzou sérií ředění Prvního mezinárodního standardu WHO pro RNA viru hepatitidy C pro technologie amplifikace nukleové kyseliny (NIBSC kód 96/790)¹⁸, genotyp 1a, získaný od NIBSC, u HCV negativní lidské EDTA plazmy nebo séra. Pro každou matrix byly analyzovány tři dilační série. Celkově 26 až 30 replikátů na koncentraci bylo testováno pro každý typ matrix. Studie byla provedena pro jednu šarži činidel testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV.

Výsledky pro EDTA plazmu a sérum jsou vyobrazeny v tabulkách 3 a 4 a ukazují, že test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV detekoval HCV RNA při koncentracích 15 IU/ml nebo vyšších s mírou pozitivivity $\geq 95\%$. Rozdíl mezi sérem a EDTA plazmou nebyl statisticky významný.

Tabulka 3
Detekční limit v EDTA plazmě stanovený
Prvním mezinárodním standardem WHO pro RNA viru hepatitidy C pro analýzy
amplifikační technologie nukleových kyselin (NIBSC kód 96/790)

Vstupní titr (HCV RNA IU/ml)	Počet replikátů	Počet pozitivních	% úspěšnost detekce
50	27	27	100%
25	26	26	100%
15	28	28	100%
10	30	28	93%
7,5	29	23	79%
5	28	20	71%
2,5	27	17	63%
0	26	0	0%
PROBIT 95% úspěšnost detekce	12,6 IU/ml [95% interval spolehlivosti: 9 - 24 IU/ml]		

Tabulka 4
Detekční limit v séru stanovený
Prvním mezinárodním standardem WHO pro RNA viru hepatitidy C pro analýzy
amplifikační technologie nukleových kyselin (NIBSC kód 96/790)

Vstupní titr (HCV RNA IU/ml)	Počet replikátů	Počet pozitivních	% úspěšnost detekce
50	30	30	100%
25	28	28	100%
15	30	30	100%
10	29	28	97%
7,5	30	27	90%
5	29	26	90%
2,5	30	19	63%
0	29	0	0%
PROBIT 95% úspěšnost detekce	8,2 IU/ml [95% interval spolehlivosti: 6 -14 IU/ml]		

B. Přesnost

Přesnost testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV byla stanovena analýzou sérií ředění klinických vzorků HCV (genotyp 1a) nebo Armored HCV RNA v HCV negativní lidské EDTA plazmě nebo séru.

Šest hladin ředění 7 replikátů na hladinu bylo testováno v ≥ 15 běžích analýz v průběhu ≥ 15 dnů. Každý vzorek prošel celou procedurou testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, zahrnující přípravu vzorku, amplifikaci a detekci. Zde uváděná přesnost tedy zahrnuje všechny aspekty testovacího postupu. Studie byla provedena na třech šaržích činidel testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV a výsledky jsou vyobrazeny v tabulce 5 a 6.

Tabulka 5
Přesnost testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV (Vzorky EDTA plazmy)*

Titř (IU/ml)	Šarže 1		Šarže 2		Šarže 3	
	Celkový variační koeficient (%)	Celková směrodatná odchylka v Log	Celkový variační koeficient (%)	Celková směrodatná odchylka v Log	Celkový variační koeficient (%)	Celková směrodatná odchylka v Log
Klinický vzorek						
$\geq 1E+02$	47	0,19	50	0,20	28	0,12
$\geq 1E+03$	29	0,12	31	0,13	16	0,07
$\geq 1E+04$	27	0,12	30	0,13	14	0,06
Armored RNA						
$\geq 1E+05$	21	0,09	35	0,15	17	0,07
$\geq 1E+06$	22	0,09	32	0,14	18	0,08
$\geq 1E+07$	31	0,13	27	0,11	16	0,07

* Titry jsou považovány za log-normálně distribuované a jsou analyzovány po \log_{10} transformaci. Sloupce 2, 4 a 6 představují % CV odvozené ze smíšeného modelu analýzy logaritmičticky transformovaných dat odděleně pro každou nominální hladinu, zpětně transformované do originální stupnice titru. Sloupce 3, 5 a 7 představují celkovou směrodatnou odchylku logaritmičticky transformovaného titru.

Tabulka 6
Přesnost testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV (Vzorky séra)*

Titř (IU/ml)	Šarže 1		Šarže 2		Šarže 3	
	Celkový variační koeficient (%)	Celková směrodatná odchylka v Log	Celkový variační koeficient (%)	Celková směrodatná odchylka v Log	Celkový variační koeficient (%)	Celková směrodatná odchylka v Log
Klinický vzorek						
$\geq 1E+02$	38	0,16	27	0,11	32	0,13
$\geq 1E+03$	21	0,09	17	0,07	14	0,06
$\geq 1E+04$	20	0,08	24	0,10	16	0,07
Armored RNA						
$\geq 1E+05$	32	0,13	20	0,09	16	0,07
$\geq 1E+06$	35	0,15	23	0,10	16	0,07
$\geq 1E+07$	33	0,14	20	0,09	19	0,08

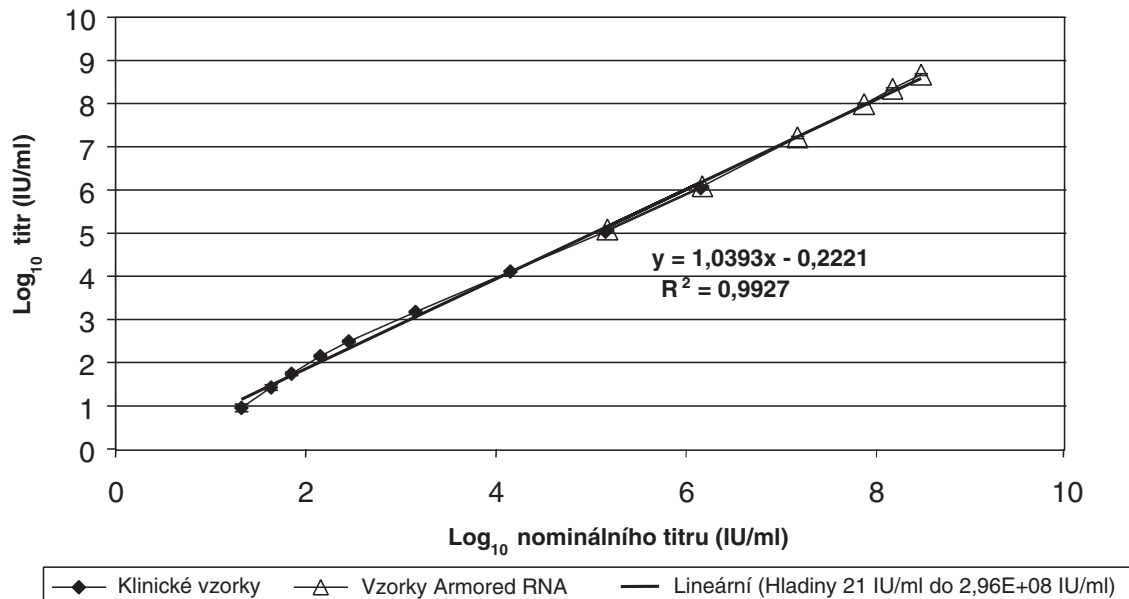
* Titry jsou považovány za log-normálně distribuované a jsou analyzovány po \log_{10} transformaci. Sloupce 2, 4 a 6 představují % CV odvozené ze smíšeného modelu analýzy logaritmičticky transformovaných dat odděleně pro každou nominální hladinu, zpětně transformované do originální stupnice titru. Sloupce 3, 5 a 7 představují celkovou směrodatnou odchylku logaritmičticky transformovaného titru.

C. Lineární rozmezí

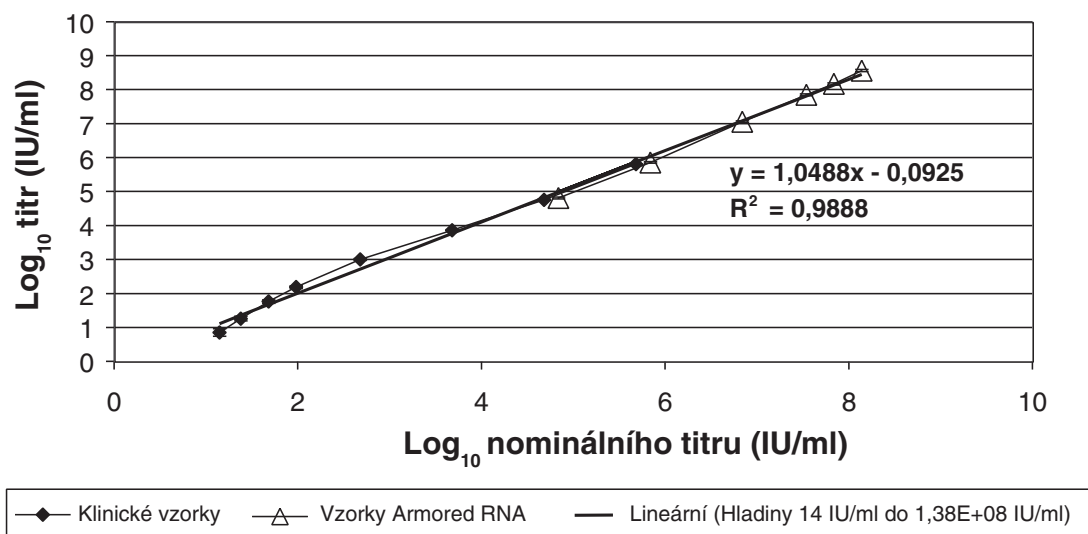
Dva panely linearity byly použity pro hodnocení lineárního rozsahu testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV. Tyto panely se skládaly z ředění v EDTA plazmě nebo séru pozitivních klinických vzorků s vysokým titrem HCV RNA pro dolní a střední část dynamického rozmezí a vzhledem k nedostupnosti klinického materiálu s vysokým titrem za použití Armored HCV RNA pro horní část dynamického rozmezí. Studie byla provedena pro jednu šarži činidel testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV. Všechny 15 členů panelu pro EDTA plazmu a všech 14 členů panelu pro sérum byly testovány u 104 - 111 replikátů na hladinu koncentrace.

Bylo zjištěno, že test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV dává lineární odpověď od 43 HCV RNA IU/ml do minimálně 6,90E+07 HCV RNA IU/ml, za využití akceptačního kritéria přesnosti +/- 0,3 log₁₀.

Obrázek 8
Stanovení lineárního rozsahu pro COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Test ve vzorcích EDTA plazmy



Obrázek 9
Stanovení lineárního rozsahu pro COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Test ve vzorcích séra



D. Inkluzivita

Výkonnost testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV u genotypů HCV byla hodnocena pomocí (i) testování panelu genotypu HCV RNA pro techniky amplifikace nukleové kyseliny, NIBSC kód 02/202, pomocí (ii) srovnání \log_{10} titru klinických vzorků HCV genotypů 1-5 s \log_{10} titru získaným pro test COBAS® AMPLICOR® HCV MONITOR, v2.0, a pomocí (iii) stanovení detekčního limitu u klinických vzorků skládajících se z HCV genotypů 1-6.

Kvantifikace titru genotypu: Panel genotypu HCV RNA pro techniky amplifikace nukleové kyseliny, NIBSC kód 02/202

Panel genotypu HCV RNA pro techniky amplifikace nukleové kyseliny, NIBSC kód 02/202 se skládá z 6 členů HCV genotypu 1 – 6 s titrem 1000 IU/ml přiřazeným pomocí NIBSC²². Panel byl testován jedním stanovením jednou šarží činidel testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV (CAP/CTM HCV). Výsledky jsou uvedeny v tabulce 7.

Tabulka 7
Panel genotypu HCV RNA pro techniky amplifikace nukleové kyseliny, NIBSC kód 02/202

Součást panelu	Genotyp HCV	Log ₁₀ titr přiřazený NIBSC	Log ₁₀ titr CAP/CTM HCV	Δlog ₁₀ titr (CAP/CTM HCV – NIBSC)
NIBSC-1	1	3,0	3,2	0,2
NIBSC-2	2	3,0	3,3*	0,3
NIBSC-3	3	3,0	3,2	0,2
NIBSC-4	4	3,0	3,1	0,1
NIBSC-5	5	3,0	2,9	-0,1
NIBSC-6	6	3,0	3,3	0,3

* průměrná hodnota dvou replikátů

Kvantifikace titru genotypu: Klinické vzorky HCV genotypů 1a, 1b, 2a/c, 2b, 3a, 4 a 5.

Vzorky byly testovány jedním stanovením testem COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV (CAP/CTM HCV), testem COBAS® AMPLICOR® HCV MONITOR, v2.0 (HCM) a analýzou VERSANT® HCV RNA 3.0 (bDNA, Bayer). Odchytky \log_{10} (CAP/CTM HCV – HCM, VERSANT – CAP/CTM HCV a VERSANT – HCM) pro titr každého vzorku byly vypočítány. Pro každé srovnání je průměrná odchylka \log_{10} všech vzorků náležících jednomu genotypu vyobrazena v tabulce 8.

Tabulka 8
Srovnání kvantifikace genotypu: COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Test,
COBAS® AMPLICOR® HCV MONITOR Test, v2.0
a analýza VERSANT HCV RNA 3.0 assay (bDNA, Bayer)

Genotyp HCV	log ₁₀ titr CAP/CTM HCV- log ₁₀ titr HCM		log ₁₀ titr VERSANT - log ₁₀ titr CAP/CTM HCV		log ₁₀ titr VERSANT - log ₁₀ titr HCM	
	Počet vzorků / genotyp	Průměr	Počet vzorků / genotyp	Průměr	Počet vzorků / genotyp	Průměr
1a	18	0,1	18	-0,5	18	-0,5
1b	29	0,2	26	-0,5	26	-0,5
2a/c	14	-0,2	14	-0,2	14	-0,5
2b	13	-0,2	12	-0,4	12	-0,6
3a	25	0,2	24	-0,7	24	-0,5
4	9	-0,5	9	0,5	9	-0,1
5	10	-0,4	10	0,0	10	-0,2

Mez detekce genotypu

Dvě série ředění sedmi klinických vzorků reprezentující genotypy 1b, 2a/c, 2b, 3a, 4, 5a a 6a byly hodnoceny jednou šarží testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV v celkovém počtu 18 až 24 replikátů na koncentrační hladinu a vzorek. Výsledky analýz PROBIT při 95% úspěšnosti detekce jsou vyobrazeny v tabulce 9. Detekční limity pro všechny genotypy byly v rámci dvojnásobku kontrolního genotypu 1a.

Tabulka 9
Inkluzivita genotypu a detekční mez testu
COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV

Genotyp	95 % PROBIT koncentrace v IU/ml
1a*	8,2
1b	10,7
2a/c	6,5
2b	9,0
3a	11,4
4	6,8
5a	15,8
6a	9,6

* pro 95 % PROBIT stanovení koncentrace viz tabulka 4.

E. Specificita

Specificita testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV byla stanovena analýzou HCV RNA-negativní EDTA plazmy nebo séra od krevních dárců. Celkový počet 808 jednotlivých vzorků EDTA plazmy a celkový počet 768 jednotlivých vzorků séra bylo testováno dvěma šaržemi činidel testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV. Všechny vzorky vyšly negativně pro HCV RNA. V tomto panelu je specificita testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV 100% (jednostranný dolní 95% mez spolehlivosti: $\geq 99,6\%$).

F. Analytická specificita

Analytická specificita testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV byla hodnocena přidáním různých patogenů (viry, bakterie, kvasinky) nebo izolované buněčné DNA (HTLV-II) do HCV negativní lidské EDTA plazmy nebo analýzou vzorků od infikovaných pacientů (viz tabulka 10). Žádný z non-HCV patogenů nevykazoval falešně pozitivní výsledek v testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV.

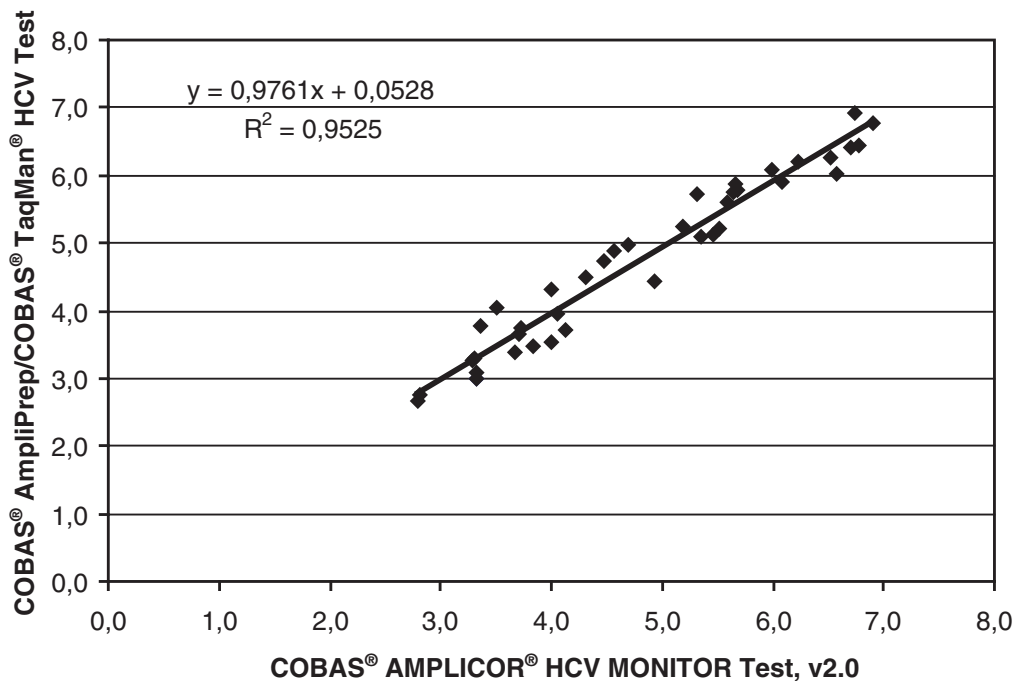
Tabulka 10
Analytická specificita vzorků

<p>Jiné než HCV Flaviviry Západonilský virus Virus encefalitidy St. Louis Virus encefalitidy Murray Valley Virus Dengue typy 1, 2, 3 a 4 Virus žluté horečky Zika virus Banzi virus Ilheus virus FSME virus Virus hepatitis G (GBV-C)</p>
<p>Viry Adenovirus typ 2 Cytomegalovirus Epstein-Barr virus Lidský herpes virus typ 6 Herpes simplex virus typ 1 Herpes simplex virus typ 2 Lidský T-buněčný lymfotropní virus typ 1 Lidský T-buněčný lymfotropní virus typ 2 Chřipka A Virus hepatitis A Virus hepatitis B Virus HIV 1-B</p>
<p>Baktérie <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Propionibacterium acnes</i></p>
<p>Kvasinky <i>Candida albicans</i></p>

G. Výkonnost ve srovnání s testem COBAS® AMPLICOR® HCV MONITOR, v2.0

Výkonnost testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV a testu COBAS® AMPLICOR® HCV MONITOR, v2.0 byla srovnána analýzou vzorků séra a EDTA plazmy plasma od HCV infikovaných pacientů a vzorků s vysokými hladinami HCV. Celkově 40 vzorků, analyzovaných jedním stanovením, bylo platných a v rámci kvantifikačního rozmezí obou testů. Tyto vzorky se skládaly z 28 přirozených vzorků (9 vzorků plazmy a 19 vzorků séra) od ProMedDx (Norton, MA) a 12 vzorků s vysokými hladinami (7 vzorků plazmy 5 vzorků séra) s koncentracemi HCV RNA concentrations $\leq 1,35E+04$ IU/ml. Lineární regresní analýza byla provedena a výsledky jsou uvedeny na obrázku 10.

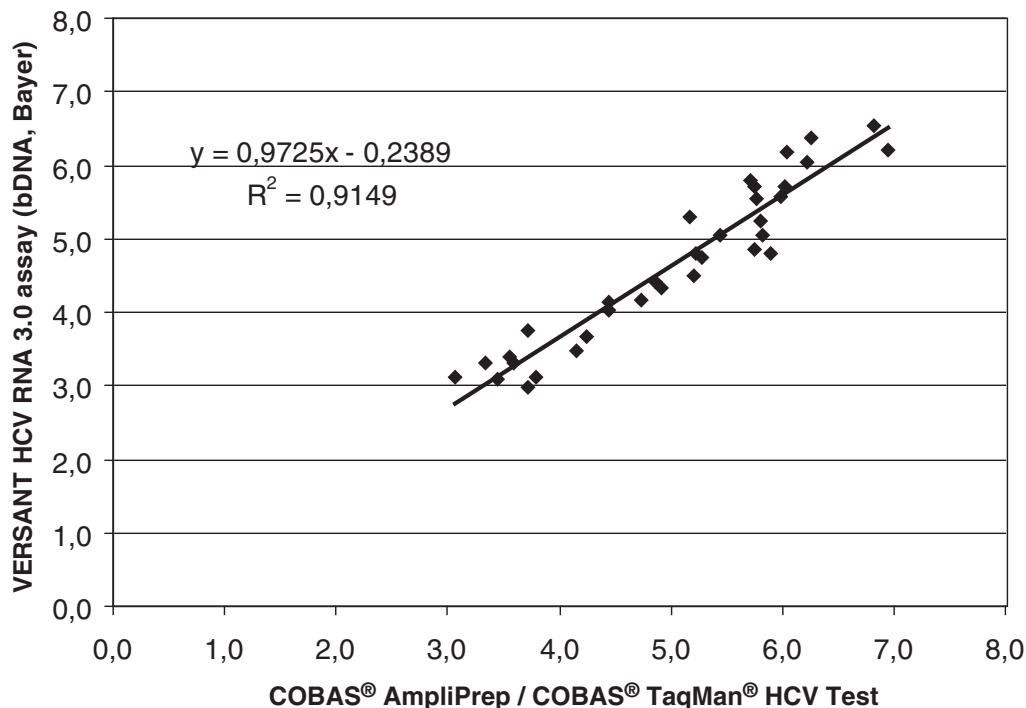
Obrázek 10
Korelace testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV
a testu COBAS® AMPLICOR® HCV MONITOR, v2.0



H. Výkonnost srovnaná s analýzou VERSANT HCV RNA 3.0 Assay (bDNA, Bayer)

Výkonnost testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV a testu VERSANT HCV RNA 3.0 assay (bDNA, Bayer) byla srovnána analýzou vzorků séra a EDTA plazmy plasma od HCV infikovaných pacientů a vzorků s vysokými hladinami HCV. Celkově 34 vzorků, analyzovaných jedním stanovením, bylo platných a v rámci kvantifikačního rozmezí obou testů. Tyto vzorky se skládaly z 26 přirozených vzorků (17 vzorků plazmy a 9 vzorků séra) od ProMedDx (Norton, MA) a 8 vzorků s vysokými hladinami (4 vzorků plazmy 4 vzorků séra) s koncentracemi HCV RNA $\leq 5,5E+03$ IU/ml. Lineární regresní analýza byla provedena a výsledky jsou uvedeny na obrázku 11.

Obrázek 11
Korelace testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV
a analýzy VERSANT HCV RNA 3.0 assay (bDNA, Bayer)



Rozdíly byly zaznamenány u titrů testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV vůči titrům analýzy VERSANT HCV RNA 3.0 assay. Pro odlišnou sadu vzorků se známým genotypem HCV je poskytnuto detailní srovnání vzorků získaných oběma testy v tabulce 8.

LITERATURA

1. Choo, Q.-L., Kuo, G., Weiner, A. J., Overby, L. R., Bradley, D. W. and Houghton, M. 1989. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis viral genome. *Science* **244**:359-362.
2. Alter, H. 1991. Descartes before the horse: I clone, therefore I am: The Hepatitis C virus in current perspective. *Annals of Internal Medicine* **115**:644-649.
3. Lauer, G.M. and Walker, B.D. 2001. Hepatitis C Virus Infection. *New England Journal of Medicine* **345**:41-52.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. Orito, E., Mizokami, M., Suzuki, K. et al. 1995. Loss of serum HCV RNA at week 4 of interferon- α therapy is associated with more favorable long-term response in patients with chronic Hepatitis C. *Journal of Medical Virology* **46**:109-115.
10. 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.
11. 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.
12. Bukh, J., Purcell, R. H., and Miller, R.H. 1992. Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* **89**:4942-4946.
13. Q. Meng, C. Wong, A. Rangachari, S. Tamatsukuri, M. Sasaki, E. Fiss, L. Cheng, T. Ramankutty, D. Clarke, H. Yawata, Y. Sakakura, T. Hirose, and C. Impraim. 2001. Automated Multiplex Assay System for Simultaneous Detection of Hepatitis B Virus DNA, Hepatitis C Virus RNA, and Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA. *Journal of Clinical Microbiology* **39** (8):2937-2945.
14. Smith, E.S., Li, A.K., Wang, A.M., Gelfand, D.H., Myers, T.M. 2003. Amplification of RNA: High-Temperature Reverse Transcription and DNA Amplification with a Magnesium-Activated Thermostable DNA Polymerase. In *PCR Primer: A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Dieffenbach C.W. and Dveksler G.S., Eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, pp. 211-219.
15. 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.
16. Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., and Griffith, R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Bio/Technology* **10**:413-417.
17. Heid, C.A., Stevens, J., Livak, J.K., and Williams, P.M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Research* **6**:986-994.
18. Saldanha, J., Lelie, N., Heath, A. and the WHO Collaborative Study Group. 1999. Establishment of the First International Standard for Nucleic Amplification Technology (NAT) Assays for HCV RNA. *Vox Sanguinis* **76**:149-158.
19. Richmond, J.Y. and McKinney, R.W. eds. 1999. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*. HHS Publication Number (CDC) 93-8395.
20. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Third Edition*. CLSI Document M29-A3 Wayne, PA:CLSI, 2005.
21. International Air Transport Association. *Dangerous Goods Regulations*, 41.st Edition. 2000. 704 pages.
22. Saldanha, J., Heath, A. and the Collaborative Study Group 2003. Collaborative study to calibrate hepatitis C virus genotypes 2 - 6 against the HCV International Standard, 96/790 (genotype 1). *Vox Sanguinis* **84**:20-27.

Informace k revizi dokumentu	
Doc Rev. 9.0 7/2011	<p>Část INTERPRETACE VÝSLEDKŮ byla aktualizována tak, aby obsahovala upozornění pro uživatele, že za velmi vzácných okolností může dojít nezávisle na mutacích virového genomu pokrytého primery, případně sondou, k podhodnocení kvantifikace vzorků genotypu 4.</p> <p>Pokud máte jakékoliv dotazy, kontaktujte prosím místního zástupce společnosti Roche.</p>
Doc Rev. 8.0 4/2011	<p>Části POTŘEBNÝ MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ DODÁVKY a NÁVOD K POUŽITÍ byly aktualizovány, aby odpovídaly revizi názvu Uživatelské příručky k zařízení cobas p 630 od verze softwaru 2.0 do verze 2.2.</p> <p>Části NÁVOD K POUŽITÍ a KONTROLA KVALITY: Vysvětlení italského překladu odstraněním slova “replikát”.</p> <p>Pokud máte dotazy, kontaktujte prosím místního zástupce společnosti Roche.</p>



Vyrobeno ve Švýcarsku pro:
Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ, 08876 USA
Člen Roche Group



Distributed by

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

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Straße 116
68305 Mannheim, Germany

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

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

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

Roche Diagnostics
2, Avenue du Vercors
38240 Meylan, France

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

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

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

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

MICROSOFT a WINDOWS XP jsou obchodní známky společnosti Microsoft Corporation.

PROCLIN je obchodní známka společnosti Rohm and Haas Company.

SST je obchodní známka společnosti Becton Dickinson and Co.

VERSANT je obchodní známka společnosti Bayer Corporation.

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

7/2011
Doc Rev. 9.0

(05998212001-04ENGL)
05998212041-03



Roche Diagnostics GmbH
D-68298 Mannheim

