



LINEAR ARRAY Hepatitis C Virus Genotyping Test

k použití se soupravou AMPLICOR® a COBAS AMPLICOR HCV Test, verze 2.0

PRO DIAGNOSTICKÉ POUŽITÍ *IN VITRO*.

HCV LINEAR ARRAY Genotyping Test	LA HCV GT	48 Tests	P/N: 04391837 190
LINEAR ARRAY Detection Kit	LA DK	96 Tests	P/N: 03378179 190
24-Well Tray with Lid		1 Each	P/N: 03140725 001

Pro uživatele soupravy AMPLICOR HCV Test, verze 2.0

AMPLICOR HCV Specimen Preparation Kit, version 2.0	HCV PREP	96 Tests	P/N: 21111086 123 ART: 11 1108 6 US: 83126
AMPLICOR HCV Controls Kit, version 2.0	HCV CTL	8 Sets	P/N: 21111175 123 ART: 11 1117 5 US: 83131
AMPLICOR HCV Amplification Kit, version 2.0	HCV AMP	96 Tests	P/N: 21111094 123 ART: 11 1109 4 US: 83127
AMPLICOR HCV Detection Kit, version 2.0	HCV MWP DK	96 Tests	P/N: 21111108 123 ART: 11 1110 8 US: 83128
AMPLICOR Internal Control Detection Kit	IC MWP DK	96 Tests	P/N: 20763306 122 ART: 07 6330 6 US: 83324

Pro uživatele soupravy COBAS AMPLICOR HCV Test, verze 2.0

AMPLICOR HCV Specimen Preparation Kit, version 2.0	HCV PREP	96 Tests	P/N: 21111086 123 ART: 11 1108 6 US: 83126
AMPLICOR HCV Controls Kit, version 2.0	HCV CTL	8 Sets	P/N: 21111175 123 ART: 11 1117 5 US: 83131
AMPLICOR HCV Amplification Kit, version 2.0	HCV AMP	96 Tests	P/N: 21111094 123 ART: 11 1109 4 US: 83127
COBAS AMPLICOR HCV Detection Kit, version 2.0	HCV DK	100 Tests	P/N: 21111132 123 ART: 11 1113 2 US: 83130
COBAS AMPLICOR Detection Reagents Kit	DK	100 Tests	P/N: 20757470 122 ART: 07 5747 0 US: 83276
COBAS AMPLICOR Conjugate Detection Reagent	CN4	200 Tests	P/N: 20764213 123 ART: 07 6421 3 US: 83305
COBAS AMPLICOR Wash Buffer	WB	500 Tests	P/N: 20759899 123 ART: 07 5989 9 US: 83314
COBAS AMPLICOR Internal Control Detection Kit	IC DK	100 Tests	P/N: 20757608 122 ART: 07 5760 8 US: 83281

POUŽITÍ

Genotypizační test na HCV LINEAR ARRAY je test *in vitro* pro stanovení genotypu GT1-GT6 viru hepatitidy C (HCV) u pacientů s potvrzenou pozitivitou na chronickou infekci virem HCV.

Genotypizační test na HCV LINEAR ARRAY se používá při léčbě infekce virem HCV. Není určen k plošnému vyšetřování krve či krevních derivátů na přítomnost viru HCV, ani jako diagnostický test k potvrzení infekce tímto virem.

SOUHRN A PRINCIP TESTU

Virus hepatitidy C (HCV) je považován za hlavního původce způsobujícího 90-95% případů onemocnění hepatitidou, která není vyvolána virem typu A nebo B, po krevní transfuzi^{1,2}. HCV je virus s jednořetězcovou pozitivně orientovanou RNA s genomem obsahujícím zhruba 10 000 nukleotidů kódujících 3 000 aminokyselin. HCV se vyskytuje v krvi, a proto se může krví a krevními deriváty přenášet. Rozsáhlým plošným vyšetřováním krve na přítomnost viru HCV se nebezpečí onemocnění hepatitidou z krevní transfuze výrazně snížilo. Infekce virem HCV se šíří nejvíce v souvislosti s nitrožilním zneužíváním drog a v menší míře i z podkožních injekcí². Celosvětově se výskyt infekce HCV, stanovené imunoserologickými testy, pohybuje v rozmezí od 0,6% v Kanadě až po 1,5% v Japonsku¹.

Dosud bylo zjištěno šest hlavních genotypů hepatitidy C, označovaných jako genotypy 1, 2, 3, 4, 5 a 6. V Severní a Jižní Americe, Evropě a v Japonsku mají přes 90% případů infekce virem HCV na svědomí genotypy 1, 2 a 3. Z řady studií vyplynulo, že genotyp HCV má vliv na reakci na léčbu jak při monoterapii (samotný interferon alfa), tak při terapii kombinované (interferon alfa s ribavirinem).^{3,4} Obecně se infekce genotypem 1 léčí obtížněji než infekce genotypem 2 nebo 3. Mimoto může HCV genotypu 1 postihovat závažněji játra než ostatní genotypy HCV⁵. Proto se musí při předléčebním hodnocení chronicky infikovaných pacientů brát v úvahu i příslušný genotyp HCV.

PRACOVNÍ POSTUP

Genotypizační test na HCV LINEAR ARRAY je test *in vitro* pro stanovení genotypu viru hepatitidy C. Test využívá reverzní transkripci cílové RNA na komplementární DNA (cDNA), amplifikaci této cDNA pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) a hybridizaci nukleových kyselin ke stanovení genotypu RNA HCV v lidském séru nebo v plazmě s EDTA.

Genotypizační test na HCV LINEAR ARRAY je založen na pěti základních procesech: příprava vzorku, reverzní transkripce příslušné RNA na komplementární DNA (cDNA)⁶; PCR amplifikace⁶ této cDNA pomocí HCV-specifických komplementárních primerů, hybridizace amplifikovaných produktů na specifické oligonukleotidové sondy a kolorimetrická detekce sondou vázaných amplifikovaných produktů.

Příprava a amplifikace vzorku, ke které dochází za použití testu AMPLICOR nebo COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0, umožňuje současnou reverzní transkripci a PCR amplifikaci RNA terčové HCV i HCV Internal Control. Činidlo Master Mix obsahuje pár primerů specifických pro RNA jak HCV, tak vnitřní kontroly HCV. Detekce a určení genotypu se provádí za použití zbývající denaturované amplifikované DNA, která se nevyužívá ke kvantitativnímu stanovení HCV v testu AMPLICOR nebo COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0. Detekce amplifikované DNA se provádí za použití souboru genotypově specifických oligonukleotidových sond, jež umožňují nezávislou identifikaci genotypů HCV.

Příprava vzorků

RNA HCV se ze séra nebo z plazmy s EDTA izoluje rozštěpením částic virů chaotropním činidlem a následným vysrážením RNA alkoholem. RNA se resuspenduje v ředidle vzorku.

Reverzní transkripce a amplifikace PCR

Volba terčové sekvence

Výběr terčové sekvence RNA pro HCV závisí na identifikaci oblastí v genomu HCV, které vykazují maximální zachování sekvencí mezi jednotlivými genotypy HCV^{7,8,9}. Bylo zjištěno, že mezi známými genotypy HCV se sekvence RNA v nejvyšší míře zachovává v 5'-UTR (untranslated region) oblasti genomu HCV^{10,11}. V testech AMPLICOR a COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0 se k definování sekvence, která se má v rámci vysoce zachovalého 5'-UTR genomu HCV¹² amplifikovat, používají primery. Sekvence sondy a sekvence primeru pro AMPLICOR a COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0 se nacházejí v nejvíce zachovalých doménách oblasti 5'-UTR¹⁰. Sondy pro genotypizační test na HCV LINEAR ARRAY se nacházejí v méně zachovalých doménách 5'-UTR.

Reverzní transkripce

Reverzní transkripce a amplifikační reakce probíhají za účasti termostabilního rekombinantního enzymu *Thermus thermophilus* DNA polymeráza (*rTh* pol). Za přítomnosti dvojmocného manganu (Mn^{2+}) a za příznivých pufovacích podmínek vykazuje *rTh* pol aktivitu jak reverzní transkriptázy, tak DNA polymerázy⁶. Díky tomu může reverzní transkripce a PCR amplifikace probíhat v téže reakční směsi.

Zpracovávané vzorky se přidávají do amplifikační směsi v amplifikačních zkumavkách, v nichž probíhá jak reverzní transkripce, tak PCR amplifikace. Reakční směs se v tepelném cykлизátoru zahřívá, přičemž dochází ke specifickému napojování downstream primeru na RNA terčového HCV. Za přítomnosti Mn^{2+} a nadbytku deoxynukleosid-trifosfátů

(dNTPs), včetně trifosfátů deoxyadenosinu, deoxyguanosinu, deoxycytidinu a deoxyuridinu (namísto thymidinu), prodlužuje *rTth* pol napojené primery, čímž se vytváří cDNA.

Amplifikace terče

Po reverzní transkripci RNA terčové HCV se reakční směs zahřeje, aby se RNA:cDNA hybrid denaturoval a exponovaly se primerové terčové sekvence. Během ochlazování směsi se upstream primer připojuje specificky k řetězci cDNA, *rTth* pol primer prodlužuje a syntetizuje se druhý řetězec DNA. Tím se ukončuje první cyklus PCR, který poskytuje dvouřetězcovou DNA kopii terčové oblasti RNA HCV a HCV.

Reakční směs se opět zahřeje k oddělení výsledné dvouřetězcové DNA a exponování sekvencí primerového terče. Během ochlazování se primery napojují na terčovou DNA. *rTth* pol za přítomnosti Mn^{2+} a nadbytku dNTPs prodlužuje napojené primery podél terčových templatů a vytváří molekulu dvouřetězcové DNA, která se nazývá amplikon. V tepelném cyklizátoru se tento postup ve stanoveném počtu cyklů automaticky opakuje, přičemž v každém cyklu se množství amplikonové DNA efektivně zdvojnásobuje. Při použití analyzátoru COBAS AMPLICOR je požadovaný počet cyklů v tepelném cyklizátoru již naprogramován nebo se předem naprogramuje. Amplifikace probíhá pouze v oblasti genomu HCV mezi primery, celý genom amplifikován není.

Selektivní amplifikace

K selektivní amplifikaci terčové nukleové kyseliny ze vzorku se v testu AMPLICOR nebo COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0 používá enzym AmpErase (uracil-N-glykosyláza) a deoxyuridintrifosfát (dUTP). Enzym AmpErase rozpozná a katalyzuje rozklad řetězců DNA obsahujících deoxyuridin¹³, ale nikoli DNA obsahující deoxythymidin. Deoxyuridin se v přírodní DNA nevyskytuje, ale v amplikonu je vždy přítomen vzhledem k tomu, že se v činidle Master Mix používá jako jeden z dNTP používá deoxyuridintrifosfát namísto thymidintrifosfátu. Proto pouze amplikon obsahuje deoxyuridin.

V důsledku přítomnosti deoxyuridinu je kontaminující amplikon citlivý vůči destrukci enzymem AmpErase před amplifikací terčové DNA. Enzym AmpErase, který je obsažen v činidle Master Mix, katalyzuje rozštěpení DNA obsahující deoxyuridin v místě deoxyuridinového zbytku rozvěvením deoxyribozového řetězce v poloze C1. Když je řetězec amplikonové DNA v prvním tepelně cyklizačním kroku při alkalickém pH činidla Master Mix zahříván, štěpí se v poloze deoxyuridinu, čímž se DNA stává neamplifikovatelnou. Enzym AmpErase je při teplotách nad 55 °C, to je během fází tepelného cyklu, neaktivní, a proto terčový amplikon nerozkládá. Po amplifikaci je případný zbytkový enzym denaturován přidávkem denaturačního roztoku, čímž se zamezí degradaci případného terčového amplikonu.

Hybridizační reakce

Po PCR amplifikaci se do amplifikačních zkumavek přidá denaturační roztok, kterým je HCV amplikon chemicky denaturován a tvoří se jednořetězcová DNA. Alikvotní podíly denaturovaného amplikonu se pak odměří do příslušné jamky typizační plotny, která obsahuje hybridizační pufr a genotypizační strip LINEAR ARRAY, jenž je pokryt řadou oligonukleotidových sond specifických pro jednotlivé genotypy HCV. Biotinem značený amplikon HCV se hybridizuje ke genotypově specifické oligonukleotidové sondě pouze tehdy, když obsahuje sekvenci, která této genotypově specifické sondě odpovídá.

Detekční reakce

Po skončení hybridizační reakce se strip pro genotypizaci HCV LINEAR ARRAY několikrát opláchne, aby se odstranil veškerý nenačávaný amplikon. Potom se ke stripu přidá konjugát streptavidinu s křenovou peroxidázou. Ten se váže na biotinem značený amplikon hybridizovaný na genotypově specifické oligonukleotidové sondy na stripu. Strip se opláchne, aby se odstranil nenačávaný konjugát, ke každému stripu se přidá substrátový roztok obsahující peroxid vodíku a 3,3',5,5'-tetrametylbenzidin (TMB). Nenačávaný konjugát streptavidinu s křenovou peroxidázou katalyzuje v přítomnosti peroxidu vodíku oxidaci TMB a vytváří modře zbarvený komplex, který se sráží v polohách sondy, kde dochází k hybridizaci. Genotypizační strip na HCV LINEAR ARRAY se potom vyhodnocuje vizuálně porovnáním vzorku modrých pásů s referenční tabulkou vzorků jednotlivých genotypů.

ČINIDLA

LINEAR ARRAY HCV Genotyping Test

LA HCV GT

48 testů

(P/N: 04391837 190)

HCV Strip

4 x 12 testů

(Genotypizační strip pro HCV LINEAR ARRAY)

Nylonový strip potažený devíti genotypově specifickými DNA sondami na HCV
Dvanáct stripů v jednom opakovaně těsně uzavíratelném vaku se sušidlem

LINEAR ARRAY Detection Kit

LA DK

96 testů

Detekční souprava LINEAR ARRAY

(P/N: 03378179 190)

DN

2 x 12 ml

(Denaturační roztok)

1,6% hydroxid sodný
EDTA
Thymolová modř

Xi 1,6% hm. hydroxid sodný



Dráždivý

SDS

4 x 27 ml

(Koncentrát SDS)

20% laurylsulfát sodný (SDS)
1% ProClin 150

SSPE

2 x 160 ml

(Koncentrát SSPE)

Roztok fosforečnanu sodného
Chlorid sodný
EDTA
1% ProClin 150

SA-HRP

2 x 2 ml

(Konjugát streptavidinu s křenovou peroxidázou)

Konjugát streptavidinu s křenovou peroxidázou
ACES pufr
Chlorid sodný
1% ProClin 150

CIT

2 x 36 ml

(Citrátový koncentrát)

Citrátový roztok

SUB A

3 x 160 ml

(Substrát A)

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

SUB B

3 x 40 ml

(Substrát B)

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

T 40% hm. dimethylformamid (DMF)




Toxický

R: 61-20/21-36

Může poškodit plod. Při vdechování a styku s pokožkou je zdraví škodlivý. Dráždí oči.

S: 53-45

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

24-Well Tray with Lid 24-jamková plotna s víkem (P/N: 03140725 001)		po jednom
AMPLICOR HCV Specimen Preparation Kit, version 2.0 Souprava na přípravu vzorků AMPLICOR HCV, verze 2.0 (P/N: 21111086 123; ART: 11 1108 6; US: 83126)	HCV PREP	96 testů
HCV LYS, v2.0 (Činidlo pro lýzu HCV, verze 2.0)		8 x 6,9 ml
Pufř Tris-HCl 68% guanidinthiokyanát 3% dithiothreitol < 1% glykogen		
Xn  68% (w/w) guanidinthiokyanát		
Zdraví škodlivý		
HCV DIL, v2.0 (Ředidlo na vzorky HCV, verze 2.0)		8 x 4.8 ml
Pufř Tris-HCl < 0,005% poly rA RNA (syntetická) EDTA 0,05% azid sodný		
HCV IC, v2.0 (Vnitřní kontrola HCV, verze 2.0)		8 x 0,1 ml
< 0,001% neinfekční RNA transkribovaná <i>in vitro</i> (mikrobiální) obsahující sekvence vázající HCV primer a specifickou sondu-vázající oblast < 0,005% poly rA RNA (syntetická) EDTA 0,05% azid sodný		
AMPLICOR HCV Controls Kit, version 2.0 Kontrolní souprava AMPLICOR HCV, verze 2.0 (P/N: 21111175 123; ART: 11 1117 5; US: 83131)	HCV CTL	8 sad
NHP [Negativní plazma (lidská)] Negativní plasma, 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 metodami PCR. 0,1% ProClin 300		8 x 0,6 ml
HCV (-) C, v2.0 (Kontrola HCV (-), verze 2.0)		8 x 0,1 ml
< 0,005% poly rA RNA (syntetická) EDTA 0,05% azid sodný		
HCV (+) C, v2.0 (Kontrola HCV (+), verze 2.0)		8 x 0,1 ml
< 0,001% neinfekční RNA transkribovaná <i>in vitro</i> (mikrobiální) obsahující sekvence HCV < 0,005% poly rA RNA (syntetická) EDTA 0,05% azid sodný		
AMPLICOR HCV Amplification Kit, version 2.0 Amplifikační souprava AMPLICOR HCV, verze 2.0 (P/N: 21111094 123; ART: 11 1109 4; US: 83127)	HCV AMP	96 testů
HCV MMX, v2.0 (HCV Master Mix, version 2.0)		8 x 0,7 ml
Bicinový pufř 16% DMSO Glycerol < 0,01% r <i>Tth</i> DNA polymeráza (r <i>Tth</i> pol, mikrobiální) Octan draselný < 0,001% dATP, dCTP, dGTP, dUTP		

< 0,005% Primery 5'-UTR HCV (jeden je biotinylovaný)
< 0,01% enzym AmpErase (uracil-N-glykosyláza) (mikrobiální)
0,05% azid sodný

HCM Mn²⁺, v2.0

(Manganatý roztok pro test HCV, verze 2.0)

8 x 0,1 ml

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

AMPLICOR HCV Detection Kit, version 2.0

Detekční souprava AMPLICOR HCV, verze 2.0
(P/N: 21111108 123; ART: 11 1110 8; US: 83128)

HCV MWP DK

96 testů

HCV MWP, v2.0

(HCV mikrodestičky, verze 2.0)

1 x 96 testů


MWP potažené DNA sondou specifickou na HCV
Dvanáct 8-jamkových stripů v jednom opakovaně těsně uzavíratelném vaku se sušidlem

[1] DN

(Denaturační roztok)

1 x 12 ml

1,6% hydroxid sodný
EDTA
Thymolová modř

Xi  1,6% hm. hydroxid sodný

Dráždivý

[2] HCV HYB

(Hybridizační pufr pro HCV)

1 x 20 ml

Roztok fosforečnanu sodného
< 0,2% solubilizační činidlo
< 25% thiokyanát sodný

[3] AV-HRP

(Konjugát avidinu s křenovou peroxidázou)

1 x 12 ml

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

[4A] SUB A

(Substrát A)

1 x 12 ml

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

[4B] SUB B

(Substrát B)

1 x 3 ml

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

T  40% hm. dimethylformamid (DMF)


Toxický

R: 61-20/21-36

Může poškodit plod. Při vdechování a styku s pokožkou je zdraví škodlivý. Dráždí oči.

S: 53-45

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

[5] STOP (Stop činidlo) 4,9% kyselina sírová		1 x 12 ml
10X WB (Promývací koncentrát 10X) < 2% fosfátový pufr < 9% chlorid sodný EDTA < 2% detergent 0,5% ProClin 300		2 x 90 ml
AMPLICOR Internal Control Detection Kit Detekční souprava pro vnitřní kontrolu AMPLICOR (P/N: 20763306 122; ART: 07 6330 6; US: 83324)	IC MWP DK	96 testů
IC MWP (Mikrodestička pro vnitřní kontrolu) MWP potažené DNA sondou specifickou na IC (vnitřní kontrolu) Dvanáct 8-jamkových stripů v jednom opakovaně těsně uzavíratelném vaku se sušidlem		1 x 96 testů
[3] AV-HRP (Konjugát avidinu s křenovou peroxidázou) Pufr Tris-HCl < 0,001% konjugát avidinu s křenovou peroxidázou Bovinní gamaglobulin (savčí) Emulsit 25 (Dai-ichi Kogyo Seiyaku Co., Ltd.) 0,1% fenol 1% ProClin 150		1 x 12 ml
[4A] SUB A (Substrát A) Citrátový roztok 0,01% peroxid vodíku 0,1% ProClin 150		1 x 12 ml
[4B] SUB B (Substrát B) 0,1% 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB) 40% dimethylformamid (DMF)		1 x 3 ml
T  40% hm. dimethylformamid (DMF)		
	Toxický	
R: 61-20/21-36	Může poškodit plod. Při vdechování a styku s pokožkou je zdraví škodlivý. Dráždí oči.	
S: 53-45	Vyhňte se expozici – před použitím si vyžádejte speciální pokyny. V případě nehody nebo cítíte-li se nedobře, vyhledejte okamžitě lékařskou pomoc (pokud možno ukažte štítek).	
[5] STOP (Stop činidlo) 4,9% kyselina sírová		1 x 12 ml
10X WB (Promývací koncentrát 10X) < 2% fosfátový pufr < 9% chlorid sodný EDTA < 2% detergent 0,5% ProClin 300		2 x 90 ml

COBAS AMPLICOR HCV Detection Kit, version 2.0
Detekční souprava COBAS AMPLICOR HCV, verze 2.0
(P/N: 21111132 123; ART: 11 1113 2; US: 83130)

HCV DK

100 testů

CX PS1, v2.0

(Suspenze sondy na HCV č. 1, verze 2.0)

MES pufr

< 0,4% suspenze paramagnetických částic Dynabeads® potažených
HCV-specifickou oligonukleotidovou sondou
0,09% azid sodný

1 x 100 testů

CX4, v2.0

(Suspenze sondy na HCV č. 2, verze 2.0)

Pufr s fosforečnanem sodným

< 0,2% solubilizační činidlo

42,2% thiokyanát sodný

1 x 100 testů

Xn 42,2% hm. thiokyanát sodný



Zdraví škodlivý

DK

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

100 testů

DN4

(Denaturační roztok)

1,6% hydroxid sodný

EDTA

Thymolová modř

1 x 100 testů

Xi 1,6% hm. hydroxid sodný



Dráždivý

CN4

(Konjugát avidinu s křenovou peroxidázou)

Pufr Tris-HCl

< 0,001% konjugát avidinu s křenovou peroxidázou

Bovinní serumalbumin (savčí)

Emulsit 25 (Dai-ichi Kogyo Seiyaku Co., Ltd.)

0,1% fenol

1% ProClin 150

1 x 100 testů

SB3

(Substrát A)

Citrátový roztok

0,01% peroxid vodíku

0,1% ProClin 150

5 x 75 testů

SB

(Substrát B)

0,1% 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB)

40% dimethylformamid (DMF)

5 x 5 ml

T 40% hm. dimethylformamid (DMF)



Toxický

R: 61-20/21-36

Může poškodit plod. Při vdechování a styku s pokožkou je zdraví škodlivý. Dráždí oči.

S: 53-45

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

COBAS AMPLICOR Conjugate Detection Reagent Konjugované detekční činidlo COBAS AMPLICOR (P/N: 20764213 123; ART: 07 6421 3; US: 83305)	CN4	200 testů
CN4 (Konjugát avidinu s křenovou peroxidázou) Pufr Tris-HCl < 0,001% konjugát avidinu s křenovou peroxidázou Bovinní serumalbumin (savčí) Emulsit 25 (Dai-ichi Kogyo Seiyaku Co., Ltd.) 0,1% fenol 1% ProClin 150		2 x 100 testů
COBAS AMPLICOR Wash Buffer Promývací pufr COBAS AMPLICOR (P/N: 20759899 123; ART: 07 5989 9; US: 83314)	WB	500 testů
WB (Promývací koncentrát 10X) < 2% fosfátový pufr < 9% chlorid sodný EDTA < 2% detergent 0,5% ProClin 300		2 x 250 testů
COBAS AMPLICOR Internal Control Detection Kit Detekční souprava pro vnitřní kontrolu COBAS AMPLICOR (P/N: 20757608 122; ART: 07 5760 8; US: 83281)	IC DK	100 testů
IC PS1 (Suspenze sondy pro IC [vnitřní kontrolu] č. 1) MES pufr < 0,35% suspenze paramagnetických částic Dynabeads® potažených oligonukleotidovou záchytovou sondou specifickou pro vnitřní kontrolu 0,09% azid sodný		1 x 100 testů
IC4 (Suspenze sondy pro IC [vnitřní kontrolu] č. 2) Pufr s fosforečnanem sodným < 0,2% solubilizační činidlo < 25% thiokyanát sodný		1 x 100 testů

UPOZORNĚNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

- A. **PRO DIAGNOSTICKÉ POUŽITÍ *IN VITRO*.**
- B. Test se používá s lidským sérem nebo plazmou odebranou do EDTA (plazma s EDTA). ***Heparin inhibuje PCR, a proto se nesmí pro tento postup použít.***
- 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 manipulaci se vzorky a zkušebními činidly si důkladně umyjte ruce.
- E. Při odebírání alikvotních podílů z lahvíček s činidly dbejte, aby nedošlo k mikrobiální nebo ribonukleázové (RNáza) kontaminaci činidel. Doporučují se sterilní pipety na jedno použití a pipetové špičky prosté RNázy.
- F. Nesměšujte činidla z různých šarží ani z různých lahvíček téže šarže.
- G. Nespotebovaná činidla a odpad likvidujte v souladu s celostátními nebo místními předpisy.
- H. Po datu expirace již soupravu nepoužívejte.
- I. Materiálové bezpečnostní listy (MSDS) lze obdržet od místního zastoupení firmy Roche na vyžádání.
- J. Pracovní tok musí v laboratoři probíhat jednosměrně, od preamplifikačního prostoru směrem k prostoru poamplifikačnímu (amplifikace/detekce). Preamplifikační činnosti začínají přípravou činidel a pokračují přípravou vzorků. Látky a vybavení se musí přiřadit jednotlivým preamplifikačním činnostem a nesmějí se používat k žádným jiným činnostem, ani se nesmějí přenášet mezi jednotlivými vyhrazenými prostory. Ve všech prostorech je třeba nosit rukavice, které se před opuštěním prostoru vymění. Vybavení a materiály pro přípravu činidla se nesmějí používat k přípravě vzorků, ani pro pipetování nebo zpracování amplifikované DNA či jiných zdrojů terčové DNA. Poamplifikační materiály a vybavení musí vždy zůstat v poamplifikačním prostoru. Enzym AmpErase v soupravě AMPLICOR nebo COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0 nenahrazuje jednosměrný pracovní tok.

K. Se vzorky se musí zacházet jako s infekčními, takže je třeba používat odpovídající laboratorní postupy, například ty, jež jsou uvedeny v publikaci *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*¹⁴ nebo v dokumentu CLSI M29-A¹⁵. 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.*

L. **POZOR:** Souprava obsahuje složku (NHP) odvozenou z lidské krve. Zdrojový materiál byl analyzován pomocí testů a byl shledán nereaktivním vůči protilátkám proti HCV, protilátkám proti HIV-1/2, antigenu HIV p24 and povrchovému antigenu hepatitidy B (HBsAg). Testování negativní lidské plazmy metodami PCR neprokázalo žádné detekovatelné HIV-1 RNA, HCV RNA ani HBV DNA. Ovšem žádná známá testovací metoda nepředstavuje dokonalou záruku, že se s deriváty z lidské krve nepřenese nějaké infekční látky. Proto je třeba považovat všechny materiál lidského původu za potenciálně infekční. S NHP je třeba zacházet jako s infekčním a při práci s ním je nutno uplatňovat bezpečné laboratorní postupy, například ty, které jsou uvedeny v publikaci *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*¹⁴ nebo v dokumentu CLSI M29-A¹⁵. Všechny pracovní plochy důkladně očistěte a dezinfikujte čerstvě připraveným 0,5% roztokem chlornanu sodného v deionizované nebo destilované vodě.

M. **HCV IC, v2.0; HCV DIL, v2.0; HCV MMX, v2.0; HCV Mn²⁺, v2.0; HCV (-) C, v2.0; HCV (+) C, v2.0, CX PS1, v2.0 a IC PS1** obsahují azid sodný. Ten může reagovat s olověnými nebo měděnými armaturami a vytvářet vysoce explozivní kovové azidy. Budete-li tedy vylévat roztoky obsahující azid do laboratorní výlevky, spláchněte je velkým objemem vody, aby se azid nemohl nikde usadit.

N. Při manipulaci s **HCV LYS, v2.0; HCV MMX, v2.0; HCV Mn²⁺, v2.0; [1] DN, [2] HCV HYB, [3] AV-HRP, [4A] SUB A, [4B] SUB B**, pracovním substrátem (směs činidel [4A] SUB A a [4B] SUB B), [5] STOP, **CX4, v2.0; IC4, DN4, CN4, SB3, SB**, pracovním substrátem (směs činidel **SB3** a **SB**), **SA-HRP, SUB A, SUB B** a pracovním substrátem (směs činidel **SUB A** a **SUB B**) noste prostředek ochrany očí, laboratorní plášť a rukavice na jedno použití. Dbejte, aby se tyto materiály nedostaly do styku s pokožkou, očima nebo sliznicemi. Pokud ke styku dojde, okamžitě postiženou oblast omyjte velkým množstvím vody. Pokud byste tuto péči zanedbali, mohly by se na postiženém místě vyvinout popáleniny. Jestliže se některé činidlo rozlije nebo rozsype, před vytřením dosucha je zřeďte vodou.

O. Dbejte, aby nedošlo ke styku pokožky a sliznic s **[4B] SUB B, SB, SUB B** nebo s pracovními substráty. Pokud ke styku s pokožkou dojde, omyjte ji okamžitě velkým množstvím vody.

P. **[4B] SUB B, SB, SUB B** a pracovní substráty obsahují dimethylformamid, o němž existují údaje, že je ve vysokých orálních dávkách toxický a může poškodit plod. Je třeba dbát, aby nedošlo k jejich styku s pokožkou, vdechování výparů ani požití. Pokud ke styku s pokožkou dojde, omyjte ji důkladně vodou a mýdlem a neprodleně vyhledejte lékařskou péči.

Q. Dbejte, aby se **HCV LYS, v2.0**, který obsahuje guanidinthiokyanát, ani **CX4, v2.0; IC4** nebo **[2] HCV HYB**, které obsahují thiokyanát sodný, nedostaly do styku s roztokem chlornanu sodného (bělidlo). Směs může uvolňovat vysoce toxické výpary.

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

POŽADAVKY NA SKLADOVÁNÍ A MANIPULACI

A. *Činidla nezmrazujte.*

B. **HCV LYS, v2.0; HCV DIL, v2.0 a HCV IC, v2.0** uchovávejte při teplotě 2-8°C. Do otevření jsou tato činidla stálá až do vyznačené doby expirace. Po otevření je třeba nespotřebovanou část zlikvidovat.

C. V **HCV LYS v2.0** se během skladování při teplotě 2-8°C tvoří sraženina. Tu před použitím rozpustíte zahřátím **HCV LYS v2.0** na teplotu 25-37°C. Kapalínu zahřívajte nejdéle 30 minut a potom jí důkladně míchejte tak dlouho, dokud se krystalky nerozpustí. *Před použitím si každou lahvičkou HCV LYS, v2.0 prohlédněte proti bílému podkladu a sledujte, jestli nepozorujete žluté zbarvení nebo známky netěsnosti. Pokud žlutou barvu nebo známky netěsnosti zjistíte, lahvičku k testování nepoužijte a kontaktujte místní zastoupení firmy Roche.* Po otevření je třeba nespotřebovanou část zlikvidovat. Pracovní roztok činidla pro lýzu (připravený přidáním **HCV IC, v2.0** k **HCV LYS, v2.0**) se uchovává za pokojové teploty a je třeba jej spotřebovat do 8 hodin od přípravy.

D. **HCV MMX, v2.0 a HCV Mn²⁺, v2.0** uchovávejte při teplotě 2-8°C. Činidla jsou stálá do vyznačeného data expirace. Po otevření je třeba nespotřebovanou část zlikvidovat. Pracovní činidlo Master Mix (připravené přidáním **HCV Mn²⁺, v2.0** k **HCV MMX, v2.0**) se musí uchovávat při teplotách 2-8°C a zpracovat do 4 hodin od přípravy.

E. **NHP, HCV (-) C, v2.0 a HCV (+) C, v2.0** uchovávejte při teplotě 2-8°C. Činidla jsou stálá až do vyznačeného data expirace. Po otevření je třeba nespotřebovanou část zlikvidovat.

F. **[1] DN, [2] HCV HYB a [5] STOP** uchovávejte při teplotě 2-25°C. Činidla jsou stálá do vyznačeného data expirace. **[1] DN** a **[5] STOP** jsou po otevření stále minimálně 5 měsíců. **[2] HCV HYB** je po otevření stále při teplotě 2-8°C až 30 dní.

- G. **HCV MWP, v2.0** a **IC MWP** uchovávejte v dodaných plastových vacích při teplotě 2-8°C. **HCV MWP, v2.0** a **IC MWP** jsou v neotevřeném vaku stále do vyznačeného data expirace. Po otevření jsou **HCV MWP, v2.0** a **IC MWP** v opětovně důkladně uzavřených vacích se sušidlem stále při teplotě 2-8°C až 3 měsíce (nebo do data expirace, je-li tato doba kratší).
- H. **[3] AV-HRP, [4A] SUB A** a **[4B] SUB B** uchovávejte při teplotě 2-8°C. Dokud nejsou otevřena, jsou tato čidla stále do vyznačeného data expirace. Po otevření jsou při teplotě 2-8°C stále ještě 3 měsíce (nebo do data expirace, je-li tato doba kratší).
- I. Pracovní substrát se připravuje denně čerstvý. Připraví se smícháním **[4A] SUB A** s **[4B] SUB B**. Je-li chráněn před světlem, je při pokojové teplotě stálý po dobu 3 hodin. Nevystavujte **[4A] SUB A, [4B] SUB B** ani pracovní substrát styku s kovy, oxidačními činidly ani přímému světlu.
- J. **10X WB** uchovávejte při teplotě 2-25°C. Neotevřený je stálý do vyznačeného data expirace. Po otevření je stálý ještě minimálně 5 měsíců. Před zředěním **10X WB** prohlédněte a zpozorujete-li sraženinu, zahřejte na 30-37°C, aby se sraženina rozpustila. Pracovní promývací roztok (1X), připravený naředěním **10X WB** destilovanou nebo deionizovanou vodou, se uchovává při teplotách 2-25°C v čistých uzavřených plastových nádobách a je stálý 2 týdny ode dne přípravy.
- K. **CX PS1, v2.0** and **CX4, v2.0** uchovávejte při teplotě 2-8°C. Čidla jsou stále do vyznačeného data expirace. Po smísení **CX PS1, v2.0** and **CX4, v2.0** je pracovní čidlo při teplotě 2-8°C stále 30 dní. Dá se použít nanejvýš na šest 12-hodinových přístrojových cyklů a mezi cykly se musí uchovávat při teplotě 2-8°C.
- L. **IC PS1** and **IC4** uchovávejte při teplotě 2-8°C. Čidla jsou stále do vyznačeného data expirace. Po smísení **IC PS1** and **IC4** je pracovní čidlo při teplotě 2-8°C stále 30 dní. Dá se použít nanejvýš na šest 12-hodinových přístrojových cyklů a mezi cykly se musí uchovávat při teplotě 2-8°C.
- M. **DN4** uchovávejte při teplotě 2-25°C. Čidlo **DN4** je stále do vyznačeného data expirace. Po otevření je čidlo **DN4** při teplotě 2-8°C stále 30 dní (resp. do data expirace, pokud je tato doba kratší). **DN4** je možno použít maximálně na šest 12-hodinových přístrojových cyklů a mezi cykly se uchovává při teplotě 2-8°C.
- N. **CN4** uchovávejte při teplotě 2-8°C. Čidlo **CN4** je stále do vyznačeného data expirace. Po otevření je **CN4** při teplotě 2-8°C stále po dobu 30 dnů (nebo do data expirace, je-li tato doba kratší). **CN4** je možno použít maximálně na šest 12-hodinových přístrojových cyklů a mezi cykly se uchovává při teplotě 2-8°C.
- O. **SB3** and **SB** uchovávejte při teplotě 2-8°C. Pokud jsou neotevřena, jsou tato čidla stále do vyznačeného data expirace. Pracovní substrát se smísením **SB3** s **SB** připravuje denně. Pracovní substrát je v analyzátoru COBAS AMPLICOR stálý po dobu 16 hodin. Nevystavujte **SB3, SB** ani pracovní substrát styku s kovy či s oxidačními činidly ani přímému světlu.
- P. **WB** uchovávejte při teplotě 2-30°C. Neotevřený **WB** je stálý do vyznačeného data expirace. Po otevření je **WB** stálý ještě minimálně 5 měsíců. Před naředěním **WB** jej prohlédněte; zpozorujete-li sraženinu, rozpustíte ji zahřátím kapaliny na teplotu 30-37°C. Pracovní promývací pufr (1X), připravený zředěním **WB** destilovanou nebo deionizovanou vodou v poměru 1:10, se uchovává v zásobníku COBAS AMPLICOR na promývací pufr při teplotě 2-25°C; od doby přípravy je stálý 2 týdny.
- Q. Částečně spotřebovaná detekční čidla uchovávejte mezi prací s přístrojem při teplotě 2-8°C. Před naplněním do analyzátoru COBAS AMPLICOR zkontrolujte, zda u otevřených nebo pracovních čidel není prošlá doba expirace.
- R. **HCV Strip** uchovávejte při teplotě 2-8°C. Čidlo je stále do vyznačeného data expirace. Po otevření vaku je třeba veškeré nespotebované stripy zlikvidovat.
- S. **DN** uchovávejte při teplotě 2-25°C. **CIT, SA-HRP, SUB A** a **SUB B** uchovávejte při teplotě 2-8°C. Neotevřená jsou tato čidla stále do vyznačeného data expirace. Po otevření jsou při teplotě 2-8°C stále ještě 3 měsíce (nebo do data expirace, je-li tato doba kratší).
- T. **SDS** and **SSPE** uchovávejte při teplotě 2-8°C. Neotevřená jsou tato čidla stále do vyznačeného data expirace. Po otevření jsou při teplotě 2-8°C stále ještě 3 měsíce (nebo do data expirace, je-li tato doba kratší). V čidlech **SDS** and **SSPE** se během skladování při teplotě 2-8°C tvoří sraženina. Před použitím kapalinu po dobu maximálně 30 minut za důkladného míchání zahřejte na teplotu 50°C, aby se sraženina rozpustila. Pracovní hybridizační a promývací pufr, připravené naředěním **SDS** a **SSPE** destilovanou nebo deionizovanou vodou, se uchovávají za pokojové teploty v čistých uzavřených nádobách a ode dne přípravy jsou stále 30 dní.
- U. Pracovní konjugát se připravuje smísením **SA-HRP** s pracovním "ambient" promývacím pufrem denně čerstvý; za pokojové teploty je stálý po dobu 2 hodin.
- V. Pracovní substrát **SUB A** s **SUB B** denně čerstvý; za pokojové teploty, chráněn před světlem, je stálý po dobu 3 hodin. Nevystavujte **SUB A, SUB B** ani pracovní substrát styku s kovy či s oxidačními činidly, ani přímému světlu.

MATERIÁLY, JEŽ JSOU SOUČÁSTÍ DODÁVKY

- A. **LINEAR ARRAY HCV Genotyping Test**
(P/N: 04391837 190) LA HCV GT
- HCV strip**
(Genotypizační strip pro HCV LINEAR ARRAY)
- B. **LINEAR ARRAY Detection Kit**
Detekční souprava LINEAR ARRAY
(P/N: 03378179 190) LA DK
- DN**
(Denaturační roztok)
- SDS**
(Koncentrát SDS)
- SSPE**
(Koncentrát SSPE)
- SA-HRP**
(Konjugát streptavidinu s křenovou peroxidázou)
- CIT**
(Citrátový koncentrát)
- SUB A**
(Substrát A)
- SUB B**
(Substrát B)
- C. **24-Well Tray with Lid**
24-jamková plotna s víkem
(P/N: 03140725 001)
- Pro uživatele soupravy AMPLICOR HCV Test, verze 2.0**
- A. **AMPLICOR HCV Specimen Preparation Kit, version 2.0**
Souprava na přípravu vzorků HCV AMPLICOR, verze 2.0
(P/N: 21111086 123; ART: 11 1108 6; US: 83126) HCV PREP
- HCV LYS, v2.0**
(Činidlo pro lýzu HCV, verze 2.0)
- HCV DIL, v2.0**
(Ředidlo na vzorky HCV, verze 2.0)
- HCV IC, v2.0**
(Vnitřní kontrola HCV, verze 2.0)
- B. **AMPLICOR HCV Controls Kit, version 2.0**
Kontrolní souprava AMPLICOR HCV, verze 2.0
(P/N: 21111175 123; ART: 11 1117 5; US: 83131) HCV CTL
- NHP**
[Negativní plazma (lidská)]
- HCV (-) C, v2.0**
(Kontrola HCV (-), verze 2.0)
- HCV (+) C, v2.0**
(Kontrola HCV (+), verze 2.0)
- C. **AMPLICOR HCV Amplification Kit, version 2.0**
Amplifikační souprava AMPLICOR HCV, verze 2.0
(P/N: 21111094 123; ART: 11 1109 4; US: 83127) HCV AMP
- HCV MMX, v2.0**
(Činidlo HCV Master Mix, verze 2.0)
- HCV Mn²⁺, v2.0**
(Manganatý roztok pro HCV, verze 2.0)
- D. **AMPLICOR HCV Detection Kit, version 2.0**
Detekční souprava AMPLICOR HCV, verze 2.0
(P/N: 21111108 123; ART: 11 1110 8; US: 83128) HCV MWP DK

HCV MWP, v2.0

(HCV mikrodestičky, verze 2.0)

[1] DN

(Denaturační roztok)

[2] HCV HYB

(Hybridizační pufr pro HCV)

[3] AV-HRP

(Konjugát avidinu s křenovou peroxidázou)

[4A] SUB A

(Substrát A)

[4B] SUB B

(Substrát B)

[5] STOP

(Činidlo Stop)

10X WB

(Promývací koncentrát 10X)

- E. **AMPLICOR Internal Control Detection Kit**
Detekční souprava pro vnitřní kontrolu AMPLICOR
(P/N: 20763306 122; ART: 07 6330 6; US: 83324)

IC MWP DK

IC MWP

(Mikrodestička pro vnitřní kontrolu)

[3] AV-HRP

(Konjugát avidinu s křenovou peroxidázou)

[4A] SUB A

(Substrát A)

[4B] SUB B

(Substrát B)

[5] STOP

(Činidlo Stop)

10X WB

(Promývací koncentrát 10X)

Pro uživatele soupravy AMPLICOR HCV Test, verze 2.0

- A. **AMPLICOR HCV Specimen Preparation Kit, version 2.0**
Souprava na přípravu vzorků HCV AMPLICOR, verze 2.0
(P/N: 21111086 123; ART: 11 1108 6; US: 83126)

HCV PREP

HCV LYS, v2.0

(Činidlo pro lýzu HCV, verze 2.0)

HCV DIL, v2.0

(Ředidlo na vzorky HCV, verze 2.0)

HCV IC, v2.0

(Vnitřní kontrola HCV, verze 2.0)

- B. **AMPLICOR HCV Controls Kit, version 2.0**
Kontrolní souprava AMPLICOR HCV, verze 2.0
(P/N: 21111175 123; ART: 11 1117 5; US: 83131)

HCV CTL

NHP

[Negativní plazma (lidská)]

HCV (-) C, v2.0

(Kontrola HCV (-), verze 2.0)

HCV (+) C, v2.0

(Kontrola HCV (+), verze 2.0)

- C. **AMPLICOR HCV Amplification Kit, version 2.0**
Amplifikační souprava AMPLICOR HCV, verze 2.0
(P/N: 21111094 123; ART: 11 1109 4; US: 83127)

HCV AMP

HCV MMX, v2.0

(Činidlo HCV Master Mix, verze 2.0)

HCV Mn²⁺, v2.0

(Manganatý roztok pro HCV, verze 2.0)

- D. **COBAS AMPLICOR HCV Detection Kit, version 2.0**
Detekční souprava COBAS AMPLICOR HCV, verze 2.0
(P/N: 21111132 123; ART: 11 1113 2; US: 83130) HCV DK
- CX PS1, v2.0**
(Suspenze sondy na HCV č. 1, verze 2.0)
- CX4, v2.0**
(Suspenze sondy na HCV č. 2, verze 2.0)
- E. **COBAS AMPLICOR Detection Reagents Kit**
Souprava detekčních činidel COBAS AMPLICOR
(P/N: 20757470 122; ART: 07 5747 0; US: 83276) DK
- DN4**
(Denaturační roztok)
- CN4**
(Konjugát avidinu s křenovou peroxidázou)
- SB3**
(Substrát A)
- SB**
(Substrát B)
- F. **COBAS AMPLICOR Conjugate Detection Reagent**
Konjugované detekční činidlo COBAS AMPLICOR
(P/N: 20764213 123; ART: 07 6421 3; US: 83305) CN4
- CN4**
(Konjugát avidinu s křenovou peroxidázou)
- G. **COBAS AMPLICOR Wash Buffer**
Promývací pufr COBAS AMPLICOR
(P/N: 20759899 123; ART: 07 5989 9; US: 83314) WB
- WB**
(Promývací koncentrát 10X)
- H. **COBAS AMPLICOR Internal Control Detection Kit**
Detekční souprava pro vnitřní kontrolu COBAS AMPLICOR
(P/N: 20757608 122; ART: 07 5760 8; US: 83281) IC DK
- IC PS1**
(Suspenze sondy pro IC [vnitřní kontrolu] č. 1)
- IC4**
(Suspenze sondy pro IC [vnitřní kontrolu] č. 2)

POTŘEBNÝ MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ DODÁVKY

Preamplifikace – prostor pro přípravu činidel

- Pro tepelný cyklizátor zařízení GeneAmp[®] PCR System 9600 firmy Applied Biosystems použijte reakční zkumavky MicroAmp[®] (AB# N801-0533), uzávěry (AB# N801-0535), stojánky (AB# 403081) a podložky (AB# N801-0531)
- Pro tepelný cyklizátor zařízení GeneAmp PCR System 2400 firmy Applied Biosystems použijte reakční zkumavky MicroAmp (AB# N801-0533), uzávěry (AB# N801-0535), stojánky (AB# N801-5530) a podložky (AB# N801-5531)
- Pro tepelný cyklizátor zařízení 96-jamkového zařízení GeneAmp PCR System 9700 firmy Applied Biosystems použijte reakční zkumavky MicroAmp (AB# N801-0533), uzávěry (AB# N801-0535), stojánky (AB# 403081) a podložky (AB# N801-0531)
- A-kruh COBAS AMPLICOR osazený 12 A-zkumavkami (P/N: 21045636001)
- Držák A-kruhu COBAS AMPLICOR
- Plastový uzavíratelný vak
- Pipetu Eppendorf Multipette[®] se špičkou pro objem 1,25 ml Combitip[®] (sterilní, balení po jednom)
- Pipetory (objem 50 µl a 100 µl)* s aerosolovou bariérou nebo RNázy prostými špičkami s pozitivním posuvem
- Rukavice na jedno použití bez pudru

Preamplifikace – prostor pro přípravu vzorků a kontrol

- 1,5 ml polypropylenové zkumavky se šroubovacím uzávěrem sterilní, nesilikonované, konické (Sarstedt 72.692.005 nebo ekvivalentní)**
- Stojany na zkumavky (Sarstedt 93.1428 nebo ekvivalentní)
- 95% ethanol p.a. pro mikrobiologii nebo histologii (čerstvě zředěný na 70% destilovanou nebo deionizovanou vodou)
- Izopropylalkohol p.a.
- Sterilní transferové pipety s tenkou špičkou prosté RNázy
- Sterilní polystyrenové serologické pipety na jedno použití (5 ml, 10 ml a 25 ml)
- Mikropipety (pro objem 20 µl, 50 µl, 100 µl, 200 µl, 400 µl, 600 µl a 1000 µl)* s RNázy-prostými špičkami s aerosolovou bariérou nebo s pozitivním posuvem
- Mikrocentrifuga (max. RCF 16 000 x g, min. RCF 12 500 x g); Eppendorf 5415C, HERMLE Z230M nebo ekvivalentní
- Vířivý mixér
- Vyhřívací horkovzdušný blok na teplotu $60 \pm 2^\circ\text{C}$
- Rukavice na jedno použití bez pudru

Poamplifikace – prostor pro amplifikaci a detekci

- Multikanálová mikropipeta (pro objemy 25 µl a 100 µl) nebo elektronická mikropipeta (Impact[®] nebo AMPLICOR[®])
- Špičky s aerosolovou bariérou prosté RNázy (25 µl a 100 µl) a špičky bez této bariéry (100 µl)*
- Tepelný cyklizátor zařízení GeneAmp PCR System 9600, GeneAmp PCR System 2400 nebo GeneAmp PCR System 9700 firmy Applied Biosystems.
- Podložka MicroAmp a víčkovací zařízení k soupravě GeneAmp PCR System 9600, GeneAmp PCR System 2400 nebo GeneAmp PCR System 9700 firmy Applied Biosystems.
- Omývač mikrodestiček***
- Čtecí zařízení na mikrodestičky ****
- Nádoby na činidla na jedno použití
- Víčko k mikrodestičkám
- 96-mikrojamkový strip ejektor Costar[®] #2578
- Inkubátor na teplotu $37 \pm 2^\circ\text{C}$
- Destilovaná nebo deionizovaná voda
- Analyzátor COBAS AMPLICOR s tiskárnou
- Příručka (*Operator's Manual*) k přístroji COBAS AMPLICOR Analyzer
- Metodická příručka k testovací soupravě na hepatitidu C COBAS AMPLICOR, v2.0
- Stojany s D-keřímkami (ART: 10 4564 4)
- Třepací vodní lázeň vyhřívána na teplotu $55 \pm 2^\circ\text{C}$ s rotací na 60 ot/min (Bellco Hotshaker Plus nebo ekvivalentní)
- Vodní lázeň vyhřívána na teplotu $50 \pm 2^\circ\text{C}$
- Krouživá třepačka s rotací 60 ot/min
- Pinzeta
- Vodotěsné pero (Sharpie Industrial Super Permanent P/N: 13801 nebo ekvivalentní)
- Vakuové nasávací zařízení
- 12-kanálový jehlový dělič toku/aspirátor (Art Robbins Instruments #102-5020-12 nebo ekvivalentní)
- 1-librové olovené prstencové závaží
- Pipetory (objem 100 µl a 1000 µl)* s RNázy-prostými špičkami s aerosolovou bariérou nebo s pozitivním posuvem
- Serologické pipety na 5 ml, 10 ml a 25 ml
- Zásobní láhve o objemu 1 a 2 litry
- Kádinky o objemu 100 ml, 250 ml a 500 ml
- Odměrné válce o objemu 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1 a 2 litry
- Mikropipeta Eppendorf Multipette[®] se špičkou Combitip Reservoir o objemu 25 ml (sterilní, balení po jednom)
- Acetátové fólie

- Roztok na čištění stojanů RBS35 (VWR #P127952 / Pierce #27952)
- Rukavice na jedno použití bez pudru

- * Pipetory musejí být přesné na 3% jmenovitého objemu. Kde je tak uvedeno, musejí být použity špičky s aerosolovou bariérou nebo s pozitivním posuvem prosté RNázy, aby se zabránilo vzájemné kontaminaci vzorku a amplikonu.
- ** Na vzorek a kontrolní preparát se používají zkumavky se šroubovacím uzávěrem, aby se předešlo možné vzájemné kontaminaci vzorků a kontrol. **Zkumavky s nasazovacím uzávěrem nepoužívejte.**
- *** S kapacitou pro mytí mikrodestiček s 12 x 8 jamkami pomocí 250-300 µl promývacího roztoku na jednu jamku v 30-sekundových intervalech.
- **** Specifikace čtečky mikrodestiček: Šířka pásma = 10 ± 3 nm, absorbanční rozmezí $A_{450} = 0$ až $\geq 3,00$; opakovatelnost $\leq 1\%$, přesnost $\leq 3\%$ v rozmezí A_{450} od 0 do 2,00, drift $0,01 A_{450} \leq$ za hodinu.

ODBĚR, TRANSPORT A UCHOVÁVÁNÍ VZORKŮ

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

A. Odběr vzorků

Souprava COBAS AMPLICOR Hepatitis C Virus Test, v2.0 se používá pouze pro vzorky séra nebo plazmy s EDTA. Krev se odebírá do zkumavek SST[®] (Serum Separation Tubes), do sterilních zkumavek bez přísady (červený uzávěr) nebo do sterilních zkumavek s EDTA jako antikoagulantem (uzávěr šedé barvy). **Vzorky antikoagulované heparinem jsou pro tento test nevhodné.** Celou krev uchovávejte při teplotě 2–25°C maximálně 6 hodin.

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

B. Přeprava vzorků

Při přepravě celé krve, séra nebo plazmy je třeba dodržovat celostátní resp. místní předpisy o dopravě etiologických látek¹⁶. Celá 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 teplotě -70°C nebo nižší.

C. Uchovávání vzorků

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

NÁVOD K POUŽITÍ

POZN.: *Provádíte-li genotypizační test na HCV LINEAR ARRAY pomocí soupravy AMPLICOR HCV Test, v2.0, postupujte podle pokynů, jež jsou uvedeny níže v bodech A, B, C a D. Provádíte-li genotypizační test na HCV LINEAR ARRAY pomocí soupravy COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0, postupujte podle pokynů, jež jsou uvedeny níže v bodech E, F, G a H.*

POZN.: *Podrobné pokyny pro práci s přístrojem COBAS AMPLICOR Analyzer jsou uvedeny v provozní příručce k přístroji COBAS AMPLICOR Analyzer.*

POZN.: *Všechna činidla musejí být před použitím vytemperována na pokojovou teplotu. Před započítím testu se vizuálně přesvědčte, že je objem činidel dostatečný.*

POZN.: *Vzorky séra a plazmy s EDTA musejí mít před použitím pokojovou teplotu.*

POZN.: *Kde je tak uvedeno, používají se pipetory s aerosolovou bariérou nebo se špičkami s pozitivním posuvem. Dávejte obzvláštní pozor, abyste zajistili selektivní amplifikaci.*

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

Velikost souborů:

Každá souprava obsahuje dostatečné množství činidla na čtyři 12-testová měření, která mohou probíhat zvlášť nebo současně. Každé měření musí zahrnovat minimálně po jednom replikátu AMPLICOR HCV (–) Control a AMPLICOR HCV (+) Control (viz část “Kontrola jakosti”).

Činidla pro přípravu vzorku a amplifikaci jsou balena v 12-testových lahvičkách na jedno použití. HCV (–) a HCV (+) Controls jsou baleny v lékovkách na jedno použití. Genotypizační stripky HCV LINEAR ARRAY jsou baleny v sáčcích na jedno použití. Pro co nejefektivnější využití je vhodné zpracovávat činidla, vzorky i kontroly v dávkách, jež jsou násobky dvanácti.

Pracovní tok:

Test se soupravou pro genotypizaci viru hepatitidy C LINEAR ARRAY se dá provést během jednoho dne nebo během dvou dnů. Pokud se má test provést během jednoho pracovního dne, postupuje se podle pokynů v částech *Příprava činidel a kontrol, reverzní transkripce a amplifikace* a *Detekce LINEAR ARRAY* v tomto pořadí. Testování lze také rozložit na 2 dny tak, že se 1.den začne s postupy *Příprava vzorků a kontrol* a 2.den se pokračuje s *Přípravou činidel*,

reverzní transkripce a amplifikaci a Detekcí LINEAR ARRAY, nebo se 1.den začne s Přípravou vzorků a kontrol , Reverzní transkripce a Amplifikaci a 2.den se pokračuje s Detekcí LINEAR ARRAY.

- Chcete-li 1.den provést přípravu vzorků a kontrol a 2.den reverzní transkripce, amplifikaci a detekci, proveďte z Přípravy vzorků a kontrol kroky 1 až 15 a zpracované vzorky a kontroly uložte podle kroku 15. 2.den začněte Přípravou činidel, potom zpracované vzorky a kontroly rozmrazte na pokojovou teplotu a pokračujte v Přípravě vzorků a kontrol, krok 16, a postupujte dále k Reverzní transkripce, a amplifikaci a Detekci LINEAR ARRAY.
- Chcete-li pomocí soupravy AMPLICOR HCV Test, v2.0 provést přípravu vzorků a kontrol, reverzní transkripce a amplifikaci 1.den a detekci 2.den, postupujte podle částí Příprava činidel, Příprava vzorků a kontrol a Reverzní transkripce a amplifikace 1.den a uschovejte denaturovaný amplikon tak, jak je popsáno v bodě 6. 2.den pak pokračujte bodem Detekce LINEAR ARRAY.
- Chcete-li pomocí soupravy COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0 absolvovat 1.den zpracování vzorků a kontrol, reverzní transkripce a amplifikaci a 2.den detekci, proveďte všechny kroky částí Příprava činidel a Příprava vzorků a kontrol. Naprogramujte přístroj COBAS AMPLICOR Analyzer v paralelním režimu a proveďte amplifikační postup (podrobné pokyny viz v příručce Operator's Manual k přístroji COBAS AMPLICOR Analyzer). Denaturovaný amplikon se uloží přes noc při teplotě 2–8°C a 2.den se pokračuje detekcí COBAS AMPLICOR Analyzer a detekcí LINEAR ARRAY.

A. Příprava činidel pro for AMPLICOR HCV Test, v2.0 .

Provádí se v: Preamplifikace – prostor pro přípravu činidel

1. Zvolte odpovídající počet reagenčních zkumavek potřebných pro testování vzorku a kontrol. Vložte zkumavky do stojánku MicroAmp a zajistěte zarážkou.
2. Připravte pracovní činidlo Master Mix odměřením 100 µl **HCV Mn²⁺, v2.0** do jedné lékovky **HCV MMX, v2.0**. Objem Master Mix není třeba měřit. Odměřte 100 µl **HCV Mn²⁺, v2.0** do celé lékovky **HCV MMX, v2.0**. Zkumavku opět uzavřete a dobře promíchejte tak, že ji 10–15-krát obrátíte dnem vzhůru. Víření k promísení pracovní směsi Master Mix nepoužívejte. Růžové zabarvení **HCV Mn²⁺, v2.0** slouží k vizuální kontrole toho, že **HCV Mn²⁺, v2.0** byl k **HCV MMX, v2.0** přidán. Zbývající **HCV Mn²⁺, v2.0** zlikvidujte. Pracovní činidlo Master Mix se uchovává při teplotě 2-8°C a musí se spotřebovat do 4 hodin od přípravy.
3. Do každé zkumavky odměřte 50 µl pracovního Master Mix za použití opakovacího pipetoru nebo pipetoru s aerosolovou bariérou nebo se špičkou s pozitivním posuvem. V této fázi zkumavky neuzavírejte.
4. Vložte stojánek s pracovním činidlem Master Mix a s přiměřeným počtem uzávěrů na zkumavky do opakovatelně uzavíratelného plastového vaku a vak dokonale uzavřete. Přejděte na pracoviště pro preamplifikační přípravu vzorků a kontrol. Zkumavky s pracovním činidlem Master Mix uchovávejte při 2-8°C v prostoru preamplifikační přípravy vzorků a kontrol, dokud není příprava vzorků a kontrol dokončena. Pracovní činidlo Master Mix je ve zkumavkách uzavřených v plastovém vaku při teplotě 2-8°C stále po dobu 4 hodin.

B. Příprava vzorků a kontrol pro AMPLICOR HCV Test, v2.0

Provádí se v: Preamplifikace – prostor pro přípravu vzorků a kontrol

POZN.: *K amplifikaci zpracovaných vzorků a kontrol proveďte nejprve kroky uvedené v části "Příprava činidel". Nechte zpracované vzorky a kontroly při pokojové teplotě rozmrazit a pokračujte s "Přípravou vzorku a kontroly", krok 16.*

POZN.: *Před použitím si každou lahvičkou HCV LYS, v2.0 prohlédněte proti bílému podkladu a sledujte, jestli nepozorujete žluté zabarvení nebo známky netěsnosti. Pokud žlutou barvu nebo známky netěsnosti zjistíte, lahvičku k testování nepoužijte Vyžádejte si od místního zastoupení firmy Roche náhradu.*

POZN.: *V HCV LYS, v2.0 se během uchování při teplotě 2-8°C vytváří sraženina. Před použitím kapalinu pod obou maximálně 30 minut zahřívejte na teplotu 25-37°C a důkladně promíchejte, aby se veškerý vysrážený materiál rozpustil.*

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

POZN.: *HCV IC, v2.0 se musí k HCV LYS, v2.0 přidat i tehdy, když se HCV Internal Control detekovat nebude. Zbývající HCV IC, v2.0 zlikvidujte. Pracovní činidlo pro lýzu je při pokojové teplotě stále po dobu 8 hodin.*

POZN.: *Používáte-li vzorky zmrazené, rozmrazte je při pokojové teplotě a nechte je 3-5 sekund vířit. Zkumavkou se vzorkem zakružte, abyste sebrali vzorek i ze dna zkumavky. Dejte pozor, abyste si při manipulaci se vzorky nekontaminovali rukavice.*

4. Do každé označené zkumavky odměřte 400 µl pracovního činidla pro lýzu a zkumavky uzavřete.
5. Připravte si kontroly tímto způsobem:
 - a. Nechte **NHP, HCV (-) C, v2.0** a **HCV (+) C, v2.0** 5-10 sekund vířit.
 - b. Do každé z obou kontrolních zkumavek odměřte po 200 µl **NHP**. Zkumavky uzavřete a nechte 3-5 sekund vířit.
 - c. Do zkumavky označené "HCV (-) C", obsahující pracovní činidlo pro lýzu a **NHP**, odměřte 20 µl **HCV (-) C, v2.0**. Zkumavku uzavřete a nechte 3-5 sekund vířit.
 - d. Do zkumavky označené "HCV (+) C", obsahující pracovní činidlo pro lýzu a **NHP**, odměřte 20 µl **HCV (+) C, v2.0**. Zkumavku uzavřete a nechte 3-5 sekund vířit.
6. Do patřičně označených zkumavek obsahujících pracovní činidlo pro lýzu přidejte po 200 µl jednotlivých vzorků. Zkumavky uzavřete a nechte 3-5 sekund vířit.
7. Inkubujte zkumavky se vzorky a kontrolami v horkovzdušeném bloku při teplotě $60 \pm 2^\circ\text{C}$ po dobu 10 minut a minimálně 10-sekundovým vířením promíchejte.
8. Sejměte ze zkumavek uzávěry a do každé přidejte 600 µl 100% izopropylalkoholu (při pokojové teplotě). Zkumavky uzavřete a nechte 3-5 sekund vířit. 2 minuty všechny zkumavky za pokojové teploty inkubujte.
9. Na zkumavkách si udělejte orientační značky a vložte zkumavky do mikrocentrifugy orientační značkou ven, takže se pelety podle nich srovnají. Vzorky a kontroly odstředíte při pokojové teplotě po dobu 15 minut maximální rychlostí (12 500–16 000 x g).
10. Pomocí nové transfer-pipety na jedno použití s jemnou špičkou opatrně z každé zkumavky stáhněte a zlikvidujte supernatant; přitom dávejte pozor, abyste neporušili peletu (nemusí být vidět!). Odstraňte tolik kapaliny, kolik je bez porušení pelety možné. Supernatant odebírejte pomalu, tak aby mohla kapalina ze stěn zkumavky kompletně stéci. Vakuové odsávání nepoužívejte.
11. Do každé zkumavky odměřte 1,0 ml 70% ethanolu (o pokojové teplotě), zkumavky opět uzavřete a vířením po dobu 3–5 sekund promíchejte.
12. Vložte zkumavky do mikrocentrifugy orientačními značkami ven a centrifugujte při pokojové teplotě po dobu 5 minut rychlostí 12 500–16 000 x g.
13. Pomocí nové transfer-pipety na jedno použití s jemnou špičkou opatrně z každé zkumavky stáhněte a zlikvidujte supernatant, aniž byste přitom porušili peletu; ta by měla být v tomto kroku dobře vidět. Supernatantu odstraňte co nejvíce.
14. Zkumavky opět uzavřete a po dobu 3-5 sekund maximální rychlostí centrifugujte. Za použití pipetoru o kapacitě 200 µl s novou špičkou pro každou zkumavku opatrně odstraňte supernatant, aniž byste porušili peletu; ta by měla být v tomto kroku dobře vidět. Supernatantu odstraňte co nejvíce. **Zbytkový ethanol by mohl amplifikaci inhibovat.**
15. Do každé zkumavky odměřte 200 µl **HCV DIL, v2.0**. Pomocí pipetoru o objemu 200 µl se špičkou s aerosolovou bariérou peletu v maximální míře odlomte. Zkumavky opět uzavřete. Nechte po dobu 10 sekund intenzivně vířit. Může zbýt určité množství nerozpustné hmoty. Zpracované vzorky a kontroly amplifikujte do 3 hodin od přípravy, nebo je můžete po dobu nepřesahující jeden měsíc uchovávat ve zmrazeném stavu při teplotě -70°C , přičemž zmrazit a rozmrazit se mohou nanejvýš dvakrát. Kdyby se zmrazil a rozmrazil vícekrát, mohlo by dojít ke ztrátám RNA HCV.

POZN.: *Pokud byly zpracované vzorky a kontroly před amplifikací uloženy ve zmrazeném stavu, nechte je před krokem 16 nejprve za pokojové teploty rozmrazit a po dobu 5 sekund je vířením promíchejte.*

16. Z každého zpracovaného vzorku od pacienta a kontroly odměřte 50 µl do příslušné zkumavky obsahující pracovní Master Mix; použijte k tomu mikropipetor s aerosolovou bariérou nebo se špičkou s pozitivním posuvem. Pro každý vzorek a kontrolu použijte novou špičku. Dejte pozor, abyste nepřenesli žádnou vysráženou látku, která se nemusela převést zpět do roztoku. Uzavřete a utěsněte zkumavky víčky pomocí zařízení MicroAmp Cap Installing Tool.
17. Polohy kontrol a vzorků ve zkumavkách si poznamenejte. *S reverzní transkripcí a amplifikací je třeba začít do 45 minut okamžiku, kdy byly zpracované vzorky a kontroly odměřeny do zkumavek obsahujících pracovní Master Mix.* Připravené vzorky a kontroly v uzavřených zkumavkách přemístěte do prostoru Amplifikace/detekce. Pro úspěšnost testu je třeba začít s amplifikací co nejdříve, v každém případě nejpozději do 45 minut od chvíle, kdy byly vzorky a kontroly přidány do zkumavek obsahujících pracovní Master Mix. Zbytek zpracovaného vzorku je možno zmrazit a po dobu až jednoho měsíce uchovávat při teplotě -70°C nebo nižší. Zpracované vzorky se mohou zmrazit a rozmrazit maximálně dvakrát. Kdyby se zmrazil a rozmrazil vícekrát, mohlo by dojít ke ztrátám RNA HCV.

C. Reverzní transkripce a amplifikace pro test soupravou AMPLICOR HCV Test, v2.0

Provádí se v: Poamplifikace – prostor amplifikace/detekce

POZN.: *Tepelný cyklizátor zařízení GeneAmp PCR System 9600, GeneAmp PCR System 2400 nebo GeneAmp PCR System 9700 firmy Applied Biosystems zapněte minimálně 30 minut před započetím amplifikace.*

1. Vložte soupravu stojánku se zarážkou do bloku tepelného cyklizátoru.
2. Zařízení GeneAmp PCR System 9600 nebo GeneAmp PCR System 2400 firmy Applied Biosystems naprogramujte pro test AMPLICOR Hepatitis C Virus HCV Test, v2.0 takto:

Program HOLD:	5 min 50°C
Program HOLD:	30 min 62°C
Program CYCLE (37 cyklů):	10 sek 90°C, 25 sek 58°C
Program HOLD:	91°C (NE DÉLE NEŽ 3 HODINY)

V programech CYCLE ponechte náběhové časy na přednastavené hodnotě (0:00), což je maximální rychlost, a přípustnou chybu rovněž na přednastavené hodnotě (2°C).

Tyto čtyři programy vzájemně propojte v program METHOD.

Další informace k programování a obsluze tepelného cyklizátoru si prostudujte v uživatelské příručce k přístroji GeneAmp PCR System 9600 resp. GeneAmp PCR System 2400 firmy Applied Biosystems.

NEBO

Naprogramujte tepelný cyklizátor zařízení 96-Well GeneAmp PCR System 9700 firmy Applied Biosystems na AMPLICOR Hepatitis C Virus (HCV) Test, v2.0 tak, že si vytvoříte metodu tímto způsobem:

Program HOLD:	5 min 50°C
Program HOLD:	30 min 62°C
Program CYCLE (36 cyklů):	10 sek 90°C, 25 sek 58°C
Program HOLD:	91°C (NE DÉLE NEŽ 3 HODINY)

V programu CYCLE musejí být všechny rychlosti zvyšování resp. snižování teploty nastaveny na 50% z přednastavené hodnoty 100%. Z možností, které nabízí monitor pod Create, zvolte kurzorem program CYCLE a stiskněte funkci More, abyste se dostali k nabídce Modify. V nabídce Modify stiskněte Modify a otevře se nabídka Select Modification. Stiskněte Ramp a dostanete se k nabídce Ramp Rate Modification. Kruhovou klávesou zvolte náběh, který chcete upravit, a zvolte 50% Slower. Opakujte toto nastavení pro všechny rychlosti zvyšování nebo snižování teploty v programu CYCLE.

Dále nastavte Reaction Volume na **100 µL** tak, že nejprve změníte Ramp Speed z režimu 9600 na režim Max. Za tímto účelem sjedte kurzorem dolů k Ramp Speed a zvolte **Max**. Pak se kurzorem vraťte k Reaction Volume a zapište **100 µL**.

Další informace k programování a obsluze tepelného cyklizátoru si prostudujte v uživatelské příručce k přístroji GeneAmp PCR System 9700 firmy Applied Biosystems.

3. Nastartujte program METHOD. U přístroji GeneAmp PCR System 9600 nebo 2400 firmy Applied Biosystems běží program přibližně jednu hodinu a 45 minut. U přístroji GeneAmp PCR System 9700 firmy Applied Biosystems běží program přibližně dvě hodiny. Vzorky a kontroly musejí být vyjmuty do 3 hodin od spuštění závěrečného programu HOLD.
4. Kdykoliv během závěrečného programu HOLD vyjměte stojánek z tepelného cyklizátoru, vložte do MicroAmp Base a ihned pokračujte krokem 5. Nenechávejte zkumavky v tepelném cyklizátoru po skončení závěrečného programu HOLD a neprodlužujte závěrečný program HOLD na více než 3 hodiny. **AMPLIFIKOVANÉ VZORKY NEPŘENÁŠEJTE DO PREAMPLIFIKAČNÍHO PROSTORU. AMPLIFIKOVANÉ KONTROLY A VZORKY SE POVAŽUJÍ ZA HLAVNÍ ZDROJ MOŽNÉ KONTAMINACE.**
5. Odstraňte ze zkumavek uzávěry opatrně tak, aby se z amplifikovaných produktů netvořil aerosol. Pomocí multikanálového pipetoru se špičkami s aerosolovou bariérou odměřte ihned do prvního sloupce (nebo řady) zkumavek 100 µl [1] DN a promíchejte pipetováním nahoru a dolů. Tento postup opakujte u všech sloupců (nebo řad), přičemž používejte vždy nové sady špiček. Pro dosažení úplné denaturace vzorky při pokojové teplotě 10 minut inkubujte.
6. Denaturovaný amplikon je možné před detekcí AMPLICOR HCV resp. LINEAR ARRAY uchovávat při pokojové teplotě nejvýše 2 hodiny. Není-li možné zahájit detekční reakci dříve než po 2 hodinách, uzavřete zkumavky novými víčky; denaturovaný amplikon pak můžete uložit při teplotě 2-8°C na dobu maximálně 5 dnů.

D. Detekce LINEAR ARRAY

Provádí se v: Poamplifikace – prostor pro amplifikaci a detekci

1. Všechna činidla zahřejte na pokojovou teplotu.
2. Předehřejte vodní lázeň na 50°C.
3. Následujícím postupem připravte pracovní promývací pufr (1X). Prohlédněte **SSPE** and **SDS**; zpozorujete-li sraženinu, rozpusťte ji zahřátím kapaliny ve vodní lázni na 50°C. Přidejte 62,5 ml **SSPE** k 432,5 ml destilované nebo deionizované vody. Dobře promíchejte. Přidejte 5 ml **SDS** a dobře promíchejte. Pracovní hybridizační pufr postačuje pro 100 genotypizačních stripů LINEAR ARRAY Uchovává se v čisté nádobě za pokojové teploty a je stálý 30 dnů.
4. Následujícím postupem připravte pracovní “stringent” promývací pufr. Prohlédněte **SSPE** and **SDS**; zpozorujete-li sraženinu, rozpusťte ji zahřátím kapaliny ve vodní lázni na 50°C. Přidejte 25 ml **SSPE** k 965 ml destilované nebo deionizované vody. Dobře promíchejte. Přidejte 10 ml **SDS** a dobře promíchejte. Pracovní promývací pufr postačuje pro 100 genotypizačních stripů LINEAR ARRAY Uchovává se v čisté nádobě za pokojové teploty a je stálý 30 dnů.
5. Následujícím postupem připravte pracovní “ambient” promývací pufr. Prohlédněte **SSPE** and **SDS**; zpozorujete-li sraženinu, rozpusťte ji zahřátím kapaliny ve vodní lázni na 50°C. Přidejte 37,5 ml **SSPE** k 1447,5 ml destilované nebo deionizované vody. Dobře promíchejte. Přidejte 15 ml **SDS** a dobře promíchejte. Pracovní “Ambient” promývací pufr postačuje pro 100 genotypizačních stripů LINEAR ARRAY Uchovává se v čisté nádobě za pokojové teploty a je stálý 30 dnů.
6. Následujícím postupem připravte pracovní citrátový pufr. Prohlédněte **CIT**; zpozorujete-li sraženinu, rozpusťte ji zahřátím kapaliny ve vodní lázni na 50°C. Přidejte 50 ml **CIT** k 450 ml destilované nebo deionizované vody. Dobře promíchejte. Pracovní citrátový pufr postačuje pro 100 genotypizačních stripů LINEAR ARRAY Uchovává se v čisté nádobě za pokojové teploty a je stálý 30 dnů.
7. Minimálně 15 minut zahřívajte pracovní hybridizační pufr a pracovní “Stringent” promývací pufr na vodní lázni při teplotě 50°C. Dokud je nebudete potřebovat, oba roztoky ve vodní lázni ponechte.
8. Předehřejte třepací vodní lázeň na teplotu 55°C a třepací rychlost nastavte na 60 ot/min. Dbejte, aby bylo v lázni dost vody na vyhřátí 24-jamkové plotny, ale ne příliš mnoho, aby do plotny nenastříkla. Aby se během třepání do plotny voda nenalila, měla by pokrývat 1/4 vnější hloubky jamky.

POZN.: *Pro přesné hybridizační podmínky je důležité, aby byla teplota kontrolována a aby byl ve vodní lázni dostatek vody.*

9. Čistou pinzetou vyjměte ze sáčku potřebný počet **HCV Strip**.
10. Vodovzdorným perem si na **HCV Strip** označte příslušné vzorky resp. kontroly.
11. Stripy vložte do příslušných jamek 24-jamkové plotny.
12. Do všech jamek, ve kterých je označený strip, odměřte po 4 ml ohřátého pracovního hybridizačního pufru.
13. Pomocí mikropipety se špičkou s aerosolovou bariérou odměřte do příslušné jamky s označeným stripem 100 µl denaturovaného amplikonu. Po každém přidavku plotnou opatrně zakolébejte. Pro každý přidavek amplikonu použijte novou špičku.
14. Přikryjte plotnu víkem a vložte do třepací vodní lázně vyhřáté na 55°C. Aby se víko během třepání neposouvalo, zatěžte je 1-librovým prstencovým závažím. Hybridizujte po dobu 20 minut při rychlosti třepání 60 ot/min.
15. Následujícím postupem si připravte pracovní konjugát: Pro každý testovaný strip přidejte 10 µl **SA-HRP** k 5 ml předehřátého “stringent” promývacího pufru. Dobře promíchejte. Pracovní konjugát je třeba uchovávat v čisté nádobě za pokojové teploty; pak je stálý 2 hodiny.
16. Vyjměte plotnu z vodní lázně a pracovní hybridizační pufr vakuovým odsátím odstraňte.
17. Do každé jamky typizační plotny odměřte 4 ml pracovního “ambient” promývacího pufru. Plotnou opatrně 3–4-krát zakolébejte, aby se stripy opláchly, a pracovní “ambient” promývací pufr okamžitě odsajte.
18. Do každé jamky typizační plotny odměřte 4 ml pracovního konjugátu. Čistým papírovým ubrouskem otřete víko plotny, uložte je na plotnu a vložte plotnu zpět do třepací vodní lázně vyhřáté na 55°C. Aby se víko během třepání neposouvalo, zatěžte je 1-librovým prstencovým závažím. Inkubujte po dobu 20 minut při rychlosti třepání 60 ot/min.
19. Vyjměte plotnu z lázně a pracovní konjugát vakuovým odsátím odstraňte.
20. Do každé jamky typizační plotny odměřte 4 ml pracovního “ambient” promývacího pufru. Plotnou opatrně třikrát až čtyřikrát zakolébejte, aby se stripy opláchly, a pufr okamžitě odsajte.
21. Do každé jamky typizační plotny odměřte 4 ml pracovního “stringent” promývacího pufru. Čistým papírovým ubrouskem otřete víko plotny, uložte je na plotnu a vložte plotnu zpět do třepací vodní lázně vyhřáté na 55°C. Aby se víko během třepání neposouvalo, zatěžte je 1-librovým prstencovým závažím. Inkubujte po dobu 12 minut při rychlosti třepání 60 ot/min.

22. Vyměňte plotnu z lázně a pracovní promývací pufr vakuovým odsátím odstraňte.
23. Do každé jamky typizační plotny odměřte 4 ml pracovního "ambient" promývacího pufru. Čistým papírovým ubrouskem otřete víko plotny, položte je na plotnu a plotnu na 5 minut uložte na krouživou třepačku o třepací rychlosti 60 ot/min.
24. Sejměte plotnu z třepačky a pracovní "ambient" promývací pufr vakuovým odsátím odstraňte.
25. Do každé jamky typizační plotny odměřte 4 ml citrátového pufru. Čistým papírovým ubrouskem otřete víko plotny, položte je na plotnu a plotnu na 5 minut uložte na krouživou třepačku o třepací rychlosti 60 ot/min.
26. Následujícím postupem si připravte pracovní substrát: Na každý testovaný strip přidejte k 1 ml **SUB B** objem 4 ml **SUB A**. Dobře promíchejte. Pracovní substrát je třeba uchovávat v čisté nádobě za pokojové teploty mimo dosah přímého světla; pak je stálý 3 hodiny.
27. Sejměte plotnu z třepačky a pracovní citrátový pufr vakuovým odsátím odstraňte.
28. Do každé jamky typizační plotny odměřte 4 ml pracovního substrátu. Čistým papírovým ubrouskem otřete víko plotny, položte je na plotnu a plotnu na 10 minut uložte na krouživou třepačku o třepací rychlosti 60 ot/min.
29. Sejměte plotnu z třepačky a pracovní substrát vakuovým odsátím odstraňte.
30. Do každé jamky typizační plotny odměřte 4 ml destilované nebo deionizované vody. Čistým papírovým ubrouskem otřete víko plotny, položte je na plotnu a plotnu na 5 minut uložte na krouživou třepačku o třepací rychlosti 60 ot/min.
31. Sejměte plotnu z třepačky a destilovanou nebo deionizovanou vodu vakuovým odsátím odstraňte.
32. Do každé jamky typizační plotny odměřte 4 ml destilované nebo deionizované vody. Čistým papírovým ubrouskem otřete víko plotny, položte je na plotnu a plotnu na 5 minut uložte na krouživou třepačku o třepací rychlosti 60 ot/min.
33. Sejměte plotnu z třepačky a destilovanou nebo deionizovanou vodu vakuovým odsátím odstraňte.
34. Do každé jamky typizační plotny odměřte 4 ml destilované nebo deionizované vody. Do interpretace je možno ponechat stripy za pokojové teploty až jeden den ve vodě.

E. Příprava činidel pro COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0.

Provádí se v: Preamplifikace – prostor pro přípravu činidel

1. Stanovte potřebný počet A-kruhů pro testování vzorků a kontrol. Uložte A-kruh(y) do držáku(ů).
2. Připravte pracovní činidlo Master Mix odměřením 100 μ l **HCV Mn²⁺, v2.0** do jedné lékovky **HCV MMX, v2.0**. *Objem Master Mix není třeba měřit. Odměřte 100 μ l **HCV Mn²⁺, v2.0** do celé lékovky **HCV MMX, v2.0**.* Zkumavku opět uzavřete a dobře promíchejte tak, že ji 10–15-krát obrátíte dnem vzhůru. Víření k promísení pracovní směsi Master Mix nepoužívejte. Růžové zabarvení **HCV Mn²⁺, v2.0** slouží k vizuální kontrole toho, že **HCV Mn²⁺, v2.0** byl k **HCV MMX, v2.0** přidán. Zbývající **HCV Mn²⁺, v2.0** zlikvidujte. Pracovní činidlo Master Mix se uchovává při teplotě 2–8°C a musí se spotřebovat do 4 hodin od přípravy.
3. Do každé A-zkumavky odměřte 50 μ l pracovního Master Mix za použití opakovacího pipetoru nebo pipetoru s aerosolovou bariérou nebo se špičkou s pozitivním posuvem. Nyní kryty A-zkumavek nezavírejte.
4. A-kruh(y) s pracovním činidlem Master Mix vložte do těsně uzavíratelného plastového vaku a vak bezpečně těsně uzavřete. Přejděte na pracoviště pro preamplifikační přípravu vzorků a kontrol. Uložte A-kruh(y) obsahující pracovní Master Mix do prostoru Preamplifikace – příprava vzorku a kontroly – při teplotě 2–8°C do doby, než bude příprava vzorků a kontrol hotova. Pracovní Master Mix v A-zkumavkách zatavených v plastovém vaku je při teplotě 2–8°C stálý čtyři hodiny.

F. Příprava vzorků a kontrol pro COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0.

Provádí se v: Preamplifikace – prostor pro přípravu vzorků a kontrol

POZN.: *K amplifikaci zpracovaných vzorků a kontrol provedte nejprve kroky uvedené v části "Příprava činidel". Nechte zpracované vzorky a kontroly při pokojové teplotě rozmrazit a pokračujte s "Přípravou vzorku a kontroly", krok 16.*

POZN.: *Před použitím si každou lahvičku HCV LYS, v2.0 prohlédněte proti bílému podkladu a sledujte, jestli nepozorujete žluté zabarvení nebo známky netěsnosti. Pokud žlutou barvu nebo známky netěsnosti zjistíte, lahvičku k testování nepoužijte. Vyžádejte si od místního zastoupení firmy Roche náhradu.*

POZN.: *V HCV LYS, v2.0 se během uchování při teplotě 2–8°C vytváří sraženina. Před použitím kapalinu pod obou maximálně 30 minut zahřívejte na teplotu 25–37°C a důkladně promíchejte, aby se veškerý vsrážený materiál rozpustil.*

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

POZN.: ***HCV IC, v2.0 se musí k HCV LYS, v2.0 přidat i tehdy, když se HCV Internal Control detekovat nebude. Zbývající HCV IC, v2.0 zlikvidujte. Pracovní činidlo pro lýzu je při pokojové teplotě stálý po dobu 8 hodin.***

POZN.: ***Používáte-li vzorky zmrazené, rozmrazte je při pokojové teplotě a nechte je 3-5 sekund vířit. Zkumavkou se vzorkem zakružte, abyste sebrali vzorek i ze dna zkumavky. Dejte pozor, abyste si při manipulaci se vzorky nekontaminovali rukavice.***

4. Do každé označené zkumavky odměřte 400 μ l pracovního činidla pro lýzu a zkumavky uzavřete.
5. Připravte si kontroly tímto způsobem:
 - a. Nechte **NHP, HCV (-) C, v2.0** a **HCV (+) C, v2.0** 5-10 sekund vířit.
 - b. Do každé z obou kontrolních zkumavek odměřte po 200 μ l **NHP**. Zkumavky uzavřete a nechte 3-5 sekund vířit.
 - c. Do zkumavky označené “HCV (-) C”, obsahující pracovní činidlo pro lýzu a **NHP**, odměřte 20 μ l **HCV (-) C, v2.0**. Zkumavku uzavřete a nechte 3-5 sekund vířit.
 - d. Do zkumavky označené “HCV (+) C”, obsahující pracovní činidlo pro lýzu a **NHP**, odměřte 20 μ l **HCV (+) C, v2.0**. Zkumavku uzavřete a nechte 3-5 sekund vířit.
6. Do patřičně označených zkumavek obsahujících pracovní činidlo pro lýzu přidejte po 200 μ l jednotlivých vzorků. Zkumavky uzavřete a nechte 3-5 sekund vířit.
7. Inkubujte zkumavky se vzorky a kontrolami v horkovzdušeném bloku při teplotě $60 \pm 2^\circ\text{C}$ po dobu 10 minut a minimálně 10-sekundovým vířením promíchejte.
8. Sejměte ze zkumavek uzávěry a do každé přidejte 600 μ l 100% izopropylalkoholu (při pokojové teplotě). Zkumavky uzavřete a nechte 3-5 sekund vířit. Dvě minuty všechny zkumavky za pokojové teploty inkubujte.
9. Na zkumavkách si udělejte orientační značky a vložte zkumavky do mikrocentrifugy orientační značkou ven, takže se pelety podle nich srovnají. Vzorky a kontroly odstřeďte při pokojové teplotě po dobu 15 minut maximální rychlostí (12 500–16 000 x g).
10. Pomocí nové transfer-pipety na jedno použití s jemnou špičkou opatrně z každé zkumavky stáhněte a zlikvidujte supernatant; přitom dávejte pozor, abyste neporušili peletu (nemusí být vidět!). Odstraňte tolik kapaliny, kolik je bez porušení pelety možné. Supernatant odebírejte pomalu, tak aby mohla kapalina ze stěn zkumavky kompletně stéci. Vakuové odsávání nepoužívejte.
11. Do každé zkumavky odměřte 1,0 ml 70% ethanolu (o pokojové teplotě), zkumavky opět uzavřete a vířením po dobu 3–5 sekund promíchejte.
12. Vložte zkumavky do mikrocentrifugy orientačními značkami ven a centrifugujte při pokojové teplotě po dobu 5 minut rychlostí 12 500–16 000 x g.
13. Pomocí nové transfer-pipety na jedno použití s jemnou špičkou opatrně z každé zkumavky stáhněte a zlikvidujte supernatant, aniž byste přitom porušili peletu; ta by měla být v tomto kroku dobře vidět. Supernatantu odstraňte co nejvíce.
14. Zkumavky opět uzavřete a po dobu 3-5 sekund maximální rychlostí centrifugujte. Za použití pipetoru o kapacitě 200 μ l s novou špičkou pro každou zkumavku opatrně odstraňte supernatant, aniž byste porušili peletu; ta by měla být v tomto kroku dobře vidět. Supernatantu odstraňte co nejvíce. ***Zbytkový ethanol by mohl amplifikaci inhibovat.***
15. Do každé zkumavky odměřte 200 μ l **HCV DIL, v2.0**. Pomocí pipetoru o objemu 200 μ l se špičkou s aerosolovou bariérou peletu v maximální míře odlomte. Zkumavky opět uzavřete. Nechte po dobu 10 sekund intenzivně vířit. Může zůstat určité množství nerozpustné hmoty. Zpracované vzorky a kontroly amplifikujte do 3 hodin od přípravy, nebo je můžete po dobu nepřesahující jeden měsíc uchovávat ve zmrazeném stavu při teplotě -70°C , přičemž zmrazit a rozmrazit se mohou nanejvýš dvakrát. Kdyby se zmrazil a rozmrazil vícekrát, mohlo by dojít ke ztrátám RNA HCV.

POZN.: ***Pokud byly zpracované vzorky a kontroly před amplifikací uloženy ve zmrazeném stavu, nechte je před krokem 16 nejprve za pokojové teploty rozmrazit a po dobu 5 sekund je vířením promíchejte.***

16. Z každého zpracovaného vzorku a kontroly odměřte 50 µl do příslušné A-zkumavky obsahující pracovní Master Mix; použijte k tomu mikropipetor s aerosolovou bariérou nebo se špičkou s pozitivním posuvem. Pro každý vzorek a kontrolu použijte novou špičku. Dejte pozor, abyste nepřenesli žádnou vysráženou látku, která se nemusela převést zpět do roztoku. A-zkumavky uzavřete.
17. Polohy kontrol a vzorků v A-kruzích si poznamenejte. *S reverzní transkripcí a amplifikací je třeba začít do 45 minut okamžiku, kdy byly zpracované vzorky a kontroly odměřeny do A-zkumavek obsahujících pracovní Master Mix.* Připravené vzorky a kontroly v zavíčkovaných A-kruzích přemístěte do prostoru Amplifikace/detekce. Pro úspěšnost testu je třeba začít s amplifikací co nejdříve, v každém případě nejpozději do 45 minut od chvíle, kdy byly vzorky a kontroly uloženy do A-kruhů obsahujících pracovní Master Mix. Zbytek zpracovaného vzorku je možno zmrazit na teplotu -70°C nebo nižší a takto uchovávat po dobu až jednoho měsíce. Zpracované vzorky se mohou zmrazit a rozmrazit maximálně dvakrát. Kdyby se zmrazily a rozmrazily vícekrát, mohlo by dojít ke ztrátám RNA HCV.

G. Reverzní transkripce a amplifikace pro test soupravou COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0

Provádí se v: Poamplifikace – Prostor pro amplifikaci/detekci.

Proveďte denní údržbu přístroje podle příručky *Operator's Manual* k přístroji COBAS AMPLICOR Analyzer; sem spadají tyto činnosti:

- Otřít inicializační podstavec vlhkým hadříkem nepouštějícím vlas a osušit
- Otřít špičku zařízení pro manipulaci s D-kelímky vlhkým hadříkem nepouštějícím vlas a osušit
- Zkontrolovat rezervoár s promývacím pufrem a v případě potřeby doplnit
- Pracovní promývací pufr (1X) připravíte následujícím postupem. Prohlédněte WB; zpozorujete-li sraženinu, zahřejte kapalinu na teplotu 30-37°C, aby se sraženina rozpustila. Jeden objem WB přidejte k 9 objemům destilované nebo deionizované vody. Dobře promíchejte. V zásobníku promývacího pufru udržujte soustavně náplň minimálně 3-4 litrů promývacího pufru (1X).
- Vyprázdnit nádobu na odpad
- Systém naprimerujte
- Během primingu zkontrolujte stříkačky a trubičky
- Během primingu zkontrolujte transferové špičky

Před každým postupem

- Zkontrolujte nádobu na odpad a podle situace ji vyprázdněte
- Zkontrolujte rezervoár na promývací pufr a podle situace pufr doplňte
- Vyměňte stojany s použitými D-kelímky
- Systém naprimerujte

Plnění přístroje a provoz zařízení

1. Zkontrolujte v přístroji COBAS AMPLICOR Analyzer množství činidel. Připravte si dostatek kazet, abyste s nimi vystačili.
2. **CX PS1, v2.0** vířením důkladně promíchejte. Do jedné kazety s **CX4, v2.0** odměřte 2,5 ml **CX PS1, v2.0**. Kazetu uložte do příslušného stojanu, specifického pro daný test. Použitou lékovku od **CX PS1, v2.0** zlikvidujte. Na kazetě s **CX4, v2.0** vyznačte datum přípravy činidla.
3. Při detekci HCV Internal Control dokonale **IC PS1** vířením promíchejte. Do jedné kazety s **IC4** odměřte 2,5 ml **IC PS1**. Kazetu uložte do příslušného stojanu, specifického pro daný test. Použitou k lékovku od **IC PS1** zlikvidujte. Na kazetě s **IC4** poznačte datum přípravy činidla.
4. Připravte pracovní substrát tak, že do jedné kazety s **SB3** odpipetujete 5 ml **SB**. K promísení pipetujte nahoru a dolů. Prázdnou lékovku od **SB** zlikvidujte. Na kazetě s **SB3** vyznačte datum přípravy.
5. Pracovní substrát uložte do příslušného (generického) stojanu.
6. Kazety s **DN4** a **CN4** uložte do příslušných (generických) stojanů na činidla. Na kazetách vyznačte datum, kdy byly otevřeny.
7. Stojany na činidla identifikujete jako generické nebo specifické pro daný test pomocí klávesnice nebo snímače čárových kódů, jak je popsáno v příručce (*Operator's Manual*) k přístroji COBAS AMPLICOR Analyzer, nebo pomocí software AMPLILINK, jak je popsáno v příručce (*Operator's Manual*) k softwaru AMPLILINK.
8. Nakonfigurujte stojany na činidla tak, že do analyzátoru vložíte pozice činidel a čísla šarží, a to buď pomocí klávesnice či snímače čárových kódů, jak je popsáno v příručce (*Operator's Manual*) k přístroji COBAS AMPLICOR Analyzer, nebo pomocí software AMPLILINK, jak je popsáno v příručce (*Operator's Manual*) k softwaru AMPLILINK.

9. Uložte stojany na čínidla na analyzátor buď pomocí klávesnice či snímače čárových kódů, jak je popsáno v příručce (*Operator's Manual*) k přístroji COBAS AMPLICOR Analyzer, nebo pomocí software AMPLILINK, jak je popsáno v příručce (*Operator's Manual*) k tomuto software. Dbejte, aby byla každá kazeta s čínidlem ve své přiřazené pozici a aby ve stojanu těsně seděla.
10. Stojan na D-kelímky uložte na plošinu pro D-kelímky. Pro každou detekční reakci je zapotřebí jeden D-kelímek a pro každou kazetu s pracovním substrátem jsou zapotřebí dva D-kelímky, aby mohl analyzátor COBAS AMPLICOR provést slepý pokus.
11. A-kruh(y) uložte do segmentu(ů) tepelného cyklizátoru přístroje COBAS AMPLICOR Analyzer.
12. Uložte A-kruh(y) do analyzátoru, a to buď pomocí klávesnice či snímače čárových kódů, jak je popsáno v příručce (*Operator's Manual*) k přístroji COBAS AMPLICOR Analyzer, nebo pomocí software AMPLILINK, jak je popsáno v příručce (*Operator's Manual*) k softwaru AMPLILINK.
13. Sestavte pro A-kruhy pracovní seznam (Worklist), jak je popsáno v příručce (*Operator's Manual*) k přístroji COBAS AMPLICOR Analyzer.
14. Kryt segmentu(ů) tepelného cyklizátoru těsně uzavřete.
15. Uvedte přístroj COBAS AMPLICOR Analyzer do chodu, jak je popsáno v příručce (*Operator's Manual*) k přístroji COBAS AMPLICOR Analyzer.
16. Vyčkejte, dokud analyzátor neohlásí, že kontrola uložení proběhla úspěšně.

POZN.: *COBAS AMPLICOR Analyzer umožňuje provést u obsahu každé A-zkumavky až 6 samostatných detekcí. Analyzátor si sám vypočítá potřebná množství jednotlivých čínidel a na počátku každého měření zkontroluje, jestli jich má pro požadovaný test dostatek.*

17. Reverzní transkripci, amplifikaci a detekci provádí přístroj COBAS AMPLICOR Analyzer automaticky. Při testování 12 vzorků běží program zhruba 3 h 25 min, při testování 24 vzorků běží zhruba 3 h 50 min. Vzorky i kontroly je třeba po skončení testu COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0 vyjmout do 2 hodin.
18. A-kruhy ze segmentu(ů) tepelného cyklizátoru vyjměte do 2 hodin od skončení testu COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0. Vzorky ani kontroly není třeba denaturovat, protože přístroj COBAS AMPLICOR Analyzer přidává denaturační roztok k amplikonu.
19. Do doby, než se přistoupí k detekci LINEAR ARRAY, je možno po skončení běhu COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0 uchovávat denaturovaný amplikon při pokojové teplotě maximálně 2 hodiny (včetně doby, po kterou jsou A-kruhy ponechány v přístroji COBAS AMPLICOR Analyzer). Není-li možné zahájit detekční reakci dříve než po 2 hodinách, lze denaturovaný amplikon uchovávat po dobu až 5 dní při teplotě 2-8°C.

POZN.: *AMPLIFIKOVANÉ VZORKY NEPŘENÁŠEJTE DO PREAMPLIFIKAČNÍHO PROSTORU. AMPLIFIKOVANÉ KONTROLY A VZORKY JSOU POKLÁDÁNY ZA HLAVNÍ ZDROJ MOŽNÉ KONTAMINACE.*

H. Detekce LINEAR ARRAY

Provádí se v: Poamplifikace – prostor amplifikace/detekce

1. Všechna čínidla zahřejte na pokojovou teplotu.
2. Předehřejte vodní lázeň na 50°C.
3. Následujícím postupem si připravte pracovní hybridizační pufr: Prohlédněte **SSPE** and **SDS**; zpozorujete-li sraženinu, rozpusťte ji zahřátím kapaliny ve vodní lázni na 50°C. Přidejte 62,5 ml **SSPE** k 432,5 ml destilované nebo deionizované vody. Dobře promíchejte. Přidejte 5 ml **SDS** a dobře promíchejte. Pracovní hybridizační pufr postačuje pro 100 genotypizačních stripů LINEAR ARRAY Uchovává se za pokojové teploty a je stálý 30 dnů.
4. Následujícím postupem si připravte pracovní promývací pufr. Prohlédněte **SSPE** and **SDS**; zpozorujete-li sraženinu, rozpusťte ji zahřátím kapaliny ve vodní lázni na 50°C. Přidejte 25 ml **SSPE** k 965 ml destilované nebo deionizované vody. Dobře promíchejte. Přidejte 10 ml **SDS** a dobře promíchejte. Pracovní promývací pufr postačuje pro 100 genotypizačních stripů LINEAR ARRAY Uchovává se v čisté nádobě za pokojové teploty a je stálý 30 dnů.
5. Následujícím postupem připravte pracovní "ambient" promývací pufr. Prohlédněte **SSPE** and **SDS**; zpozorujete-li sraženinu, rozpusťte ji zahřátím kapaliny ve vodní lázni na 50°C. Přidejte 37,5 ml **SSPE** k 1447,5 ml destilované nebo deionizované vody. Dobře promíchejte. Přidejte 15 ml **SDS** a dobře promíchejte. Pracovní "Ambient" promývací pufr postačuje pro 100 genotypizačních stripů LINEAR ARRAY Uchovává se v čisté nádobě za pokojové teploty a je stálý 30 dnů.

6. Následujícím postupem si připravte pracovní citrátový pufr. Prohlédněte **CIT**; zpozorujete-li sraženinu, rozpustíte ji zahřátím kapaliny ve vodní lázni na 50°C. Přidejte 50 ml **CIT** k 450 ml destilované nebo deionizované vody. Dobře promíchejte. Pracovní citrátový pufr postačuje pro 100 genotypizačních stripů **LINEAR ARRAY** Uchovává se v čisté nádobě za pokojové teploty a je stálý 30 dnů.
7. Minimálně 15 minut zahříváte pracovní hybridizační pufr a pracovní "stringent" promývací pufr na vodní lázni při teplotě 50°C. Dokud je nebudete potřebovat, oba pufrovací roztoky ve vodní lázni ponechte.
8. Předehřejte třepací vodní lázeň na teplotu 55°C a třepací rychlost nastavte na 60 ot/min. Dbejte, aby bylo v lázni dost vody na vyhřátí 24-jamkové plotny, ale ne příliš mnoho, aby do plotny nenastříkla. Aby se během třepání do plotny voda nenalila, měla by pokrývat 1/4 vnější hloubky jamky.

POZN.: *Pro přesné hybridizační podmínky je důležité, aby byla teplota kontrolována a aby byl ve vodní lázni dostatek vody.*

9. Čistou pinzetou vyjměte ze sáčku potřebný počet **HCV Strip**.
10. Vodovzdorným perem si na **HCV Strip** označte příslušné vzorky resp. kontroly.
11. Stripy vložte do příslušných jamek 24-jamkové plotny.
12. Do všech jamek, ve kterých je označený strip, odměřte po 4 ml ohřátého pracovního hybridizačního pufru.
13. Pomocí mikropipety se špičkou s aerosolovou bariérou odměřte do příslušné jamky s označeným stripem 100 µl denaturovaného amplikonu. Po každém přidavku plotnou opatrně zakolébejte. Pro každý přidavek amplikonu použijte novou špičku.
14. Přikryjte plotnu víkem a vložte do třepací vodní lázně vyhřáté na 55°C. Aby se víko během třepání neposouvalo, zatěžte je 1-librovým prstencovým závažím. Hybridizujte po dobu 20 minut při rychlosti třepání 60 ot/min.
15. Následujícím postupem si připravte pracovní konjugát: Pro každý testovaný strip přidejte 10 µl **SA-HRP** k 5 ml předehřátého "stringent" promývacího pufru. Dobře promíchejte. Pracovní konjugát je třeba uchovávat v čisté nádobě za pokojové teploty; pak je stálý 2 hodiny.
16. Vyjměte plotnu z vodní lázně a pracovní hybridizační pufr vakuovým odsátím odstraňte.
17. Do každé jamky typizační plotny odměřte 4 ml pracovního "ambient" promývacího pufru. Plotnou opatrně 3–4-krát zakolébejte, aby se stripy opláchly, a pracovní "ambient" promývací pufr okamžitě odsajte.
18. Do každé jamky typizační plotny odměřte 4 ml pracovního konjugátu. Čistým papírovým ubrouskem otřete víko plotny, uložte je na plotnu a vložte plotnu zpět do třepací vodní lázně vyhřáté na 55°C. Aby se víko během třepání neposouvalo, zatěžte je 1-librovým prstencovým závažím. Inkubujte po dobu 20 minut při rychlosti třepání 60 ot/min.
19. Vyjměte plotnu z lázně a pracovní konjugát vakuovým odsátím odstraňte.
20. Do každé jamky typizační plotny odměřte 4 ml pracovního "ambient" promývacího pufru. Plotnou opatrně 3–4-krát zakolébejte, aby se stripy opláchly, a pracovní "ambient" promývací pufr okamžitě odsajte.
21. Do každé jamky typizační plotny odměřte 4 ml pracovního "stringent" promývacího pufru. Čistým papírovým ubrouskem otřete víko plotny, uložte je na plotnu a vložte plotnu zpět do třepací vodní lázně vyhřáté na 55°C. Aby se víko během třepání neposouvalo, zatěžte je 1-librovým prstencovým závažím. Inkubujte po dobu 12 minut při rychlosti třepání 60 ot/min.
22. Vyjměte plotnu z lázně a pracovní promývací pufr vakuovým odsátím odstraňte.
23. Do každé jamky typizační plotny odměřte 4 ml pracovního "ambient" promývacího pufru. Čistým papírovým ubrouskem otřete víko plotny, položte je na plotnu a plotnu na 5 minut uložte na krouživou třepačku o třepací rychlosti 60 ot/min.
24. Sejměte plotnu z třepačky a pracovní "ambient" promývací pufr vakuovým odsátím odstraňte.
25. Do každé jamky typizační plotny odměřte 4 ml citrátového pufru. Čistým papírovým ubrouskem otřete víko plotny, položte je na plotnu a plotnu na 5 minut uložte na krouživou třepačku o třepací rychlosti 60 ot/min.
26. Následujícím postupem si připravte pracovní substrát: Na každý testovaný strip přidejte k 1 ml **SUB B** objem 4 ml **SUB A**. Dobře promíchejte. Pracovní substrát je třeba uchovávat v čisté nádobě za pokojové teploty mimo dosah přímého světla; pak je stálý 3 hodiny.
27. Sejměte plotnu z třepačky a pracovní citrátový pufr vakuovým odsátím odstraňte.

28. Do každé jamky typizační plotny odměřte 4 ml pracovního substrátu. Čistým papírovým ubrouskem otřete víko plotny, položte je na plotnu a plotnu na 10 minut uložte na krouživou třepačku o třepací rychlosti 60 ot/min.
29. Sejměte plotnu z třepačky a pracovní substrát vakuovým odsátím odstraňte.
30. Do každé jamky typizační plotny odměřte 4 ml destilované nebo deionizované vody. Čistým papírovým ubrouskem otřete víko plotny, položte je na plotnu a plotnu na 5 minut uložte na krouživou třepačku o třepací rychlosti 60 ot/min.
31. Sejměte plotnu z třepačky a destilovanou nebo deionizovanou vodu vakuovým odsátím odstraňte.
32. Do každé jamky typizační plotny odměřte 4 ml destilované nebo deionizované vody. Čistým papírovým ubrouskem otřete víko plotny, položte je na plotnu a plotnu na 5 minut uložte na krouživou třepačku o třepací rychlosti 60 ot/min.
33. Sejměte plotnu z třepačky a destilovanou nebo deionizovanou vodu vakuovým odsátím odstraňte.
34. Do každé jamky typizační plotny odměřte 4 ml destilované nebo deionizované vody. Do interpretace je možno ponechat stripy za pokojové teploty až jeden den ve vodě.

ČIŠTĚNÍ PLOTNY

Provádí se v: Poamplifikace – prostor amplifikace/detekce

1. Přidáním 1 dílu RBS35 k 9 dílům destilované nebo deionizované vody si připravte 10% roztok RBS35.
2. Všechny jamky plotny tímto 10% roztokem naplňte a nechte přes noc za pokojové teploty sáknout.
3. Plotnu důkladně destilovanou nebo deionizovanou vodou opláchněte.
4. Před použitím plotnu dokonale vysušte.

VÝSLEDKY

K interpretaci genotypizačního stripu na HCV LINEAR ARRAY strip z plotny čistou pinzetou vyjměte. Položte jej na čistou acetátovou fólii a vyrovnajte referenčním vodítko HCV s perem vyznačenou referenční čarou (REF) navrchu stripu. Ke stanovené genotypu vzorku označte pozitivně viditelné pásy a obrazec pozitivních sondových pásů porovnejte s tabulkou HCV genotypizačních vzorů. Pokud vzor na stripu neodpovídá přesně vzoru žádného sloupce, zvažte možnost, že by vzorek mohl obsahovat genotypů několik.

TABULKA VZORŮ GENOTYPŮ HCV

SONDA:	Genotyp 1				Genotyp 2			Genotyp 3						Genotyp 4		Genotyp 5			Genotyp 6				
1 - GT1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	+
2 - GT2	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3 - GT3	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4 - GT3	-	±	+	+	-	±	+	-	±	+	+	+	+	-	±	-	-	±	+	+	+	+	
5 - GT3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
6 - GT4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	±	±	-	-	-		
7 - GT5	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-		
8 - GT6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+		
9 -GT1- GT6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		

+	Pozitivní pás viditelný
±	Nezřetelný pás může být viditelný
-	Žádný viditelný pás

KONTROLA KVALITY

V každém testu musí být zařazeno minimálně po jednom replikátu AMPLICOR HCV (–) Control a AMPLICOR HCV (+) Control. Jak je tomu při každém novém laboratorním postupu, noví pracovníci obsluhy by měli zvážit, jestli by nebylo dobře při každém testování použít ještě další kontroly až do doby, než dokáží test provádět s vysokou jistotou správně. Na pozice kontrol v amplifikační plotně nebo v A-kruhu/kruzích nejsou kladeny žádné požadavky.

Provádíte-li detekci pomocí genotypizačních stripů na HCV LINEAR ARRAY za využití amplikonu z testu COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0, zkontrolujte si výpis z tiskárny, zda v něm nejsou upozorňovací návěští (flags) a poznámky a zda je tedy měření platné. Pokud jde o tisk a interpretaci návěští a poznámek, viz provozní příručku (*Operator's Manual*) k přístroji COBAS AMPLICOR Analyzer.

Směrnice nebo požadavky místních či celostátních předpisů nebo akreditačních organizací si mohou vyžadovat testování dalších kontrol.

Negativní kontrola

Ve výsledku testu negativní kontroly AMPLICOR HCV (–) nesmějí být žádné pozitivní pásy. Pokud jsou v AMPLICOR HCV (–) Control nějaké pozitivní pásy vidět, je celý test neplatný. Je pak třeba celý postup, tj. přípravu vzorků a kontrol, reverzní transkripci, amplifikaci a detekci LINEAR ARRAY, zopakovat. Pokud test negativní kontroly AMPLICOR HCV (–) Control vykazuje pozitivní pásy soustavně, spojte se s místním zastoupením firmy Roche a vyžádejte si technickou pomoc.

Pozitivní kontrola

Pozitivní kontrola AMPLICOR HCV (+) Control, využívaná v genotypizačním testu na HCV LINEAR ARRAY, byla vypracována pro testy AMPLICOR a COBAS AMPLICOR HCV Tests, v2.0, jejichž mez detekce činí 60 IU/ml. Proto leží nominální input kontroly pod definovanou mezí detekce genotypizačního testu na HCV LINEAR ARRAY, jež činí 500 IU/ml. Prokázalo se, že při popisovaném zkušebním postupu poskytuje kontrola AMPLICOR HCV (+) Control reprodukovatelně pozitivní pásy, které jsou zřetelně vidět, ale jsou tlumenější, než jak je tomu u běžných klinických vzorků (viz obr. 1).

Test pozitivní kontroly AMPLICOR HCV (+) má poskytovat výsledek:

- Sonda č. 1 (+; je vidět pozitivní pás)
- Sonda č. 2 (+/-; může být vidět slabý pás)
- Sonda č. 3 (–; není vidět žádný pás)
- Sonda č. 4 (+; je vidět pozitivní pás)
- Sonda č. 5 (–; není vidět žádný pás)
- Sonda č. 6 (–; není vidět žádný pás)
- Sonda č. 7 (–; není vidět žádný pás)
- Sonda č. 8 (–; není vidět žádný pás)
- Sonda č. 9 (+; je vidět pozitivní pás).

Jestliže kontrola AMPLICOR HCV (+) Control tento přesný výsledek neposkytuje, je celý test neplatný. Pak je třeba celý postup, tj. přípravu vzorků a kontrol, reverzní transkripci, amplifikaci a detekci LINEAR ARRAY, zopakovat. Pokud test kontroly AMPLICOR HCV (+) Control vykazuje výsledek s odlišným vzorem pozitivních pásů soustavně, spojte se s místním zastoupením firmy Roche a vyžádejte si technickou pomoc.

Sonda s pozitivní kontrolou

Genotypizační strip na HCV LINEAR ARRAY obsahuje sondu (9 – HCV GT1 – GT6), jež detekuje HCV genotypy 1–6. Všechny vzorky i kontrola AMPLICOR HCV (+) Control musejí s touto sondou dávat pozitivní výsledek. Pokud sonda na kontrolu AMPLICOR HCV (+) Control pozitivní není, je celý test neplatný. Pak je třeba celý postup, tj. přípravu vzorků a kontrol, reverzní transkripci, amplifikaci a detekci LINEAR ARRAY, zopakovat. Pokud je výsledek testu kontroly AMPLICOR HCV (+) Control neplatný soustavně, spojte se s místním zastoupením firmy Roche a vyžádejte si technickou pomoc. Není-li sonda pozitivní s určitým jednotlivým vzorkem, je výsledek pro tento vzorek neplatný. U tohoto vzorku je pak třeba celý postup, tj. přípravu vzorků a kontrol, reverzní transkripci, amplifikaci a detekci LINEAR ARRAY, zopakovat. Pokud vzorek, o němž je známo, že je na RNA HCV pozitivní, poskytuje soustavně neplatné výsledky, je možné, že má na genotypizační test na HCV LINEAR ARRAY inhibiční účinek.

BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ PŘI PRÁCI

1. Pracovní tok musí v laboratoři probíhat jednosměrně, od preamplifikačního prostoru směrem k poamplifikačnímu prostoru (amplifikace/detekce). Preamplifikační postupy musejí začínat přípravou činidel, po které následuje příprava vzorků. Látky a vybavení se musejí přiřadit jednotlivým preamplifikačním činnostem a nesmějí se používat k žádným jiným činnostem, ani se nesmějí přenášet mezi jednotlivými vyhrazenými prostory. Ve všech prostorech je třeba nosit rukavice, které se před opuštěním prostoru vymění. Vybavení a materiály pro přípravu činidla se nesmějí používat k přípravě vzorků, ani pro pipetování nebo zpracování amplifikované DNA či jiných zdrojů terčové DNA. Poamplifikační materiály a vybavení musí vždy zůstat v poamplifikačním prostoru.

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

OMEZENÍ

1. Tento test je validován pouze pro používání s lidským sérem nebo plazmou odebranou do EDTA jako antikoagulantu. Pokud by byly testovány jiné typy vzorků, mohly by být výsledky falešně negativní nebo falešně pozitivní.
2. ***Heparin inhibuje PCR, a proto se vzorky s heparinem jako antikoagulantem při testu AMPLICOR HCV Test, v2.0, COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0 nebo HCV LINEAR ARRAY Genotyping Test nesmějí používat.***
3. K získání spolehlivých výsledků je třeba dodržovat patřičné postupy odběru, transportu, skladování a zpracování vzorků.
4. Genotypizace HCV závisí na tom, kolik virových částic je ve vzorku přítomno, na což mají vliv metody odběru vzorku, status pacienta (např. věk, symptomy) a popřípadě stádium infekce.
5. Vzhledem k heterogenní povaze sekvencí mezi viry HCV genotypu 6 byla sonda genotypu 6 vypracována specificky k identifikaci genotypu 6a. Jak lze touto sondou identifikovat viry jiných subtypů genotypu 6, není zjištěno.
6. V důsledku inhibice polymerázy mohou být výsledky falešně negativní. Ke genotypizačnímu testu na HCV LINEAR ARRAY se přidává sonda HCV-pozitivní kontroly, což umožňuje zjistit zpracované vzorky, jež obsahují látky, které by mohly amplifikaci PCR rušit.
7. Díky přítomnosti enzymu AmpErase v HCV Master Mix se snižuje riziko kontaminace amplikonu. Kontaminaci od HCV-pozitivních kontrol a vzorků lze ovšem zabránit pouze důsledným uplatňováním zásad správné klinické praxe a pečlivým dodržováním postupů uvedených v této vložce.
8. Jako je tomu u každého diagnostického testu, je třeba výsledky z genotypizačního testu na HCV LINEAR ARRAY interpretovat s uvážením všech klinických zjištění a laboratorních nálezů.
9. S produktem by měli pracovat pouze pracovníci znalí technik PCR.
10. Tento produkt lze používat výhradně ve spojení s tepelným cyklizátorem přístroje GeneAmp PCR System 9600, GeneAmp PCR System 2400 nebo GeneAmp PCR System 9700 firmy Applied Biosystems nebo s přístrojem COBAS AMPLICOR Analyzer.

RUŠIVÉ LÁTKY

Heparin inhibuje PCR, proto vzorky odebrané s heparinem nepoužívejte.

Je zjištěno, že zvýšené hladiny triglyceridů, bilirubinu, hemoglobinu, imunoglobulinu a albuminu ve vzorku genotypizaci HCV tímto testem neruší. Virem HCV bylo nastříknuto deset jednotlivých vzorků se zvýšenou hladinou jednotlivých potenciálně rušivých látek; žádný rušivý vliv na genotypizační test na HCV LINEAR ARRAY u nich zjištěn nebyl.

Ani následující léčiva genotypizaci HCV tímto testem neruší.

Interferon alfa-2a	Nevirapin
Pegylovaný interferon alfa-2a	Efavirenz
Interferon alfa-2b	Ganciclovir
Zidovudin	Valganciclovir HCl
Lamivudin	Acyclovir
Zalcitabin	Valacyclovir HCl
Ribavirin	Dapson
Stavudin	Biaxin
Ritonavir	Sulfamethoxazol/trimethoprim
Nelfinavir	Fluoxetin HCl
Saquinavir	Venlafaxin HCl
Indinavir	Bupropion HCl
Amprenavir	Sertralin HCl
Lopinavir/Ritonavir	Paroxetin HCl
Tenofovir disoproxil fumarát	

VYHODNOCENÍ LABORATORNÍCH VÝSLEDKŮ

A. Hodnocení genotypů HCV

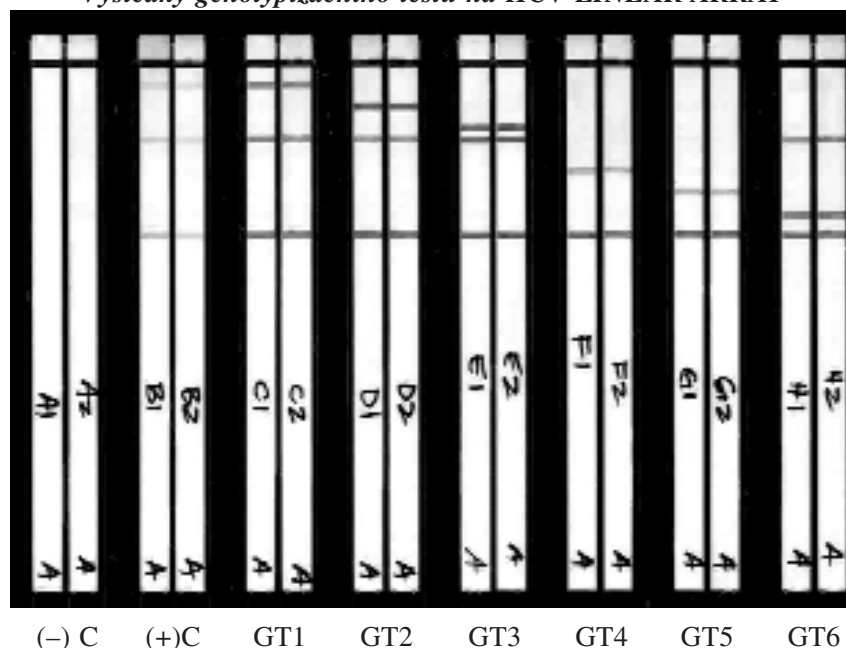
Bylo zpracováno a genotypizačním testem na HCV LINEAR ARRAY vyhodnoceno celkem 200 jednotlivých klinických vzorků reprezentujících HCV genotypy 1 až 6, jejichž přiřazení bylo poskytnuto dodavatelem, přičemž bylo využito soupravy AMPLICOR HCV Test, v2.0 i COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0. Počet testovaných vzorků v členění podle genotypu udává tab. 1. Souhlas s genotypem uváděným dodavatelem byl genotypizací HCV LINEAR ARRAY získán u 195 vzorků. Pět vzorků poskytlo genotypizaci HCV LINEAR ARRAY výsledek odlišný od toho, co uváděl dodavatel. Sekvencováním ampliconu z oněch pěti nesouhlasných vzorků se potvrdilo, že sekvence každého z nich je v souladu se vzorem pásů sondy pozorovaným na genotypizačním stripu testu na HCV LINEAR ARRAY.

Tab. 1
Počet testovaných vzorků v členění podle genotypu

Genotyp	Počet testovaných vzorků
1	110
1/2	3
2	36
3	21
4	20
5	7
6	3

Na obr. 1 jsou znázorněny údaje za použití komerčně dostupného panelu genotypů HCV (Teragenix, Ft. Lauderdale, FL, USA) s izoláty z HCV genotypu 1 až 6 (GT1 až GT6). Nominální hodnota panelu činí u každého genotypového vzorku zhruba 2 500 IU/ml. Zahrnuty jsou rovněž kontroly HCV (-) C, v2.0 a HCV (+) C, v2.0. U každého genotypizačního stripu na HCV LINEAR ARRAY byla provedena samostatná příprava vzorku, amplifikace a detekce.

Obr. 1.
Výsledky genotypizačního testu na HCV LINEAR ARRAY



B. Mez detekce

Mez detekce genotypizačního testu na HCV LINEAR ARRAY byla stanovena analýzou postupných ředění vzorků HCV v HCV-negativní lidské plazmě s EDTA a séru. V případě analýzy genotypu 1 byl ředěn sekundární standard [kalibrovaný na mezinárodní standard HCV (96/790)¹⁷ WHO]. U genotypů 2 až 6 bylo provedeno postupné ředění klinických izolátů. U každého genotypového vzorku v každé matici byla analyzována celkem 4 nezávislá ředění. Ve studii byly použity dvě šarže činidel a k analýze byla použita jak souprava AMPLICOR HCV Test, v2.0, tak souprava COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0.

Výsledky studie, uvedené v tab. 2 a 3, ukazují, že je genotypizačním testem na HCV LINEAR ARRAY za použití souprav AMPLICOR HCV Test, v2.0 i COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0 detekována RNA HCV genotypu 1 až 6 jak v plazmě s EDTA, tak v séru, při koncentraci 500 IU/ml nebo vyšší s četností pozitivity vyšší než 95%.

Tab. 2.
Mez detekce – genotypizační test na HCV LINEAR ARRAY
za použití soupravy AMPLICOR HCV Test, v2.0

Genotyp HCV	Mez detekce plazma s EDTA					
	1000 IU/ml		500 IU/ml		250 IU/ml	
	n pozitivních / n testovaných	Podíl pozitivních (%)	n pozitivních / n testovaných	Podíl pozitivních (%)	n pozitivních / n testovaných	Podíl pozitivních (%)
1	28/28	100%	28/28	100%	28/28	100%
2	28/28	100%	28/28	100%	28/28	100%
3	28/28	100%	28/28	100%	28/28	100%
4	28/28	100%	28/28	100%	28/28	100%
5	28/28	100%	28/28	100%	24/28	86%
6	28/28	100%	28/28	100%	28/28	100%
Genotyp HCV	Mez detekce sérum					
	1000 IU/ml		500 IU/ml		250 IU/ml	
	n pozitivních / n testovaných	Podíl pozitivních (%)	n pozitivních / n testovaných	Podíl pozitivních (%)	n pozitivních / n testovaných	Podíl pozitivních (%)
1	28/28	100%	28/28	100%	28/28	100%
2	28/28	100%	28/28	100%	28/28	100%
3	28/28	100%	28/28	100%	28/28	100%
4	28/28	100%	28/28	100%	24/28	86%
5	28/28	100%	28/28	100%	17/28	61%
6	28/28	100%	28/28	100%	28/28	100%

Tab. 3.
Mez detekce – genotypizační test na HCV LINEAR ARRAY
za použití soupravy COBAS AMPLICOR HCV Test, v2.0

Genotyp HCV	Mez detekce plazma s EDTA					
	1000 IU/ml		500 IU/ml		250 IU/ml	
	n pozitivních / n testovaných	Podíl pozitivních (%)	n pozitivních / n testovaných	Podíl pozitivních (%)	n pozitivních / n testovaných	Podíl pozitivních (%)
1	28/28	100%	28/28	100%	28/28	100%
2	28/28	100%	28/28	100%	28/28	100%
3	28/28	100%	28/28	100%	28/28	100%
4	28/28	100%	28/28	100%	28/28	100%
5	28/28	100%	28/28	100%	21/28	75%
6	28/28	100%	28/28	100%	28/28	100%
Genotyp HCV	Mez detekce sérum					
	1000 IU/ml		500 IU/ml		250 IU/ml	
	n pozitivních / n testovaných	Podíl pozitivních (%)	n pozitivních / n testovaných	Podíl pozitivních (%)	n pozitivních / n testovaných	Podíl pozitivních (%)
1	28/28	100%	28/28	100%	28/28	100%
2	28/28	100%	28/28	100%	28/28	100%
3	28/28	100%	28/28	100%	28/28	100%
4	28/28	100%	28/28	100%	26/28	93%
5	28/28	100%	28/28	100%	19/28	68%
6	28/28	100%	28/28	100%	28/28	100%

C. Analytická specifčnost

Analytická specifčnost genotypizačního testu na HCV LINEAR ARRAY byla hodnocena zkoušením na možnou křížovou reaktivitu na flaviviry, patogenní mikroorganismy a na potenciální kontaminanty z normální epidermální mikroflóry, jež by mohly být ve vzorcích přítomny. Byly testovány vzorky (celkem n = 40) obsahující virové izoláty (n = 35) nebo jiné mikroorganismy (n = 5) (viz tabulka 4). Všechny vzorky testované genotypizačním testem na HCV LINEAR ARRAY byly na HCV negativní. Tyto výsledky prokazují, že je genotypizační test na HCV LINEAR ARRAY pro HCV specifický a s řadou virů či bakterií, které mohou být ve vzorku přítomny, křížově nereaguje.

Tabulka 4
Analytická specifčnost

Virus horečky Dengue typ 1	Adenovirus typ 2	Herpes simplex typ I, MacIntyre	<i>Propionibacterium acnes</i>
Virus horečky Dengue typ 2	Adenovirus typ 3	Herpes simplex typ I, F	<i>Staphylococcus aureus</i>
Virus horečky Dengue typ 3	Adenovirus typ 7	Herpes simplex typ I, HF	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Virus horečky Dengue typ 4	Candida albicans	Herpes simplex typu II, G	HTLV-I, buňky C5/MJ
Virus žluté zimnice	Cytomegalovirus Davis	Herpes simplex typu II, MS	HTLV-I, buňky MJ (G11)
Zika virus	Cytomegalovirus Towne	Chřipka typu A	HTLV-II, buňky MoT
Banži virus	Epstein-Barrův virus RAJI	Chřipka typu B	<i>Mycobacterium avium</i>
Ilheus virus	Epstein-Barrův virus P-3	Lidský papilloma virus typ 6b	Varicella Zoster Ellen
Virus St.-Louiské encefalidity	Hepatitida B, genotyp A	Lidský papilloma virus typ 11	Varicella Zoster Oka
Západonilský virus rodu I	Hepatitida B, genotyp B	Lidský papilloma virus typ 18	Hepatitida A

D. Klinická specifčnost

Klinická specifčnost genotypizačního testu na HCV LINEAR ARRAY byla stanovena analýzou HCV-negativního séra a plazmy s EDTA dárců krve. Celkem bylo testováno 500 serologicky HCV-negativních vzorků (250 vzorků séra a 250 vzorků plazmy s EDTA); u všech byl výsledek genotypizačního testu na HCV LINEAR ARRAY negativní. Z těchto výsledků vyplývá klinická specifčnost city genotypizačního testu na HCV LINEAR ARRAY ve výši $\geq 99,99\%$.

LITERATURA

1. 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.
2. Lauer, G.M., Walker, B.D. 2001. Hepatitis C Virus Infection *New England Journal of Medicine* **345**:41-52.
3. Alberti, A., Chemello, L., Noventa, F. et al. 1997. Therapy of hepatitis C: re-treatment with alpha interferon. *Hepatology* **26**:137S-142S.
4. Davis, G.L., Esteban-Mur, R., Vinod, R. et al. 1998. Inteferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin for the treatment of relapse of chronic hepatitis C. *New England Journal of Medicine* **339**:1493-1499.
5. Amoroso, P., Rapiecetta, M., Tosti, M.E. et al. 1998. Correlation between virus genotype and chronicity rate in acute hepatitis C. *Journal of Hepatology* **28**:939-944.
6. Myers, T.W., Gelfand, D.H. 1991. Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase. *Biochemistry* **30**:7661-7666.
7. Stuyver, L., Rossau, R., Wyseur, A. et al. 1993. Typing hepatitis C virus isolates and characterization of new subtypes using a line probe assay. *Journal of General Virology* **74**:1093-1102.
8. 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.
9. Bukh, J. R. Purcell, R. Miller. 1992. Importance of primer selection for the detection of hepatitis C virus RNA with the polymerase chain reaction assay. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **89**:187-191.
10. Bukh, J., Purcell, R.H., Miller, R.H. 1992. Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **89**:4942-4946.
11. Okamoto, H., Okada, S., Sugiyama, Y. et al. 1990. The 5'-terminal sequence of hepatitis C virus genome. *Japanese Journal of Experimental Medicine* **60**:167-177.
12. Young, K.Y., Resnick, R., Myers, T.W. 1993. Detection of hepatitis C virus RNA by a combined reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. *Journal of Clinical Microbiology* **31**:882-886.
13. 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.
14. Richmond, J.Y., McKinney, R.W. eds. 1999. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. HHS Publication Number (CDC) 93-8395.
15. CLSI. Protection of Laboratory Workers from Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids, and Tissue. Approved Guideline. CLSI Document M29-A Villanova, PA:CLSI, 1997.
16. International Air Transport Association. Dangerous Goods Regulations, 41. vyd.. 2000. 704 stran.
17. 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.



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



Distributed by

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

Roche Diagnostics (Schweiz) AG
CH-6343 Rotkreuz

Roche Diagnostics GmbH
D-68298 Mannheim, Germany

Roche Diagnostics S.L.
E-08006 Barcelona

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

Roche Diagnostics
F-38240 Meylan

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

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

Roche, AMPLICOR, AMPLILINK, AmpErase, GeneAmp, COBAS and LINEAR ARRAY jsou obchodní známky člena Roche Group.

Roche Response Center je známka služby člena skupiny Roche Group.

Costar[®] je registrovaná obchodní známka společnosti Corning Costar Corporation. Paramagnetické částice

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

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

Impact[®] je registrovaná obchodní známka společnosti MATRIX Technologies Inc.

MicroAmp[®] je registrovaná obchodní známka společnosti Applera Corporation nebo jejích dceřiných společností ve Spojených státech a některých dalších zemích.

Multipette[®] je registrovaná obchodní známka společnosti Brinkmann Instruments, Inc.

ProClin je registrovaná obchodní známka společnosti Rohm and Haas Company.

SST[®] je registrovaná obchodní známka společnosti Becton Dickinson and Co.

Copyright 2005, Roche Molecular Systems, Inc. Všechna práva vyhrazena.

4/2005

(04392396001-01ENGL)
04584856001-01



Roche Diagnostics GmbH
D-68298 Mannheim

