

COBAS® TaqMan® HCV Test, v2.0 **cobas**®

For Use With The High Pure System

PRO IN VITRO DIAGNOSTICKÉ POUŽITÍ.

COBAS® TaqMan® HCV Test, v2.0
High Pure System Viral Nucleic Acid Kit

HCV HPS V2

48 Tests P/N: 04861817 190
48 Tests P/N: 03502295 001

URČENÉ POUŽITÍ

Test COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 pro použití se systémem High Pure (HPS) je *in vitro* amplifikační test nukleové kyseliny určený pro kvantifikaci RNA viru hepatitidy C (HCV) genotypů 1 až 6 v lidském séru nebo plazmě za použití soupravy High Pure System Viral Nucleic Acid pro manuální přípravu vzorku a analyzátoru COBAS® TaqMan® 48 pro automatizovanou amplifikaci a detekci. Test 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. Poslední data naznačují, že časné změny hladiny HCV RNA v séru nebo plazmě mohou predikovat dlouhodobou odpověď na terapii interferonem¹.

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

SOUHRN A VÝKLAD TESTU

Virus hepatitidy C je považován z 90–95 % za hlavního původce potrasmúzní hepatitidy non-A non-B²⁻⁴. HCV je virus s jednořetězcovou itivně 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 z krevní transfuze výrazně snížilo. Incidence infekce virem HCV je nejvyšší v souvislosti s nitrožilním zneužíváním drog a v menší míře i s ostatními perkutánními aplikacemi⁴. Globální prevalence infekce virem HCV, stanovená imunoserologickými testy, se pohybuje v rozmezí od 1,0 % v Evropě až po 5,3 % v Africe⁵.

Skutečnost, že se v organismu pacientů infikovaných virem HCV vyskytují proti anti-HCV, 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 alaninaminotransferázy (ALT) se sice považuje za hrubý indikátor infekce virem HCV, není však přímou mírou virémie. Stupeň zvýšení hladiny ALT nelze s rozsahem infekce virem HCV přímo korelovat. Hladina ALT totiž může být fakticky zvýšena při celé řadě příčin zánětu jater, kam patří mimo jiné i virová hepatitida. Oproti tomu detekce a kvantitativní stanovení HCV RNA cestou amplifikace nukleové kyseliny polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) nabízí způsob měření aktivní virémie⁶⁻⁸. Pomocí PCR lze detekovat HCV virémie ještě před imunologickou sérokonverzí⁹⁻¹⁰ a detekovat změny virové zátěže u pacientů s chronickou infekcí virem HCV, kteří jsou pozitivní na protilátky a podrobují se terapii interferonem¹.

PRINCIPY PROCEDURY

Test COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 je založen na třech základních postupech: (1) manuální přípravě vzorku pro získání HCV RNA; (2) automatické reverzní transkripci cílové RNA pro vytvoření komplementární DNA (cDNA); (3) PCR amplifikaci cílové cDNA pomocí HCV specifických komplementárních primerů a současnou detekci rozštěpených dvojitě fluorescenčně značených oligonukleotidových detekčních sond, které umožňují kvantifikaci amplifikačního produktu cílové HCV (amplikon).

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

Činidlo Master Mix obsahuje páry primerů a sond specifických pro HCV RNA a pro kvantifikační standard HCV RNA. Detekce amplifikované DNA se provádí pomocí cílově specifických a kvantifikačnímu standardu specifických, dvojité značených oligonukleotidových sond, které umožňují nezávislou identifikaci ampliconu HCV a ampliconu kvantifikačního standardu HCV.

Stanovení virové HCV RNA se provádí pomocí kvantifikačního standardu HCV. Kvantifikační standard HCV 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 ampliconu kvantifikačního standardu HCV od cílového ampliconu HCV. Kvantifikační standard HCV je inkorporován do každého jednotlivého vzorku a kontroly o známém počtu kopií a společně s cílovou HCV prochází celým postupem přípravy vzorku, reverzní transkripce, PCR amplifikace a detekce. Analyzátor COBAS® TaqMan® 48 vypočítává titr HCV RNA v testovaných vzorcích tak, že u každého vzorku a kontroly porovnává signál HCV se signálem kvantifikačního standardu HCV. Kvantifikačním standardem HCV se kompenzují inhibiční efekty a kontroluje se příprava a amplifikační proces tak, aby bylo možno v každém vzorku přesně stanovit HCV RNA.

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^{11,12}. Bylo zjištěno, že mezi známými genotypy HCV se sekvence RNA v největší míře zachovává v 5'-nepřeložené oblasti genomu HCV¹³. Test COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 používá reverzní transkripci a primery PCR amplifikace, které definují sekvence ve vysoce konzervované 5'-nepřeložené oblasti HCV genomu.

Příprava vzorku

Test COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 zpracovává vzorky EDTA plazmy a séra a izoluje HCV RNA pomocí generické manuální přípravy vzorku založené na vazbě nukleové kyseliny na skelná vlákna. HCV virové částice jsou rozloženy inkubací při zvýšené teplotě s proteázou a chaotropním lytickým/vazebným pufrům, který uvolňuje nukleové kyseliny a chrání uvolněnou HCV RNA před působením RNáz v plazmě a séru. Do každého vzorku se společně s činidlem pro lýzu zavádí známý počet molekul kvantifikačního standardu HCV RNA. Následně je k lytické směsi přidán isopropanol a tato směs je pak centrifugována ve sloupci s filtrační vložkou ze skelného vlákna. Během centrifugace jsou HCV RNA a kvantifikační standard HCV RNA navázány na povrch filtru ze skelného vlákna. Nenavázané substance, jako soli, bílkoviny a ostatní buněčné nečistoty, jsou odstraněny centrifugací. Absorbované nukleové kyseliny jsou vymyty a eluovány vodným roztokem. Spotřební materiál umožňuje paralelní zpracovávání 12 vzorků nebo jejich násobky. Zpracovaný vzorek obsahující HCV RNA a kvantifikační standard HCV RNA je přidán k amplifikační/detekční směsi. Cílová HCV RNA a kvantifikační standard HCV RNA jsou pak amplifikovány a detekovány pomocí analyzátoru COBAS® TaqMan® 48 použitím amplifikačních a detekčních činidel dodávaných v testové soupravě.

Reverzní transkripce a PCR amplifikace

Reverzní transkripce

Reakce reverzní transkripce, PCR amplifikace a detekce se provádějí pomocí termostabilního rekombinantního enzymu Z05 DNA polymerázy (Z05) *druhu Thermus*. Za přítomnosti dvojmocného manganu (Mn^{2+}) a za příznivých pufovacích podmínek vykazuje Z05 aktivitu jak reverzní transkriptázy, tak DNA polymerázy^{14,15}. Díky tomu může reverzní transkripce, PCR amplifikace a detekce probíhat v téže reakční směsi.

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

Amplifikace cíle

Po reverzní transkripci cílové HCV RNA a kvantifikačního standardu HCV RNA se reakční směs zahřeje, aby se RNA:cDNA hybrid denaturoval a exponovaly se cílové sekvence primeru. Během ochlazování směsi se upstream primery připojují specificky k řetězci cDNA, Z05 primer prodlužuje a syntetizuje se druhý řetězec DNA. Tím se ukončuje první cyklus PCR, který poskytuje dvouřetězcovou DNA kopii cílové oblasti HCV RNA a kvantifikačního standardu HCV RNA. Reakční směs se opět zahřeje k oddělení výsledné dvouvláknové DNA a exponování cílových sekvencí primeru. Při chlazení směsi se primery připojí k cílové DNA. Z05 v přítomnosti Mn²⁺ a nadbytku dNTP polymerizuje hybridizované primery podél cílových templátů za vzniku molekuly dvouvláknové DNA nazývané amplicon. Analyzátor COBAS® TaqMan® 48 opakuje automaticky tento proces pro určený počet cyklů, kdy při každém cyklu dojde ke zdvojení množství ampliconové DNA. Požadovaný počet cyklů se na analyzátoru COBAS® TaqMan® 48 předem naprogramuje. Amplifikace probíhá pouze v oblasti genomu HCV mezi primery, celý genom HCV amplifikován není.

Selektivní amplifikace

Selektivní amplifikace cílové nukleové kyseliny z klinického vzorku se dosahuje v testu COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 použitím enzymu AmpErase (uracil-N-glykosylázy) a deoxyuridin-trifosfátu (dUTP). Enzym AmpErase rozpozná a katalyzuje rozklad řetězců DNA obsahujících deoxyuridin¹⁶, ale nikoli DNA obsahující deoxythymidin. Deoxyuridin se v přirozené DNA nevyskytuje, je však vždy přítomen v ampliconu, díky použití deoxyuridin-trifosfátu jako jednoho z dNTP v činidle Master Mix, takže deoxyuridin obsahuje pouze amplicon. V důsledku přítomnosti deoxyuridinu je kontaminovaný amplicon citlivý vůči destrukci enzymem AmpErase před amplifikací cílové RNA. Také jakýkoliv nespecifický produkt vytvořený po iniciální aktivaci Master Mix manganem je zničen enzymem AmpErase a tím se zvyšuje senzitivita a specificita. Enzym AmpErase, který je obsažen v činidle Master Mix, katalyzuje rozštěpení DNA obsahující deoxyuridin v místě deoxyuridinového zbytku rozevřením deoxyribosového řetězce v pozici C1. Když je řetězec ampliconové DNA v prvním tepelném cyklizačním kroku zahříván, štěpí se v poloze deoxyuridinu, čímž se DNA stává neamplifikovatelnou. Enzym AmpErase je neaktivní při teplotě nad 55°C, tedy během tepelného cyklování, a proto nerozkládá cílový amplicon vytvořený během amplifikace.

Detekce produktů PCR v testu COBAS® TaqMan®

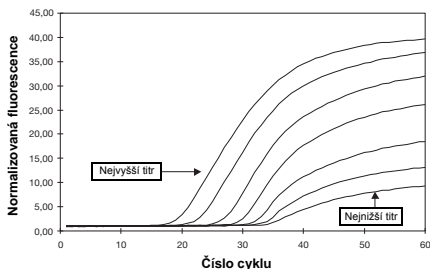
Test COBAS® TaqMan® HCV Test, v2.0 využívá v reálném čase běžící^{17,18} PCR technologii. Použití dvojité značených fluorescenčních sond umožňuje detekci akumulace PCR produktů v reálném čase monitorováním intenzity emise fluorescenčního barviva uvolněného během amplifikačního procesu. Sondy se skládají z oligonukleotidových sond specifických pro HCV a kvantifikační standard HCV s oznamovací a tlumicí barvivem. V testu COBAS® TaqMan® HCV, v2.0, jsou sondy HCV a kvantifikačního standardu HCV značeny různými fluorescenčními oznamovacími barvivy. Jsou-li tyto dvojité fluorescenčně značené sondy intaktní, je fluorescence oznamovacího barviva potlačena blízkostí tlumicího barviva kvůli přenosovému vlivu energie Försterova typu. Při PCR hybridizuje sonda s cílovou sekvencí a je rozštěpena 5' → 3' nukleázovou aktivitou termostabilní Z05 DNA polymerázy. Jakmile je oznamovací a tlumicí barvivo uvolněno a odděleno, nedochází nadále k útlumu a fluorescenční aktivita oznamovacího barviva se zvýší. Amplifikace HCV RNA a kvantifikačního standardu HCV 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 kvantifikačního standardu HCV RNA. Intenzita signálů odpovídá množství výchozího materiálu na začátku PCR reakce.

Základy kvantifikace testu COBAS® TaqMan® HCV, v2.0

Test COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 poskytuje přesně kvantitativní výsledky ve velmi širokém dynamickém rozmezí, protože monitorování amplikonu je prováděno v exponenciální fázi amplifikace. Čím vyšší je titr HCV ve vzorku, tím dřív překročí fluorescence oznamovacího barviva HCV sondy základní hladinu fluorescence (viz obrázek 1). Protože je množství kvantifikačního standardu (QS) HCV RNA konstantní ve všech vzorcích, měla by se fluorescence oznamovacího barviva sondy HCV QS objevit ve stejném cyklu u všech vzorků (viz obrázek 2). V případech, kdy je amplifikace a detekce QS ovlivněna inhibicí nebo špatnou obnovou vzorku, objeví se fluorescence opožděně a tím umožní výpočet titru cílové HCV RNA odpovídajícím způsobem upravit. Objevení specifického fluorescenčního signálu je hlášeno jako kritická prahová hodnota (Ct). Ct je definována jako dílčí číslo cyklu, kdy fluorescence oznamovacího barviva překročí přednastavenou prahovou hodnotu (Určenou fluorescenční hladinu) a začne exponenciální růstovou fází tohoto signálu (viz obrázek 3). Vyšší Ct hodnota značí nižší titr původní cílové HCV RNA. Dvojnásobný vzestup titru koreluje s poklesem o 1 Ct pro cílovou HCV RNA, zatímco 10-ti násobný vzestup titru koreluje s poklesem o 3,3 Ct.

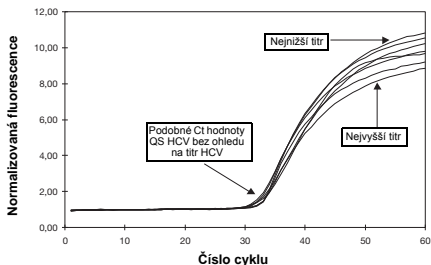
Obrázek 1 ukazuje cílové růstové křivky pro sérii ředění viru v rozsahu 5- \log_{10} . Jakmile koncentrace viru narůstá, růstové křivky se posouvají do dřívějších cyklů. Proto růstová křivka nejvíce vlevo odpovídá nejvyššímu titru viru, zatímco růstová křivka nejvíce vpravo odpovídá nejnižšímu titru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

Obrázek 1



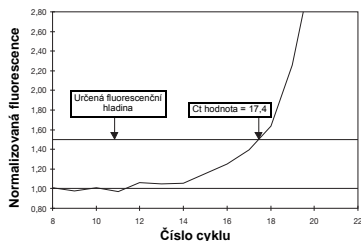
Obrázek 2 ukazuje růstové křivky kvantifikačního standardu pro vzorky ze sérii ředění viru zajmající rozsah 5- \log_{10} . Množství kvantifikačního standardu přidaného do každého vzorku je konstantní pro každou reakci. Ct hodnota kvantifikačního standardu je podobná bez ohledu na titr viru.

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® TaqMan® HCV, v2.0 stanovuje množství RNA HCV viru pomocí druhé cílové sekvence (kvantifikační standard HCV), který je do testovaného vzorku přidán o známé koncentraci. Kvantifikační standard HCV je neinfekční Armored RNA konstrukce, která obsahuje fragmenty HCV sekvencí s vazebnými oblastmi pro primer, identickými s cílovými sekvencemi HCV. Kvantifikační standard HCV generuje také amplifikační produkt stejné délky a základního složení, jako je cílová HCV RNA. Oblast vázající detekční sondu v kvantifikačním standardu HCV je modifikována tak, aby se amplicon kvantifikačního standardu HCV odlišil od cílového ampliconu HCV.

Při hybridizační fázi PCR reakce v analyzátoru COBAS® TaqMan® 48 jsou vzorky osvětleny a excitovány filtrovaným světlem a filtrovaná emisní fluorescenční data jsou shromažďována pro každý vzorek. Odečty pro každý vzorek jsou pak korigovány na fluktuace zařízení. Tyto odečty fluorescence jsou odeslány zařízením do softwaru AMPLILINK a uloženy v databázi. Pre-Checks (kontroly) se používají pro stanovení, zda-li data HCV RNA a kvantifikačního standardu HCV RNA 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 kvantifikační standard HCV RNA. Kalibrační konstanty specifické pro sérii poskytované spolu s testem COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 jsou používány pro kalkulaci hodnoty titru pro vzorky a kontroly založené na Ct hodnotách HCV RNA a kvantifikačního standardu HCV RNA. Test COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 je standardizován vůči druhému mezinárodnímu standardu WHO pro HCV RNA NAT analýzy (NIBSC kód 96/798)¹⁹ a výsledné titry jsou hlášeny v mezinárodních jednotkách (IU/ml).

ČINIDLA

High Pure System Viral Nucleic Acid Kit

48 testů

Souprava High Pure System Viral Nucleic Acid

(P/N: 03502295 001)

LYS

2 x 25 ml


(Lytický/vazebný pufr)

Tris

52 % Guanidin-HCl

< 1 % Urea

20 % Triton X-100

Xn  52 % hm. guanidin-HCl

Zdraví škodlivý

CAR

2 x 2 mg

(RNA, lyofilizovaná)

2 x 100 mg

PK

(Proteináza K, lyofilizovaná)

99 % Proteináza K, lyofilizovaná

Xn 99 % Proteináza K, lyofilizovaná



Zdraví škodlivý

IRB

(Pufr na odstraňování inhibitorů)

Tris

65 % Guanidin-HCl

Xn 65 % hm. guanidin-HCl



Zdraví škodlivý

1 x 33 ml

WASH

(Promývací pufr)

Tris

NaCl

(přidat 50 ml ethanolu a 30 ml deionizované vody)

1 x 20 ml

ELB

(Eluční pufr)

1 x 30 ml

RS

(Stojanová souprava systému High Pure System Viral Nucleic Acid)

Lytický stojan

Stojan filtrační zkumavky s připevněným odpadním stojanem

Eluční stojan

Krycí stojan

Svorka

4 kusy

WR

(Odpadní stojan High Pure System Viral Nucleic Acid)

8 kusů

COBAS® TaqMan® HCV Test, v2.0

(P/N: 04861817 190)

HCV HPS V2**48 testů****Příprava vzorku a kontrolní činidla****HCV QS**

(kvantifikační standard COBAS® TaqMan® HCV)

2 x 1,0 ml

Pufr s fosforečnanem sodným

EDTA

< 0,005 % poly rA RNA (syntetická)

< 0,001 % Armored RNA konstrukce obsahující vložku

s vazebnou sekvencí HCV primeru a unikátní vazebnou

oblast sondy (neinfekční RNA v bakteriofágu MS2)

Amarantové barvivo

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, v2.0


2 x 1,0 ml

[HCV High (+) kontrola, v2.0]

< 0,001 % Armored RNA konstrukce obsahující HCV sekvence (neinfekční RNA v MS2 bakteriofágu)

Negativní lidská plazma, nereagující podle testů na protilátky proti HCV, protilátky proti HIV-1/2, HIV p24 antigenu a HBsAg; HIV-1 RNA, HCV RNA a HBV DNA nedetekovatelné PCR metodami.

0,1 % 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, v2.0


2 x 1,0 ml

[HCV Low (+) kontrola, v2.0]

< 0,001 % Armored RNA konstrukce obsahující HCV sekvence (neinfekční RNA v MS2 bakteriofágu)

Negativní lidská plazma, nereagující podle testů na protilátky proti HCV, protilátky proti HIV-1/2, HIV p24 antigenu a HBsAg; HIV-1 RNA, HCV RNA a HBV DNA nedetekovatelné PCR metodami.

0,1 % 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

[COBAS® TaqMan® negativní kontrola (lidská plazma)]

Negativní lidská plazma, nereagující podle testů na protilátky proti HCV, protilátky proti HIV-1/2, HIV p24 antigenu a HBsAg; HIV-1 RNA, HCV RNA a HBV DNA nedetekovatelné PCR metodami.

0,1 % 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.

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

(COBAS® TaqMan® HCV Master Mix)

2 x 1,4 ml

Tricinový pufr

Hydroxid draselný

Acetát draselný

< 20 % dimethyl sulfoxid

Glycerol

< 0,001 % dATP, dCTP, dGTP, dUTP

< 0,001 % Upstream a downstream primery pro

5'-nepřeloženou oblast HCV

< 0,001 % Fluorescenčně značené oligonukleotidové sondy specifické pro HCV a kvantifikační standard HCV

< 0,05 % Z05 DNA polymeráza (mikrobiální)

< 0,1 % enzym AmpErase (uracil-N-glykosyláza) (mikrobiální)

0,09 % azid sodný

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

UPOZORNĚNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

A. PRO *IN VITRO* DIAGNOSTICKÉ POUŽITÍ.

- B. Tento test není určen k plošnému screeningovému vyšetřování krve či krevních derivátů na přítomnost HCV, ani jako diagnostický test k potvrzení přítomnosti infekce virem HCV.
- C. Rozmezí přiřazené kalibračním koeficientům jsou specifické pro šarži a specifické pro test COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 pro použití se systémem High Pure. Tyto hodnoty nemusí být platné při použití s alternativními metodami přípravy vzorku.
- D. Tento test je určen pro použití s lidskou plazmou odebranou do EDTA antikoagulačního činidla a lidského séra.
- E. Nepipetujte ústy.
- F. 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.
- G. **Při odebrání alikvotních podílů z lahvíček s činidly dbejte na to, aby nedošlo k mikrobiální nebo ribonukleázové kontaminaci.**
- H. **Doporučuje se používat sterilní pipety na jedno použití a hroty na pipety prosté RNázy.**
- I. Nesměšujte dohromady činidla z různých šarží, ani z různých lahvíček téže šarže.
- J. Nesměšujte dohromady činidla z různých souprav.
- K. Nespotebovaná činidla, odpad a vzorky likvidujte v souladu s celostátními a místními předpisy.
- L. Po uplynutí data expirace již soupravu nepoužívejte.
- M. Bezpečnostní listy pro materiály (MSDS) zašle na vyžádání Vaše místní pobočka společnosti Roche.
- N. 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*²⁰ a v dokumentu CLSI č. M29-A3²¹. Všechny plochy důkladně očistěte a vydezinfikujte čerstvě připraveným 0,5 % roztokem chlornanu sodného v deionizované nebo destilované vodě.

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

- O. **UPOZORNĚNÍ: CTM (-) C, HCV L(+)**C**, v2.0 a HCV H(+)**C**, v2.0** obsahují lidskou plazmu pocházející z lidské krve. Zdrojový materiál byl testován a byl sledán nereaktivním na přítomnost povrchového antigenu hepatitidy B (HBsAg), protilátek proti HIV-1/2 a HCV a HIV p24 antigenu. Testování negativní lidské plazmy metodami PCR neprokázalo žádné detekovatelné HIV-1 RNA, HCV RNA ani HBV DNA. Nicméně žádná známá testovací metoda nepředstavuje dokonalou záruku, že se s deriváty z lidské krve nepřeneseou nějaká infekční agens. Proto je třeba považovat všechny materiál lidského původu za potenciálně infekční. **CTM (-) C; HCV L(+)**C**, v2.0 a HCV H(+)**C**, v2.0** je třeba zacházet jako s infekčním materiálem a při práci s nimi je nutno uplatňovat bezpečné laboratorní postupy, například ty, které jsou uvedeny v publikaci *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*²⁰ a v dokumentu CLSI č. M29-A3²¹. Všechny plochy důkladně očistěte a vydezinfikujte čerstvě připraveným 0,5 % roztokem chlornanu sodného v deionizované nebo destilované vodě.
- P. **HCV MMX a CTM Mn²⁺** obsahují azid sodný. Ten může reagovat s olověnými 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.

- Q. Při práci s jakýmkoli činidlem používejte rukavice na jedno použití, pracovní oděv a ochranné brýle. Dbejte na to, aby se tyto materiály nedostaly do styku s pokožkou, očima nebo sliznicemi. Pokud ke styku dojde, okamžitě postiženou oblast omyjte velkým množstvím vody. Pokud by byla tato opatření zanedbána, může dojít k popáleninám. Jestliže se některá činidla rozlijí nebo rozsypou, rozřeďte je vodou a dosucha vytřete.

ZACHÁZENÍ SE VZORKY A JEJICH SKLADOVÁNÍ

Činidla pro přípravu vzorků

- A. Skladujte činidla pro soupravu High Pure System Viral Nucleic Acid při teplotě 15–25°C po přijetí.
- B. Skladujte elučňi pufr (**ELB**) a lytický/vazebný pufr (**LYS**) při teplotě 15–25°C. Po otevření skladujte **ELB** a **LYS** při teplotě 15–25°C. Otevřené **ELB** a **LYS** musí být spotřebovány během 28 dní nebo do doby použitelnosti na obalu, dle toho, která je kratší.
- C. Po přidání elučňiho pufru (**ELB**) pro rekonstituci nosičové RNA a proteinázy K uchovávejte nespotebovanou rekonstituovanou nosičovou RNA (**CAR**) a nepoužitou rekonstituovanou proteinázu K (**PK**) při teplotě –15 až –25°C. Po rekonstituci musí být nosičová RNA a proteináza K spotřebovány během 28 dnů nebo do doby použitelnosti na obalu, dle toho, která je kratší.
- D. Po přidání ethanolu do pufru pro odstranění inhibitorů a přidání ethanolu a vody do promývacího pufru, uchovávejte pufr na odstranění inhibitorů (**IRB**) a promývací pufr (**WASH**) při teplotě 15–25°C. Tyto pracovní roztoky jsou stabilní po dobu 28 dnů nebo do doby použitelnosti, dle toho, která je kratší.
- E. Lytický/vazebný pracovní roztok [lytický/vazebný pufr s nosičovou RNA, proteináza K a **HCV QS**] musí být spotřebovány okamžitě po přípravě. Jakýkoliv nadbytek musí být zlikvidován.

Amplifikační a detekční činidla

- A. **Činidla ani kontroly nezmrazujte.**
- B. Skladujte **HCV MMX; CTM (–) C; HCV L(+)**C**, v2.0; HCV H(+)**C**, v2.0; HCV QS a CTM Mn²⁺** při teplotě 2–8°C. Pokud nejsou tato činidla otevřená, jsou stabilní až do uplynutí doby použitelnosti, která je na nich uvedena. Po otevření pro odebrání alikvotní části pro velikost šarže o 12 vzorcích, uskladněte zbývající **HCV MMX; HCV L(+)**C**, v2.0; HCV H(+)**C**, v2.0; HCV QS a CTM Mn²⁺** při teplotě 2–8°C. Po otevření jsou **HCV MMX; HCV L(+)**C**, v2.0; HCV H(+)**C**, v2.0; HCV QS a CTM Mn²⁺** stabilní při teplotě 2–8°C po dobu 28 dní nebo do doby použitelnosti, dle toho, která je kratší. Po otevření je třeba jakoukoliv nespotebovanou část **CTM (–) C** zlikvidovat.
- C. Pracovní Master Mix (připravený přidáním **CTM Mn²⁺** do **HCV MMX**) musí být uchováván při teplotě 2–8°C v **temnu**. Připravené vzorky a kontroly musí být přidány během 1 hodiny přípravy pracovního Master Mix.
- D. Zpracované vzorky a kontroly jsou stabilní maximálně 3 hodiny při teplotě 20–30°C, 24 hodin při teplotě 2–8°C nebo při zmrazení na –20°C po dobu 1 týdne.
- E. S amplifikací je třeba začít do 2 hodin od okamžiku, kdy byly zpracované vzorky a kontroly přidány do pracovního Master Mix.

DODÁVANÝ MATERIÁL

Činidla pro přípravu vzorků

- A. **High Pure System Viral Nucleic Acid Kit**
Souprava High Pure System Viral Nucleic Acid
(P/N: 03502295 001)
- LYS**
(Lytický/vazebný pufr)
- CAR**
(Nosičová RNA)
- PK**
(Proteináza K)
- IRB**
(Pufr na odstraňování inhibitorů)

WASH

(Promývací pufr)

ELB

(Eluční pufr)

RS

(Stojanová souprava systému High Pure System Viral Nucleic Acid)

WR

(Odpadní stojan High Pure System Viral Nucleic Acid)

Amplifikační a detekční činidla**B. COBAS® TaqMan® HCV Test, v2.0**

(P/N: 04861817 190)

| |
|------------|
| HCV HPS V2 |
|------------|

HCV QS

(Kvantifikační standard COBAS® TaqMan® HCV)

HCV H(+)C, v2.0

[HCV High (+) kontrola, v2.0]

HCV L(+)C, v2.0

[HCV Low (+) kontrola, v2.0]

CTM (-) C

[COBAS® TaqMan® negativní kontrola (lidská plazma)]

HCV MMX

(COBAS® TaqMan® HCV Master Mix)

CTM Mn²⁺

(COBAS® TaqMan® roztok manganu)

POTŘEBNÝ MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ DODÁVKY**Vybavení a software**

- Analyzátor COBAS® TaqMan® 48
- Software AMPLILINK
- Datová stanice pro software AMPLILINK
- Příručka pro analyzátor COBAS® TaqMan® 48 pro použití s aplikační příručkou pro software AMPLILINK, verze 3.2 a 3.3
- Aplikační příručka pro software AMPLILINK, verze 3.2 pro použití se zařízením COBAS® AmpliPrep, analyzátořem COBAS® TaqMan®, analyzátořem COBAS® TaqMan® 48 a analyzátořem COBAS® AMPLICOR® nebo aplikační příručka pro software AMPLILINK, verze 3.3 pro použití se zařízením COBAS® AmpliPrep, analyzátořem COBAS® TaqMan®, analyzátořem COBAS® TaqMan® 48, analyzátořem COBAS® AMPLICOR® a zařízením **cobas p 630**
- Zařizování pro manipulaci s víčky K-zkumavek

Spotřební materiál

- Box s K-zkumavkami v počtu 12 x 96

Požadavky na centrifugu

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

DALŠÍ POTŘEBNÝ MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ DODÁVKY

- Isopropanol (> 99 %) – vyhovuje ACS specifikacím nebo lepší
- Ethanol (96–100 %) – vyhovuje ACS specifikacím nebo lepší
- Deionizovaná voda
- Nastavitelné pipety*: (kapacita 250 µl a 1000 µl) s aerosolovou bariérou nebo RNázy prostými špičkami s pozitivním posuvem

- Pipetová pomůcka: Drummond (P/N: 4-000-100) nebo ekvivalentní
- Vodní lázeň nastavená na 50°C (± 2°C)
- Vyhřívací blok nastavený na 70°C (± 2°C)
- Sterilní jednorázové sérologické pipety: 5, 10 a 25 ml
- Sterilní polypropylenové kónické zkumavky o objemu 15 ml a 50 ml: Corning (P/N: 430052 a P/N: 430290) nebo ekvivalentní
- Sterilní 2,0 ml mikrocentrifugační zkumavky: Sarstedt (P/N: 72.693.005) nebo ekvivalentní
- Vířivý mixér
- Stojany na zkumavky
- Rukavice na jedno použití bez pudru
- Kalibrované teploměry pro vodní lázeň a vyhřívací blok
- * 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 ampliconu.

ODBĚR, PŘEPRAVA A SKLADOVÁNÍ VZORKŮ

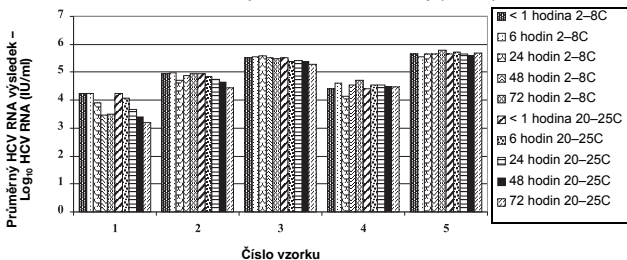
Pozn.: Se všemi vzorky je třeba zacházet jako s infekčními.

A. Odběr vzorku

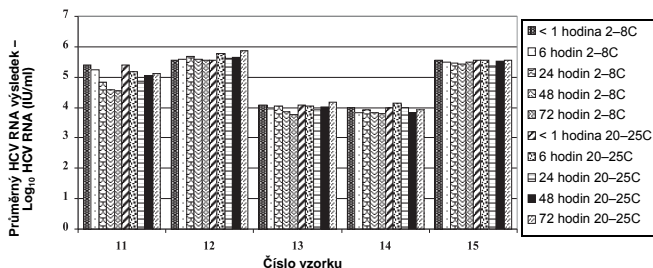
Test COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 je určen pouze pro použití s vzorky séra nebo plazmy. Krev by se měla odebírat do separačních zkumavek na sérum BD SST (Serum Separator Tubes) nebo do sterilních zkumavek za použití EDTA (vršek levandulové barvy) jako antikoagulantu.

Plnou krev uchovávejte při teplotě 2–25°C maximálně 6 hodin. Sledujte pokyny výrobce zkumavky pro separaci séra nebo plazmy z plné krve během 6-ti hodin od sběru. Sérum nebo plazmu převeďte do sterilní polypropylenové zkumavky. Obrázky 4 a 5 ukazují data z těchto 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, SST zkumavky (sérum)



Obrázek 5
HCV Stabilita v plné krvi, EDTA zkumavky (EDTA plazma)



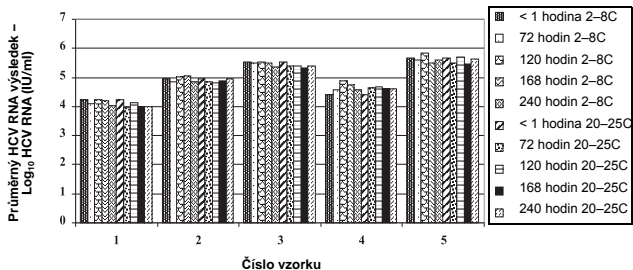
B. Přeprava vzorků

Při přepravě plné krve, séra nebo plazmy je třeba dodržovat celostátní resp. místní předpisy o dopravě etiologických látek²². Plná krev se přepravuje za teplot 2–25°C a musí se zpracovat do 6 hodin od odběru. Plazma nebo sérum se může přepravovat při teplotě 2–8°C nebo ve zmrazeném stavu při teplotách –20°C až –80°C.

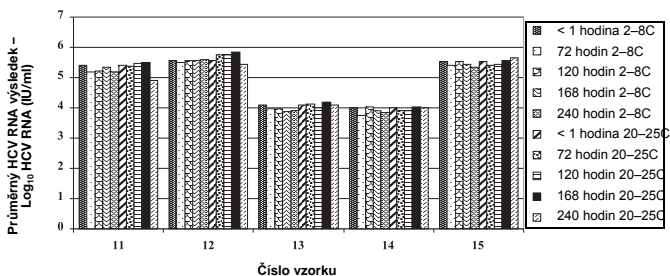
C. Skladování vzorků

Vzorky 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 800–900 µl ve sterilních polypropylenových zkumavkách o objemu 2,0 ml se šroubovacím uzávěrem (například Sarstedt P/N: 72.694.006). Obrázky 6 a 7 ukazují data z těchto studií o uchování vzorků. Studie byly provedeny za použití testu COBAS® AMPLICOR® HCV MONITOR, v2.0.

Obrázek 6
Stabilita HCV v séru



Obrázek 7
Stabilita HCV v EDTA plazmě



Vzorky séra a plazmy mohou být zmrazeny a rozmrazeny maximálně třikrát bez ztráty HCV RNA. Tabulka 1 ukazuje data z těchto studií zmrazování – rozmrazování provedených pomocí testu COBAS® AMPLICOR® HCV MONITOR, v2.0.

Tabulka 1
Log₁₀ diference v koncentracích HCV z cyklu 0 pro sérum a EDTA plazmu, zmrazené a rozmražené pro 5 cyklů

| Matrix | Stabilita Vzorek č. | Cyklus zmrazení / rozmrazení | | | | | |
|----------------------|---------------------|------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | | Cyklus 0 | Cyklus 1 | Cyklus 2 | Cyklus 3 | Cyklus 4 | Cyklus 5 |
| Sérum | 1 | 0,00 | -0,052 | 0,238 | 0,179 | -0,670 | -0,277 |
| | 2 | 0,00 | 0,293 | 0,228 | -0,206 | -0,338 | 0,175 |
| | 3 | 0,00 | -0,270 | -0,023 | -0,430 | 0,008 | -0,229 |
| | 4 | 0,00 | 0,071 | -0,516 | -0,295 | -0,564 | -0,670 |
| | 5 | 0,00 | 0,342 | -0,031 | -0,344 | -0,436 | -0,277 |
| Průměrné sérum | | 0,00 | 0,077 | -0,021 | -0,239 | -0,400 | -0,246 |
| Plazma s EDTA | 11 | 0,00 | -0,006 | 0,043 | -0,143 | -0,159 | -0,140 |
| | 12 | 0,00 | -0,329 | -0,375 | -0,234 | -0,642 | -0,265 |
| | 13 | 0,00 | -0,056 | -0,248 | -0,371 | -0,395 | -0,142 |
| | 14 | 0,00 | 0,186 | -0,066 | -0,034 | -0,241 | -0,084 |
| | 15 | 0,00 | -0,120 | -0,111 | -0,055 | 0,250 | -0,217 |
| Průměrná EDTA plazma | | 0,00 | -0,065 | -0,151 | -0,167 | -0,237 | -0,170 |

NÁVOD K POUŽITÍ

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

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

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

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

Množství pro jedno měření:

Každá souprava obsahuje dostatečné množství činidla na čtyři 12-testová měření, která mohou probíhat zvlášť nebo současně. Jeden replikát, každý z CTM (-) C, HCV L(+)+C, v2.0 a HCV H(+)+C, v2.0 musí být zahrnut do každého běhu testu s až 24 vzorky a kontrolami (viz část „Kontrola kvality“). Amplifikační a detekční činidla jsou balena v 24-testových lahvíčkách na dvě použití. Pro co nejeefektivnější využití je vhodné zpracovávat činidla, vzorky i kontroly v dávkách, jež jsou násobky 12.

Příprava vzorku a kontroly

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

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

A. Příprava činidel

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

1. Připravte pufr pro odstranění inhibitorů pipetováním 20 ml 96–100 % ethanolu to pufru pro odstranění inhibitorů (IRB). Promíchejte 5–10-ti násobným obrácením. Toto zajistí dostatek rekonstituovaného pufru pro odstranění inhibitoru na 48 testů.
2. Připravte promývací pufr pipetováním 50 ml 96–100 % ethanolu a 30 ml deionizované vody do promývacího pufru (WASH). Promíchejte 5–10-ti násobným obrácením. Toto zajistí dostatek rekonstituovaného promývacího pufru na 48 testů.
3. Předehřejte elučňí pufr (ELB) na teplotu 70°C (± 2°C) v mikrocentrifugační zkumavce se šroubovacím uzávěrem o objemu 2,0 ml. Je možné použít více zkumavek. Elučňí objem na vzorek je 75 µl. Předehřejte objem uvedený v tabulce níže dle počtu testů.

| Činidlo | Počet replikátů | |
|------------------|-----------------|-----|
| | 12 | 24 |
| Elučňí pufr (ml) | 2,0 | 4,0 |

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

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

5. Pipetujte 0,5 ml elučňího pufru (ELB) do nosičové RNA (CAR). Vyměňte uzávěr, otočte lahvíčkou a pak jí míchejte vířením, dokud se veškerá nosičová RNA nerozpustí. Rekonstituovaná nosičová RNA je dostačující pro 24 testů. Nepoužitý objem rekonstituované nosičové RNA může být uchováván při teplotě -15 až -25°C po dobu maximálně 28 dní nebo do doby použitelnosti, dle toho, která doba je kratší.
6. Pipetujte 5,0 ml elučňího pufru (ELB) do proteinázy K (PK). Vyměňte uzávěr, otočte lahvíčkou a pak jí míchejte vířením, dokud se veškerá proteináza K nerozpustí. Rekonstituovaná proteináza K je dostačující pro 24 testů. Nepoužitý objem rekonstituované proteinázy K může být uchováván při teplotě -15 až -25°C po dobu maximálně 28 dní nebo do doby použitelnosti, dle toho, která doba je kratší.

7. Připravte lytický/vazebný pracovní roztok následujícím způsobem pipetováním objemů uvedených v následující tabulce dle počtu vzorků a kontrol, které mají být zpracovány.

| Činidla | Počet replikátů | |
|---------------------------|-----------------|------|
| | 12 | 24 |
| Lytický/vazebný pufr (ml) | 7,0 | 14,0 |
| Nosičová RNA (µl) | 140 | 280 |
| HCV QS (µl) | 56 | 112 |
| Proteináza K (ml) | 1,4 | 2,8 |

Pozn.: Objem HCV QS je specifický pro test COBAS® TaqMan® HCV, v2.0.

Pozn.: Pokud je třeba použít zmrazenou rekonstituovanou nosičovou RNA nebo proteinázu K, rozpust'te je při pokojové teplotě a před použitím je několikrát obrát'te.

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

Nepoužitý lytický/vazebný pufr (**LYS**) může být uchovávan při teplotě 15 až 25°C po dobu maximálně 28 dní nebo do doby použitelnosti, dle toho, která doba je kratší. Nespotebovaný lytický/vazebný pracovní roztok je třeba znehodnotit.

B. Příprava vzorku a kontroly

Pozn.: Pro tuto proceduru jsou doporučovány nastavitelné pipetory s hroty odolnými vůči aerosolům.

Pozn.: V krocích 19 a 22 může být použita opakovací pipeta s vhodnou velikostí sterilního kombinovaného hrotu. Je však třeba dávat velký pozor, aby se předešlo spláchnutí činidel nebo zkrížené kontaminaci.

1. Pipetujte 625 µl lytického/vazebného pracovního roztoku do každé jamky v lytickém stojanu (I, transparentní). Zatlačte víčka dolů do krycí pozice.
2. Při postupném otevření jen jedné jamky pipetujte 500 µl vzorku nebo kontroly do odpovídající jamky. Po přidání vzorku nebo kontroly zatlačte víčko dolů, dokud se neuzavře zamykací mechanismus pro těsný uzávěr jamky.
3. Poté, co byly přidány všechny vzorky a kontroly, promíchejte naplněný lytický stojan vířením po dobu přibližně 10 sekund. Vizuálně si ověřte, že byly všechny jamky dobře vířením promíchány.
4. Inkubujte lytický stojan ve vodní lázni předehřáté na 50°C (± 2°C) po dobu 10 minut. Ponořte lytický stojan do vodní lázně, která je naplněna přibližně 5–7 cm vody. Po vytažení z vodní lázně lytický stojan osušte.
5. Centrifugujte lytický stojan po dobu 10–20 sekund při nastavení 4600 x g v mikrotitrační destičkové centrifuze. Centrifuga nemusí dosáhnout nastavenou rychlost.
6. Při postupném otevření jen jedné jamky pipetujte 250 µl isopropanolu do každé z nich. Po každém přidání zatlačte víčko dolů, dokud se neuzavře zamykací mechanismus pro těsný uzávěr jamky.

Pozn.: Objem isopropanolu je specifický pro test COBAS® TaqMan® HCV, v2.0.

7. Míchejte vzorky převrácením stojanu třikrát a následným vířením stojanu po dobu přibližně 10 sekund. Vizuallyně si ověřte, že byly všechny jamky dobře vířením promíchány.
8. Centrifugujte lytický stojan po dobu 10–20 sekund při nastavení 4600 x g v mikrotitrační destičkové centrifuze. Centrifuga nemusí dosáhnout nastavenou rychlost.
9. Otvírejte najednou jen jednu jamku, přeneste 750 µl směsi vzorku nebo kontroly do odpovídajících jamek stojanu filtrační zkumavky (II, Žlutý) s přípevným odpadním stojanem (bílý). Po přidání každé směsi vzorku nebo kontroly zatlačte víčko dolů, dokud se neuzavře zamykací mechanismus pro těsný uzávěr jamky.
10. Po přidání všech vzorků nebo kontrol centrifugujte soustavu stojanu filtrační zkumavky po dobu 2 minut při 4600 x g v mikrotitrační destičkové centrifuze.
11. Po otevření jen jedné jamky přeneste zbývající směs vzorku nebo kontroly do odpovídajících jamek stojanu filtrační zkumavky. Po přidání každé směsi vzorku nebo kontroly uzavřete těsně víko jamky. Lytický stojan odpovídajícím způsobem zlikvidujte.
12. Centrifugujte soustavu stojanu filtrační zkumavky po dobu 2 minut při 4600 x g v mikrotitrační destičkové centrifuze.
13. Vyjměte stojan filtrační zkumavky z odpadního stojanu stisknutím obou uzavíracích spojení na horní straně stojanu filtrační zkumavky. Znehodnoťte odpadní stojan. Vyměňte za nový odpadní stojan a zasadte stojan filtrační zkumavky do odpadního stojanu.
14. Otevřete všechna víka stojanu filtrační zkumavky pomocí svorky a pipetujte 400 µl pufru pro odstranění inhibitorů (IRB) po stěně každé jamky. **Nedotýkejte se stran jamky.** Po každém přidání pufru pro odstranění inhibitorů do všech jamek uzavřete pevně víka.
15. Centrifugujte soustavu stojanu filtrační zkumavky po dobu 2 minut při 4600 x g v mikrotitrační destičkové centrifuze.
16. Otevřete všechna víka pomocí svorek a pipetujte 700 µl promývacího pufru (**WASH**) po stěně každé jamky. **Nedotýkejte se stran jamky.** Po každém přidání promývacího pufru do všech jamek uzavřete pevně víka.
17. Centrifugujte soustavu stojanu filtrační zkumavky po dobu 2 minut při 4600 x g v mikrotitrační destičkové centrifuze.
18. Vyjměte stojan filtrační zkumavky z odpadního stojanu stisknutím obou uzavíracích spojení na horní straně stojanu filtrační zkumavky. Znehodnoťte odpadní stojan. Vyměňte za nový odpadní stojan a zasadte stojan filtrační zkumavky do odpadního stojanu.
19. Otevřete všechna víka pomocí svorek a pipetujte 700 µl promývacího pufru po stěně každé jamky. **Nedotýkejte se stran jamky.** Po každém přidání promývacího pufru do všech jamek uzavřete pevně víka.
20. Centrifugujte soustavu stojanu filtrační zkumavky po dobu 3 minut při 4600 x g v mikrotitrační destičkové centrifuze.
21. Vyjměte stojan filtrační zkumavky z odpadního stojanu stisknutím obou uzavíracích spojení na horní straně stojanu filtrační zkumavky. Umístěte stojan filtrační zkumavky do elučňního stojanu (IIIA, modrý) a zasadte stojan filtrační zkumavky do elučňního stojanu. Znehodnoťte odpadní stojan odpovídajícím způsobem.
22. Otevřete všechna víka pomocí svorek a pipetujte 75 µl předešťáče elučňního pufru (**ELB**) do středu každého filtru, aniž byste se ho dotkli.

Pozn.: Nepřidávejte elučňní pufr dávkováním po stěně jamky.

Po každém přidání elučňního pufru do všech jamek uzavřete pevně víka. Elučňní stojan inkubujte při pokojové teplotě po dobu minimálně 3 minut po přidání elučňního pufru do poslední jamky.

23. Centrifugujte soustavu stojanu filtrační zkumavky po dobu 3 minut při 4600 x g v mikrotitrační destičkové centrifuze.
24. Vyjměte stojan filtrační zkumavky z elučňního stojanu stisknutím obou uzavíracích spojení na horní straně stojanu filtrační zkumavky. Znehodnoťte stojan filtrační zkumavky odpovídajícím způsobem.
25. Umístěte krycí stojan (IIIB, modrý) do elučňního stojanu (IIIA, modrý). Silně stiskněte a uzavřete spojení na elučňním stojanu. Všechna víčka uzavřete.

26. Zpracované vzorky a kontroly jsou používány přímo pro PCR. Použijte 50 µl zpracovaných vzorků a kontrol pro amplifikaci. Přidejte zpracované vzorky a kontroly k pracovnímu Master Mix do 3 hodin od ukončení přípravy vzorku a kontroly. Pokud není možné použít zpracované vzorky a kontroly do 3 hodin od přípravy, mohou být uskladněny při teplotě 2–8°C po dobu maximálně 24 hodin v zakrytém elučním stojanu nebo zmrazeny při teplotě –20°C po dobu 1 týdne ve sterilních polypropylenových zkumavkách se šroubovacím uzávěrem o objemu 2,0 ml (například Sarstedt P/N: 72.694.006). Amplifikujte zpracované vzorky a kontroly po dobu 2 hodin přidáním vzorků a kontrol do pracovního Master Mix.

Reverzní transkripce, amplifikace a detekce

Pozn.: *K-nosiče a držák K-nosiče by měly být otřeny tkaninou nepouštějící vlas navlhčenou do 70 % roztoku isopropanolu.*

C. Příprava činidel

Pozn.: *Vzorky a kontroly zpracované pomocí činidel COBAS® TaqMan® HCV Master Mix (HCV MMX), „Pracovní Master Mix“ (Pracovní MMX) a Pracovní MMX plus jsou citlivé na světlo. Ochraňte tato činidla před světlem.*

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

Pozn.: *Připravte pracovní MMX po dokončení přípravy vzorku a kontroly.*

Pozn.: *Pracovní MMX musí být použit do 1 hodiny od přípravy.*

Pozn.: *Jakmile jsou zpracované vzorky a kontroly přidány do pracovního MMX, musí být amplifikace započata do 2 hodin.*

1. Temperujte jednu lahvičku HCV MMX a jednu lahvičku CTM Mn²⁺ na teplotu okolí po dobu minimálně 30 minut.
2. Umístěte K-nosič do držáku K-nosiče.
3. Umístěte nové K-zkumavky do K-nosiče, aniž byste se dotkli stran K-zkumavky.

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

4. Otevřete K-zkumavky pomocí víčkovače K-zkumavek. Umístěte víčka do parkovací pozice držáku K-zkumavek.
5. Připravte pracovní MMX dle následujícího návodu:

Na 24 testů přidejte 170 µl CTM Mn²⁺ do jedné lahvičky s HCV MMX. Lahvičku zavřete a dobře promíchejte převrácením 10x. Víření k promísení pracovního MMX nepoužívejte. Pracovní MMX chraňte před světlem a spotřebujte do 1 hodiny.

Na 12 testů odeberte 669 µl HCV MMX a umístěte do zkumavky o objemu 2 ml. Přidejte 81 µl CTM Mn²⁺ do zkumavky o objemu 2 ml obsahující HCV MMX, zkumavku zavíčkujte a dobře promíchejte otočením 10x. Pracovní MMX chraňte před světlem a spotřebujte do 1 hodiny. Uskladněte zbývající nepoužitý HCV MMX a CTM Mn²⁺ v originálních lahvičkách při teplotě 2–8°C. Po otevření jsou HCV MMX a CTM Mn²⁺ stabilní po dobu 28 dnů při teplotě 2–8°C nebo do uplynutí doby použitelnosti, dle toho, která je kratší.

Pozn.: *Objem CTM Mn²⁺ je specifický pro test COBAS® TaqMan® HCV, v2.0.*

6. Pipetujte 50 µl pracovního MMX do každé K-zkumavky.

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

7. Z každého zpracovaného vzorku a kontroly odměřte 50 µl do příslušné K-zkumavky obsahující pracovní MMX; použijte k tomu mikropipetor s hrotem s aerosolovou bariérou nebo s pozitivním posuvem. Jemně promíchejte každý vzorek nebo kontrolu nahoru a dolů třikrát pomocí mikropipetoru, který nevytváří bubliny.
8. Opakujte krok 7 pro každý zpracovaný vzorek a kontrolu, dokud nebylo vše přeneseno do K-zkumavek. Pro každý vzorek a kontrolu použijte nový hrot. Proveďte vizuální kontrolu přítomnosti bublinek a dle potřeby je odstraňte. Uzavřete K-zkumavky pomocí víčkovače K-zkumavek. Vizually si ověřte, že byly přidány odpovídající objemy.

9. S amplifikací je třeba začít do 2 hodin od okamžiku, kdy byly zpracované vzorky a kontroly odměřeny do K-zkumavek obsahujících pracovní MMX.

D. Plnění a provoz analyzátoru COBAS® TaqMan® 48

1. Zapněte počítač pracovní stanice a přihlaste se k Windows XP za použití odpovídajícího uživatelského jména a hesla.
2. Zapněte analyzátor COBAS® TaqMan® 48. Zkontrolujte, zda je zařízení inicializováno a připraveno k použití. Jsou-li K-nosiče z předchozích měření nadále umístěny v některém z termocyklerů, odstraňte je pomocí přemístovače K-nosičů.
3. Spust'te software AMPLILINK na počítači. Přihlaste se pomocí odpovídajícího uživatelského jména a hesla.
4. Pro vytvoření příkazů K-nosiče pro analyzované vzorky klikněte na ikonu **Orders**. Vyberte tlačítko **Sample**, pak klikněte na tlačítko **New** a zadejte číslo příkazu pro vzorek pomocí klávesnice nebo snímače čárového kódu. Zvolte Test Definition (definici testu) pro test HCV, v 2.0 pro analyzátor COBAS® TaqMan®. Opakujte pro každý vzorek. Klikněte na tlačítko **Save**.

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

5. Zadejte informace o kontrole kvality výběrem tlačítka **Quality Control** v okně **Orders**. Klikněte na tlačítko **New** a pomocí klávesnice nebo snímače čárového kódu zadejte informaci z karty kontrolních hodnot testu COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 *Controls Value Card* dodávané se soupravou. Zadejte číslo šarže testu COBAS® TaqMan® HCV, v2.0, datum použitelnosti, rozmezí Low (+) a High (+) kontroly a také kalibrační koeficienty specifické pro šarži v navržených prostorech. Klikněte na „OK.“
6. Přifaďte číslo K-nosiče k danému měření kliknutím na tlačítko **K-Carrier** v okně **Orders**. V okně **K-Carrier** klikněte na **New**. V buňce vpravo od „**K-Carrier ID**“ zadejte číslo K-nosiče z čárového kódu na K-nosiči pomocí klávesnice nebo snímače čárového kódu. Všimněte si, že výsledky z předchozího měření se stejným ID K-nosiče musí být akceptovány. Vyberte definici testu pro test HCV, v 2.0 pro analyzátor COBAS® TaqMan® z panelu testů v dolní části okna.
7. V listu **Worklist** vyberte první řadu ve sloupci Type (T). Označte toto pole, abyste se dostali do stahovacího menu a pak vyberte požadovaný typ kontroly. Pak klikněte dvakrát na pole ID vzorku pro stejnou řadu. Okno **LookUp Control** bude zobrazeno se všemi dostupnými kontrolami. Jakmile je kontrola vybrána, odpovídající kalibrační a kontrolní hodnoty budou zobrazeny v dolním pravém informačním panelu. Opakujte tento proces pro všechny požadované kontroly.
8. Pro zadání vzorků do **Worklist** klikněte dvakrát na první pozici (řadu) pro zadání vzorku. Tím se zobrazí okno **Lookup Sample** obsahující přiřazené příkazy pro vzorek. Použijte klávesy **Shift + šipka** pro označení více než jednoho čísla příkazu. Zkontrolujte, zda definici testu pro test HCV, v 2.0 pro analyzátor COBAS® TaqMan® byla přiřazena všechna pořadí.
9. Klikněte na **Save** pro uložení přiřazení příkazu K-nosiče.

E. Reverzní transkripce, amplifikace a detekce

1. Vyberte ikonu **Systems** v systémové záložce a klikněte na **Open** pro otevření termocykleru. Jakmile se kryt termocykleru zcela otevřel a objeví se nápis „**Ready to Load**“ v okně **Systems**, zvedněte a přidržte víko termocykleru otevřené. Za použití přemístovače K-nosiče přemístěte naplněný K-nosič obsahující uzavřené K-zkumavky s pracovním Master Mix, vzorky a kontrolami do termocykleru. Zavřete víko termocykleru.
2. Potvrďte, že test definující soubor **HCVHP2** je nahráný pro tento běh měření. Klikněte na **Start** v okně **Systems** pod ikonou TC pro uzavření krytu termocykleru a spust'te běh analýzy.
3. Reverzní transkripce, amplifikace a detekci provádí analyzátor COBAS® TaqMan® 48.

VÝSLEDKY

Kalkulace výsledku

Analyzátor COBAS® TaqMan® 48 automaticky stanovuje titr HCV RNA ve vzorcích a kontrolách. Titr HCV RNA je vyjádřen v mezinárodních jednotkách (IU)/ml v souladu s druhým mezinárodním standardem WHO pro HCV RNA NAT testování (NIBSC Code 96/798)¹⁹.

Analyzátor COBAS® TaqMan® 48:

- Stanovuje prahovou hodnotu cyklu (Ct) pro HCV RNA a kvantifikační standard HCV RNA.
- Stanovuje titr HCV RNA na základě hodnot Ct pro HCV RNA a kvantifikační standard HCV RNA a kalibračních koeficientech specifických pro danou šarži.
- Určuje, že vypočtená hodnota titru v IU/ml pro HCV L(+)/C, v2.0 a HCV H(+)/C, v2.0 spadá do vymezeného rozmezí.

Ověření cyklu – AMPLILINK, verze 3.2

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

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

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

Negativní kontrola:

| Příznak | Výsledek | Interpretace |
|---------------|----------|---|
| _N_NC_INVALID | Invalid | Neplatný výsledek nebo „platný“ výsledek, který nebyl negativní pro cílovou HCV |

HCV níže pozitivní kontrola:

| Příznak | Výsledek | Interpretace |
|---------------|--------------------------------|-----------------------------|
| _L_LPCINVALID | < 2.50E+01 IU/mL | Kontrola pod rozsahem testu |
| | Target Not Detected | Kontrola pod rozsahem testu |
| | Numerický titr, X.XXE+XX IU/mL | Kontrola mimo rozsah testu |
| | > 3.91E+08 IU/mL | Kontrola nad rozsahem testu |
| | Invalid | Neplatný výsledek |

HCV vysoce pozitivní kontrola:

| Příznak | Výsledek | Interpretace |
|---------------|--------------------------------|-----------------------------|
| _H_HPCINVALID | < 2.50E+01 IU/mL | Kontrola pod rozsahem testu |
| | Target Not Detected | Kontrola pod rozsahem testu |
| | Numerický titr, X.XXE+XX IU/mL | Kontrola mimo rozsah testu |
| | > 3.91E+08 IU/mL | Kontrola nad rozsahem testu |
| | Invalid | Neplatný výsledek |

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

Ověření cyklu – AMPLILINK, verze 3.3

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

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

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

Negativní kontrola:

| Příznak | Výsledek | Interpretace |
|------------|----------|--|
| NC_INVALID | Invalid | Neplatný výsledek nebo „platný“, výsledek, který nebyl negativní pro cílovou HCV |

HCV níže pozitivní kontrola:

| Příznak | Výsledek | Interpretace |
|------------|----------|---|
| LPCINVALID | Invalid | Neplatný výsledek nebo kontrola mimo rozsah |

HCV vysoce pozitivní kontrola:

| Příznak | Výsledek | Interpretace |
|------------|----------|---|
| HPCINVALID | Invalid | Neplatný výsledek nebo kontrola mimo rozsah |

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

Interpretace výsledků:

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

Platné měření může zahrnovat platné i neplatné výsledky vzorků podle toho, zda se u jednotlivých vzorků objeví příznaky resp. poznámky nebo ne.

Výsledky vzorků jsou interpretovány následujícím způsobem:

| Výsledek titru | Interpretace |
|-------------------------------------|---|
| Target Not Detected | Ct hodnota pro HCV je nad hranici testu nebo nebyla získána žádná Ct hodnota pro HCV. Výsledky nahlaste jako „HCV RNA nedetekována“. |
| < 2.50E+01 IU/mL | Vypočtená hodnota IU/ml je pod detekční hranici testu. Nahlaste výsledky jako „HCV RNA detekována, méně než 25 HCV RNA IU/ml“. |
| ≥ 2.50E+01 IU/mL a ≤ 3.91E+08 IU/mL | Vypočítané výsledky větší než nebo rovny 25 IU/ml a menší než nebo rovny 3,91E+08 IU/ml jsou v lineárním rozmezí analýzy. |
| > 3.91E+08 IU/mL | Vypočtená hodnota IU/ml leží nad lineárním rozmezím testu. Nahlaste výsledky jako „vyšší než 3,91E+08 HCV RNA IU/ml“. Jsou-li žádané kvantitativní výsledky, měl by být originální vzorek rozředěn HCV-negativní lidskou plazmou nebo sérum v závislosti na matrix originálního vzorku a test by měl být zopakován. Vynásobte uvedený výsledek dilučním faktorem. |

Pozn.: Vzorky nad rozsahem testu, které vykazují neplatný výsledek s příznakem „QS_INVALID“, nesmí být vykázány jako > 3.91E+08 IU/mL. Originální vzorek je nutné rozředit HCV-negativní lidskou plazmou nebo sérum, v závislosti na matrix originálního vzorku a test je nutné zopakovat. Vynásobte uvedený výsledek faktorem ředění.

KONTROLA KVALITY

Jeden replikát negativní kontroly COBAS® TaqMan®, COBAS® TaqMan® HCV níže (+) kontroly, v2.0 a COBAS® TaqMan® HCV vysoce (+) kontroly, v2.0 musí být zahrnuty do každého běhu testu s až 24 vzorky a kontrolami. 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 dokážou test provádět s vysokou jistotou správně. Neexistují požadavky týkající se pozice pozitivních kontrol na K-nosiči. Zkontrolujte, zda výtisk cyklu neobsahuje značky a poznámky a zda byl cyklus platný.

Negativní kontrola

CTM (-) C musí vést k výsledku „Target Not Detected“, tzn. že Ct hodnota pro HCV RNA byla nad hranici testu nebo žádná Ct hodnota pro HCV RNA nebyla získána, ale platná Ct hodnota byla získána pro kvantifikační standard HCV RNA. Pokud **CTM (-) C** toto kritérium nespĺňuje, je celé měření neplatné. Celý postup zopakujte (příprava vzorků a kontrol, amplifikace a detekce). Pokud je **CTM (-) C** trvale neplatná, kontaktujte vaši místní kancelář Roche pro technickou pomoc.

Pozitivní kontroly

Přifažené rozmezí pro **HCV L(+)**C, v2.0 a **HCV H(+)**C, v2.0 je uvedeno na *kartě testu COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 Controls Value Card* dodávané se soupravou. Tyto rozsahy se vloží do Datové stanice pro software AMPLILINK.

Množství HCV RNA IU/ml pro **HCV L(+)**C, v2.0 a **HCV H(+)**C, v2.0 musí spadat do rozmezí uvedeného na *kartě testu COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 Controls Value Card* dodávané se soupravou. Jestliže jedna nebo obě pozitivní kontroly nespĺňují toto kritérium, je celé měření neplatné. Celý postup zopakujte (příprava vzorků a kontrol, amplifikace a detekce). Jestliže vypočtený titr HCV RNA pro jednu nebo obě pozitivní kontroly je trvale mimo přifažené rozmezí, obraťte se o technickou pomoc na místní zastoupení firmy Roche.

BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ PŘI PRÁCI

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

PROCEDURÁLNÍ OMEZENÍ

1. Rozmezí přiřazené kalibračním koeficientům jsou specifické pro šarži a specifické pro test COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 pro použití se systémem High Pure. Tyto hodnoty nemusí být platné při použití s alternativními metodami přípravy vzorku.
2. Tento test je validován pro používání s lidským sérem nebo plazmou odebranou do EDTA jako antikoagulantu. Pokud by byly testovány jiné typy vzorků, mohly by být výsledky nesprávné, falešně negativní nebo falešně pozitivní.
3. 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.
4. 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.
5. K získání spolehlivých výsledků je třeba dodržovat patřičné postupy odběru, transportu, skladování a zpracování vzorků.
6. Díky přítomnosti enzymu AmpErase v Master Mixu pro COBAS® TaqMan® HCV se snižuje riziko kontaminace amplikonu. 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.
7. S produktem by měli pracovat pouze pracovníci znalí technik PCR.
8. Tento produkt se může používat pouze ve spojení s analyzátozem COBAS® TaqMan® 48.
9. 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.

INTERFERUJÍCÍ SUBSTANCE

Zvýšené hladiny albuminu (až 7000 mg/dl), celkový bilirubin (až 24,1 mg/dl), hemoglobin (až 540 mg/dl), triglyceridy (až 1432 mg/dl) a klinické vzorky od pacientů se systémovým lupus erythematoses (až 780 IU/ml anti-dsDNA protilátek) a revmatoidní artritidou (až 660 IU/ml RF) u EDTA plazmy i séra nevykázaly interferenci s kvantifikací HCV RNA v tomto testu.

Následující lékové součásti v 3-násobných koncentracích jejich odpovídajících C_{max} hodnot (vrcholové plazmatické koncentrace) v EDTA plazmě a séru nevykázaly žádnou interferenci s kvantifikací HCV RNA tímto testem.

| | | |
|--|---|--|
| Nukleotidový inhibitor HIV reverzní transkriptázy Tenofovir disoproxil fumarát | Nukleozidové inhibitory reverzní transkriptázy a DNA polymerázy Lamivudin Zidovudin Zalcitabin Stavudin Ribavirin Abacavir sulfát Didanosin | Inhibitory HIV proteázy Indinavir sulfát Ritonavir Nelfinavir mesylát Saquinavir Amprenavir Lopinavir/Ritonavir |
| Inhibitory HIV fúze Enfuvirtid | | |
| Nenukleozidové inhibitory HIV reverzní transkriptázy Nevirapin Efavirenz | Imunomodulátory PEG interferon alfa-2a Interferon alfa-2b Interferon alfa-2a | Antidepresiva Paroxetin HCl Fluoxetin HCl Sertralin HCl |

VYHODNOCENÍ LABORATORNÍCH VÝSLEDKŮ

A. Mez detekce

Mez detekce testu COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 pro použití se systémem High Pure byla stanovena analýzou sérií ředění sekundárního standardu HCV (šarže GTR015) a klinického vzorku genotypu 4 HCV v HCV-negativní lidské plazmě s EDTA a HCV negativním lidském séru. Sekundární standard HCV (šarže GTR015) byl připraven pomocí klinického vzorku genotypu 1a HCV kalibrovaném na sekundární WHO mezinárodní standard pro analýzy HCV RNA NAT (NIBSC kód 96/798)¹⁹ získané od NIBSC. Koncentrace HCV genotypu 4 ve vzorku byla stanovena testem COBAS® AMPLICOR® HCV MONITOR, v2.0. Pro každý ze tří unikátních kombinací šarží testů COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 a soupravy systému High Pure Viral Nucleic Acid, minimálně 8 nezávislých sérií ředění bylo analyzováno pro každou matrix. Minimální počet 48 replikátů na koncentraci bylo testováno s každou kombinací šarží soupravy pro celkový minimální počet 148 replikátů na koncentraci v každé matrix (EDTA plazma a sérum).

Výsledky z této studie v tabulce 2 a 3 ukazují, že koncentrace HCV RNA genotypu 1, která může být detekována testem COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 s 95 % mírou pozitivivity při analýze pomocí metody Probit, je 9,3 IU/ml (95 % CI 6,1; 24,2) v EDTA plazmě a 8,8 IU/ml (95 % CI 7,5; 11,1) v séru. Data z každé ze tří unikátních kombinací šarží jsou uvedena v tabulce 2 a 3.

Tabulka 2
Detekční mez pro HCV genotyp 1 testu COBAS® TaqMan® HCV, v2.0
pro použití se systémem High Pure v EDTA plazmě

| Sarže soupravy COBAS® TaqMan® | G10020 | G11233 | G11225 | Všechny 3 sarže v kombinaci |
|--|-------------------|------------------|------------------|--------------------------------|
| Sarže soupravy High Pure | 17310600 | 12317800 | 17390400 | |
| 34 IU/ml | 100 % | 100 % | 100 % | 100,0 % |
| 23 IU/ml | 100 % | 100 % | 100 % | 100,0 % |
| 17 IU/ml | 100 % | 100 % | 100 % | 100,0 % |
| 11 IU/ml | 88,2 % | 94,0 % | 94,1 % | 92,1 % |
| 5,6 IU/ml | 92,2 % | 86,3 % | 88,2 % | 88,9 % |
| 2,8 IU/ml | 74,0 % | 76,5 % | 71,0 % | 74,8 % |
| 95 % míra pozitivity dle analýzy Probit | 10,0 IU/ml | 9,0 IU/ml | 8,8 IU/ml | 9,3 IU/ml |
| 95 % interval spolehlivosti (CI) | (5,0–2107,0) | (6,7–14,6) | (6,6–14,0) | (6,1–24,2) |

Tabulka 3
Detekční mez pro HCV genotyp 1 testu COBAS® TaqMan® HCV, v2.0
pro použití se systémem High Pure v séru

| Sarže soupravy COBAS® TaqMan® | G10020 | G11233 | G11225 | Všechny 3 sarže v kombinaci |
|--|-------------------|------------------|------------------|--------------------------------|
| Sarže soupravy High Pure | 17310600 | 12317800 | 17390400 | |
| 34 IU/ml | 100 % | 100 % | 100 % | 100,0 % |
| 23 IU/ml | 100 % | 100 % | 97,9 % | 99,3 % |
| 17 IU/ml | 98,0 % | 100 % | 97,9 % | 98,7 % |
| 11 IU/ml | 94,1 % | 100 % | 97,9 % | 97,3 % |
| 5,6 IU/ml | 82,4 % | 92,2 % | 89,6 % | 88,0 % |
| 2,8 IU/ml | 62,7 % | 68,6 % | 79,2 % | 70,0 % |
| 95 % míra pozitivity dle analýzy Probit | 10,8 IU/ml | 6,0 IU/ml | 9,0 IU/ml | 8,8 IU/ml |
| 95 % interval spolehlivosti (CI) | (8,3–16,3) | (4,8–9,6) | (6,3–16,0) | (7,5–11,1) |

Výsledky pro HCV genotyp 4 v tabulce 4 ukazují, že koncentrace HCV RNA genotypu 4, která může být detekována testem COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 s 95 % mírou pozitivity při analýze pomocí metody Probit, je 16,1 IU/ml (95 % CI 12,2; 25,1) v EDTA plazmě a 25,4 IU/ml (95 % CI 21,5; 31,2) v séru.

Tabulka 4
Detekční mez pro HCV genotyp 4 testu COBAS® TaqMan® HCV, v2.0
pro použití se systémem High Pure v EDTA plazmě a séru

| Vzorek matrix | Plazma s EDTA | Sérum |
|---|------------------------------------|------------------------------------|
| Koncentrace | Všechny 3 šarže v kombinaci | Všechny 3 šarže v kombinaci |
| 30 IU/ml | 100,0 % | 96,6 % |
| 20 IU/ml | 95,3 % | 90,6 % |
| 15 IU/ml | 96,7 % | 88,7 % |
| 10 IU/ml | 86,2 % | 79,7 % |
| 5 IU/ml | 60,0 % | 47,3 % |
| 2,5 IU/ml | 41,2 % | 29,5 % |
| 95 % míra pozitivity dle analýzy Probit | 16,1 IU/ml | 25,4 IU/ml |
| 95 % interval spolehlivosti (CI) | (12,2–25,1) | (21,5–31,2) |

B. Přesnost

Přesnost mezi šaržemi, mezi zařízeními, mezi obsluhami, mezi testy, v rámci testu a celková přesnost byly hodnoceny pomocí HCV panelů odvozených z klinického vzorku genotypu 1 u EDTA plazmy a séra. Tabulky 5 a 6 ukazují %CV každé komponenty varianční analýzy a celkový %CV pro HCV genotyp 1.

Tabulka 5
Přesnost HCV genotypu 1 testu COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 v EDTA plazmě

| Komponenta rozptylu | Koncentrace HCV genotypu 1 (IU/ml) | | | | | |
|--|------------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | 4,44E+06 | 4,44E+05 | 4,44E+04 | 4,44E+03 | 4,44E+02 | 4,44E+01 |
| Mezi šaržemi | 4,8 % | 0,0 % | 0,0 % | 0,0 % | 0,0 % | 15,4 % |
| Mezi zařízeními | 0,0 % | 0,0 % | 0,0 % | 0,0 % | 0,0 % | 1,3 % |
| Mezi obsluhami | 18,4 % | 17,7 % | 18,7 % | 16,8 % | 14,8 % | 12,7 % |
| Mezi testy | 18,6 % | 20,7 % | 17,1 % | 12,7 % | 23,0 % | 9,8 % |
| V rámci testu | 18,8 % | 17,6 % | 20,0 % | 24,4 % | 17,2 % | 28,0 % |
| Celkový variační koeficient (%) | 32,6 % | 32,5 % | 32,3 % | 32,2 % | 32,3 % | 35,8 % |
| n | 48 | 48 | 48 | 48 | 48 | 48 |

Tabulka 6
Přesnost HCV genotypu 1 testu COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 v séru

| Komponenta rozptylu | Koncentrace HCV genotypu 1 (IU/ml) | | | | | | |
|--|------------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | 1,17E+06 | 1,31E+05 | 1,31E+04 | 1,31E+03 | 1,31E+02 | 6,56E+01 | 3,28E+01 |
| Mezi šaržemi | 2,7 % | 0,0 % | 12,3 % | 13,9 % | 11,1 % | 0,0 % | 10,4 % |
| Mezi zařízeními | 0,0 % | 0,0 % | 0,0 % | 0,0 % | 0,0 % | 0,0 % | 0,0 % |
| Mezi obsluhami | 12,0 % | 12,8 % | 0,0 % | 0,0 % | 6,6 % | 0,0 % | 9,7 % |
| Mezi testy | 16,5 % | 17,5 % | 16,2 % | 16,5 % | 16,9 % | 32,9 % | 31,2 % |
| V rámci testu | 15,2 % | 13,9 % | 18,9 % | 12,9 % | 24,3 % | 36,5 % | 46,1 % |
| Celkový variační koeficient (%) | 25,6 % | 25,8 % | 27,7 % | 25,1 % | 32,3 % | 49,1 % | 57,5 % |
| n | 72 | 72 | 72 | 72 | 72 | 72 | 72 |

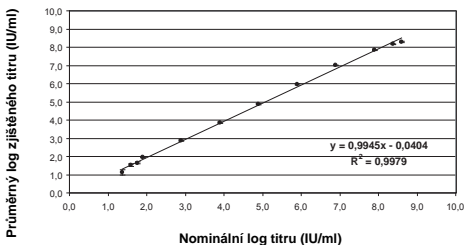
Studie přesnosti pro HCV genotyp 4 byly také provedeny pomocí HCV panelů odvozených z klinického vzorku genotypu 4 v EDTA plazmě i séru s HCV titry v rozmezí od 5,87E+01 IU/ml do 1,17E+04 IU/ml. Celkový %CV pro HCV genotyp 4 se pohyboval v rozmezí od 33,3 % do 35,1 %.

C. Lineární rozmezí

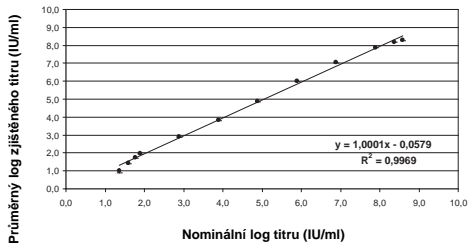
Dva panely linearity skládající se z 15 členů Armored HCV RNA v EDTA plazmě nebo séru byly testovány pomocí tří unikátních kombinací šarží testu COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 a soupravy High Pure System Viral Nucleic Acid. 15 členů panelů pokrývalo rozmezí od 7,83E+00 HCV RNA IU/ml do 7,83E+08 HCV RNA IU/ml na základě zdrojového materiálu, jehož titr byl stanoven srovnáním sekundárního standardu HCV (šarže GTR015), připraveného pomocí klinického vzorku genotypu 1a HCV kalibrovaného proti druhému mezinárodnímu standardu WHO pro testy HCV RNA NAT (NIBSC kód 96/798)¹⁹. Dvanáct replikátů na hladinu pro každou ze tří kombinací šarží bylo testováno pro celkové 36 replikátů na hladinu.

Linearita byla prokázána od 2,35E+01 HCV RNA IU/ml do 3,91E+08 HCV RNA IU/ml podle pokynu CLSI EP6-A s akceptačním kritériem $\pm 0,2 \log_{10}$. Jak ukazují obrázky 8 a 9 využívající panely Armored HCV RNA, výsledky testu COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 pro použití se systémem High Pure byly přesné v rozmezí 0,3 \log_{10} nominálních hodnot v rámci lineárního rozmezí 2,5E+01 HCV RNA IU/ml až 3,91E+08 HCV RNA IU/ml v EDTA plazmě a séru.

Obrázek 8
Lineární rozmezí testu COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 pro použití se systémem High Pure v EDTA plazmě



Obrázek 9
Lineární rozmezí testu COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 pro použití se systémem High Pure v séru



D. Genotypová inkluzivita

Kvantifikace klinických vzorků

Šedesát HCV-pozitivních klinických vzorků zastupujících genotypy (1, 2a, 2, 3, 4, 5 a 6) v různých maticích zahrnujících EDTA plazmu a sérum bylo testováno v trojnásobku pomocí testu COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 pro použití se systémem High Pure (HCVHPSV2) a testem COBAS® AMPLICOR® HCV MONITOR, v2.0 (CAHCM).

Další HCV genotypové vzorky byly připraveny rozředěním dvaceti čtyř výše uvedených šedesáti vzorků v HCV negativní EDTA plazmě a dvaceti dvou z výše uvedených šedesáti vzorků v HCV negativním séru.

Průměrný rozdíl mezi log titry HCVHPSV2 a CAHCM pro každý genotyp byl $\leq 0,23$ log pro všechny testované klinické vzorky, jak ukazuje tabulka 7 dole.

Tabulka 7
Průměrný rozdíl v log titru mezi HCVHPSV2 a CAHCM pro každý genotyp HCV

| HCV genotyp | HCVHPSV2 – CAHCM | n |
|----------------------|------------------|-----|
| 1 | -0,12 | 25 |
| 2a | -0,21 | 7 |
| 2 | -0,04 | 14 |
| 3 | 0,23 | 22 |
| 4 | -0,07 | 16 |
| 5 | -0,03 | 9 |
| 6 | -0,15 | 13 |
| Všechny HCV genotypy | -0,03 | 106 |

Kvantifikace – NIBSC panel

Panel HCV genotypů z NIBSC (kód 02/202) byl hodnocen pomocí testu COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 pro použití se systémem High Pure. Jak ukazuje tabulka 8, všech 6 vzorků HCV genotypu v panelu NIBSC poskytlo hodnoty, které byly v rozmezí 0,25 log nominální hodnoty.

Tabulka 8
Rozdíl mezi pozorovanými a očekávanými log titry pro panel NIBSC pro HCV genotypy 1 až 6

| HCV genotyp | Log IU/ml | | Pozorovaný – očekávaný |
|-------------|-----------|------------|------------------------|
| | Očekávaný | Pozorovaný | |
| 1 | 3,00 | 2,76 | -0,24 |
| 2 | 3,00 | 3,15 | 0,15 |
| 3 | 3,00 | 3,01 | 0,01 |
| 4 | 3,00 | 2,78 | -0,22 |
| 5 | 3,00 | 3,00 | 0,00 |
| 6 | 3,00 | 3,15 | 0,15 |

Detekce genotypu HCV

Detekce všech HCV genotypů byla stanovena analýzou sérií ředění sekundárního standardu HCV (šarže 0002, genotyp 1a) a dostupná charakteristikou klinických vzorků HCV zastupujících genotypy (2a, 2b, 3, 4, 5 a 6) v HCV negativní lidské EDTA plazmě a séru. Koncentrace zdrojových materiálů pro série ředění HCV genotypů 2a, 2b, 3, 4, 5 a 6 byly stanoveny pomocí testu COBAS® AMPLICOR® HCV MONITOR, v2.0. Pro každou ze dvou různých šarží souprav testu COBAS® TaqMan® HCV, v2.0, byly testovány minimálně 3 nezávislé série ředění pro každou matrix a genotyp. Minimální počet 12 replikátů na koncentraci bylo testováno s každou šarží soupravy testu COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 na celkový počet 24 replikátů na koncentraci.

Výsledky v tabulce 9 ukazují, že HCV genotypy 1 až 6 v EDTA plazmě a séru byly detekovány na úrovních minimálně 6,3 IU/ml až 19,4 IU/ml.

Tabulka 9
Detekce HCV genotypů 1 až 6 v EDTA plazmě a séru

| HCV genotyp | 95 % detekce pomocí PROBIT (IU/ml) | | Skutečná pozorovaná nejnižší hladina s minimální 95 % Míra pozitivity | |
|-------------|------------------------------------|-------|---|-------|
| | Plazma s EDTA | Sérum | Plazma s EDTA | Sérum |
| 1 | 16,7 | 11,3 | 20 | 20 |
| 2a | 11,8 | 19,4 | 20 | 20 |
| 2b | 9,6 | 11,0 | 20 | 10 |
| 3 | 6,3 | 11,1 | 10 | 10 |
| 4 | 14,9 | 13,5 | 20 | 20 |
| 5 | 14,3 | 13,4 | 10 | 20 |
| 6 | 7,0 | 10,7 | 10 | 10 |

E. Klinická specificita

Klinická specificita testu COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 pro použití se systémem High Pure (HCVHPSV2) byla stanovena analýzou 50 vzorků HCV séronegativní EDTA plazmy a 50 vzorků HCV séronegativního séra každou ze 2 různých šarží soupravy COBAS® TaqMan® HCV, v2.0. Všech 200 výsledků testu bylo negativních na HCV RNA. Na základě těchto výsledků je klinická specificita HCVHPSV2 rovna 100 %.

F. Analytická specificita

Analytická specificita byla hodnocena přidáním mikroorganismů do HCV negativní lidské EDTA plazmy a séra. Dvanáct non-HCV členů *Flaviviridae* a dvacet dva dalších mikroorganismů bylo testováno na možnou zkříženou reaktivitu pomocí testu COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 pro použití se systémem High Pure. Žádný z non-HCV RNA nebo DNA mikroorganismů v testu nebyl pozitivní na HCV RNA. Seznam testovaných mikroorganismů je uveden v tabulce 10.

Tabulka 10
Analytická specificita vzorků

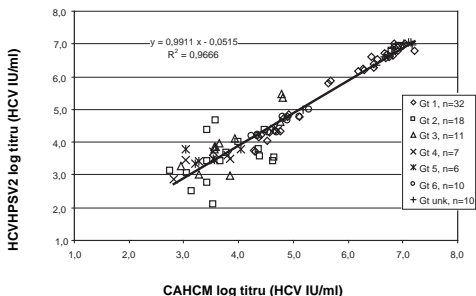
| Mikroorganismy testované pro analytickou specificitu v EDTA plazmě a séru | | |
|---|---|------------------------------------|
| Virus Západního Nilu | Virus hepatitidy G | Virus hepatitidy B genotypy A a B |
| Virus St. Louiské encefalitidy | <i>Staphylococcus aureus</i> a <i>epidermidis</i> | Lidský papilloma virus 11, 18 a 6B |
| Virus Dengue typy 1, 2, 3 a 4 | Epstein-Barr Virus | <i>Varicella zoster</i> |
| Virus žluté zimnice | <i>Propionibacterium acnes</i> | <i>Candida albicans</i> |
| Zika virus | Lidský adenovirus typ 3 | HTLV I / II |
| Banži virus | Cytomegalovirus Davis a Cytomegalovirus Towne | Influenza B |
| Ilheus virus | Herpes simplex virus typ 1, MacIntyre typ 2,G | <i>Mycobacterium avium</i> |
| Virus encefalitidy Murray Valley | Virus hepatitidy A | HIV |

G. Výkonnost srovnaná s testem COBAS® AMPLICOR® HCV MONITOR, v2.0 a testem COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV

Čtyřicet sedm klinických vzorků HCV pozitivní EDTA plazmy a čtyřicet sedm klinických vzorků HCV pozitivního séra bylo testováno samostatně testem COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 pro použití se systémem High Pure (HCVHPSV2) a testem COBAS® AMPLICOR® HCV MONITOR, v2.0 (CAHCM). Padesát klinických vzorků HCV pozitivní EDTA plazmy a padesát klinických vzorků HCV pozitivního séra bylo testováno samostatně testem COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 pro použití se systémem High Pure (HCVHPSV2) a testem COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV (CAPCTM). Výsledky log titru HCV RNA pomocí HCVHPSV2, CAHCM a CAPCTM všech vzorků, seskupených dle genotypu, jsou zaznamenány na obrázcích 10 a 11 pro CAHCM proti HCVHPSV2, resp. CAPCTM proti HCVHPSV2.

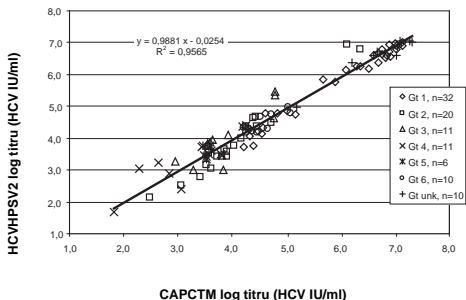
Obrázek 10

Korelace testu COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 pro použití se systémem High Pure (HCVHPSV2) a testu COBAS® AMPLICOR® HCV MONITOR, v2.0 (CAHCM)



Obrázek 11

Korelace testu COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 pro použití se systémem High Pure (HCVHPSV2) a testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV (CAPCTM)



LITERATURA

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. Lauer, G.M. and Walker, B.D. 2001. Hepatitis C Virus Infection. *New England Journal of Medicine* **345**:41-52.
5. World Health Organization, *Weekly Epidemiological Record*, 1999. **74**:421-428.
6. Kessler, H.H., Santner, B.I., Umlauf, 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
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., 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.
14. Meng Q, Wong C, Rangachari A, Tamatsukuri S, Sasaki M, Fiss E, Cheng L, Ramankutty T, Clarke D, Yawata H, Sakakura Y, Hirose T, Impraim C. 2001. Automated multiplex assay system for simultaneous detection of hepatitis B virus DNA, hepatitis C virus RNA, and human immunodeficiency virus type 1 RNA. *J Clin Microbiol* **8**:2937-45.
15. 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.
16. Longo, M.C., Berninger, M.S. and Hartley, J.L. 1990. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* **93**:125-128.
17. Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., and Griffith, R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Bio/Technology* **10**:413-417.
18. Heid, C.A., Stevens, J., Livak, J.K., and Williams, P.M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Research* **6**:986-994.
19. Saldanha, J., Heath, A., Aberham, C., Albrech, J., Gentili, G., Gessner, M. and Pisani, G. 2005. World Health Organization collaborative study to establish a replacement WHO international standard for hepatitis C virus RNA nucleic acid amplification technology assays. *Vox Sanguinis* **88**:202-204.

20. Richmond, J.Y. and McKinney, R.W. eds. 1999. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*. HHS Publication Number (CDC) 93-8395.
21. 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.
22. International Air Transport Association. *Dangerous Goods Regulations*, 41.st Edition. 2000. 704 pp.

Informace k revizi dokumentu

Doc Rev. 5.0
2/2010

Kapitola **ČINIDLA** byla aktualizována a obsahuje nyní varování pro konzervant ProClin® 300.

Na konec tohoto příbalového letáku byly přidány informace o symbolech IVDD dříve obsažené na kartě přibalené k soupravě.

Pokud máte jakékoliv dotazy, kontaktujte prosím místního zástupce společnosti Roche.

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



Test COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 vyroben:
Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ, 08876 USA
Člen Roche Group



Distributed by

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

Roche Diagnostics
2, Avenue du Vercors
38240 Meylan, France

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Straße 116
68305 Mannheim, Germany

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

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

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

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

ROCHE, AMPLICOR, AMPERASE, AMPLILINK, AMPLIPREP, COBAS, TAQMAN a HIGH PURE jsou obchodní značky 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 and Cenetron.

PROCLIN je obchodní známka společnosti Rohm and Haas Company.

BD SST je obchodní známka společnosti Becton Dickinson and Co.

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

Copyright 2010 Roche Molecular Systems, Inc. Všechna práva vyhrazena.

2/2010

(04873505001-05ENGL)

04873505041-05

Doc Rev. 5.0



Roche Diagnostics GmbH
D-68298 Mannheim

